

На правах рукописи

КАРАСЕВА
Мария Юрьевна

**КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА И ОСОБЕННОСТИ
ГЕМОСТАЗА ПРИ ГЕПАТОЛЕНТИКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ**

14.01.11 – нервные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург - 2016

Работа выполнена в ФГБОУ ВО
«Северо-Западный государственный медицинский университет имени
И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

- Научный руководитель:** Лобзин Сергей Владимирович
доктор медицинских наук, профессор
- Научный консультант:** Тарковская Лана Ростиславна
кандидат биологических наук
- Официальные оппоненты:**
- Михайлов Владимир Алексеевич – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, руководитель отделения реабилитации психоневрологических больных Санкт-Петербургского научно-исследовательского психоневрологического института им. В.М. Бехтерева.
 - Гузева Валентина Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой неврологии ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет».

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится « » 2016 года в на заседании диссертационного совета Д 208.090.06 при ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, дом 6-8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени акад. И.П. Павлова

Автореферат разослан « » 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор медицинских наук, профессор

Матвеев Сергей Владимирович

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Гепатолентикулярная дегенерация (ГЛД) – хроническое прогрессирующее аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное нарушением метаболизма меди и избыточным ее накоплением в тканях, приводящее к сочетанному поражению паренхиматозных органов (прежде всего печени) и головного мозга (преимущественно подкорковых ядер). В 25-60% случаев данное заболевание не диагностируется, либо диагностируется недопустимо поздно (Walshe J.M., 1995, 2007, Hu J., 2001, Prashanth L.K., 2004, Czlonkovska A., 2005, Roberts E.A., 2008, Lin L.J., 2014). Поздняя диагностика, несвоевременное назначение медьэлиминирующей терапии приводит к инвалидизации и гибели больных, как правило, в молодом возрасте.

В настоящее время нет ни одного патогномичного признака заболевания. Для окончательного диагноза используется совокупность клинических и лабораторных данных, наиболее значимые из которых представлены в Лейпцигской количественной шкале для диагностики ГЛД (8th International Meeting on Wilson's disease and Menkes disease, Leipzig, 2001). Несмотря на разработанные алгоритмы и шкалы, диагностика заболевания запаздывает в среднем на 3–15 лет (Hu J., 2001, Prashanth L.K., 2004, Сухарева Г.В., 2005, Walshe J.M., 2007, Roberts E.A., 2008, Lin L.J., 2014). Поиск дополнительных диагностических критериев является в настоящее время приоритетной задачей в области изучения ГЛД.

Геморрагический синдром является одним из наиболее грозных осложнений ГЛД. Развитие рецидивирующих кровотечений, кожного геморрагического синдрома, коагулопатии и тромбоцитопении при ГЛД, как правило, связывают с декомпенсацией печеночно-клеточной недостаточности и развитием портальной гипертензии (Fischer M., 1969, Jablonska-Kaszewska I., 1995, Ferenci P., 2003, Сухарева Г.В., 2005, 2012, Розина Т.П., 2005, Иванова-Смоленская И.А., 2006, Czlonkovska A., 2010, Prasun N., 2011, Полещук В.В., 2012, Гуляева С.Е., 2012).

Единичные работы за весь период изучения заболевания были посвящены исследованию функции тромбоцитов, а также их возможной связи с проявлениями кровоточивости при ГЛД (Owen C.A. Jr., 1976, Cohen A.M., 1982, 1984). Soriana J. et al. (1974) выявили способность белка церулоплазмينا (ЦП) индуцировать агрегацию тромбоцитов через аденозинфосфорные (АДФ) рецепторы. В свою очередь, Ермолаева Е.Н. (2005) в экспериментальном исследовании показала, что ЦП может увеличивать количество тромбоцитов и менять их агрегационную активность. Действие ЦП относительно функционального состояния тромбоцитов реализуется через его антиоксидантные свойства. Вместе с тем при ГЛД имеются и другие факторы, способные изменять морфофункциональные свойства тромбоцитов. Так острый и/или хронический гемолиз, индуцируемый «свободной» фракцией меди, приводит к появлению в крови большого количества проагрегантных факторов. Повышение в крови уровня индуцибельной синтазы оксида азота и эндогенного оксида азота у больных ГЛД (Hussain S.P. et al., 2000, Dalgic B., 2005) может быть еще одним фактором, влияющим на морфофункциональные свойства тромбоцитов. Развитие окислительного стресса, отмеченное многими авторами при ГЛД (Лекарь П.Г., Ботвинник В.С., 1983, Ogihara H., 1995, Attri S., 2006, Bruha R., 2012, Kalita J., 2014), может приводить к изменению мембран тромбоцитов и, как следствие, усилению их агрегации.

Впервые ангиотоксические эффекты при ГЛД были показаны Коноваловым Н.В. еще в 1960 г., в основе их лежат морфологические изменения мелких сосудов и рас-

стройства микроциркуляции – стазы, микрокровоизлияния, периваскулярный отек. Последователями Коновалова Н.В. было доказано отложение в эндотелии мелких сосудов головного мозга ионов меди (Левина Г.Я., 1967, Shiraki H., 1968, Лекарь П.Г., Макарова В.А., 1984). В 1982 г. Ziche M. et al. и Raju K.S. et al. в экспериментальных работах на животных показали, что ЦП и ионы меди участвуют в процессе ангиогенеза. В дальнейшем были изучены отдельные механизмы данного процесса – ионы меди стимулируют экспрессию и активность проангиогенных белков (гипоксией индуцируемый фактор-1- α , фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиогенин), изменяя структурно-функциональные свойства эндотелия сосудов и стимулируя васкуляризацию тканей. В эксперименте авторы отмечают зависимость данных эффектов от концентрации меди (Afton S.E. et al., 2009, Керимкулова Н.В. и др., 2014). При исследовании церебральной гемодинамики у больных ГЛД Волошин-Гапонов И.К. и соавт. (2013) убедительно показали структурные изменения сосудов, а также наличие эндотелиальной дисфункции.

Таким образом, присоединение к коагулопатии сосудистой эндотелиальной дисфункции и тромбоцитарных нарушений при ГЛД приводит к снижению гемостатического резерва печени и ухудшает течение заболевания.

Изучение возможных механизмов развития геморрагического синдрома при ГЛД, его клинических и лабораторных особенностей, позволит расширить представление о патогенезе заболевания и обозначить дополнительные диагностические критерии ГЛД.

Степень разработанности темы исследования

Многими авторами отмечено частое развитие геморрагического синдрома при ГЛД (Fischer M., 1969, Sutor A.H., 1973, Owen C.A. Jr., 1976, Jablonska-Kaszewska I., 1995, Ferenci P., 2003, Сухарева Г.В., 2005, 2012, Розина Т.П., 2005, Иванова-Смоленская И.А., 2006, Prasun N., 2011, Полещук В.В., 2012, Гуляева С.Е., 2012). Однако детального исследования системы гемостаза, механизмов развития, частоты встречаемости и особенностей геморрагического синдрома у больных с данной патологией не проводилось. Таким образом, особенности нарушения гемостаза при ГЛД изучены недостаточно. Работы, посвященные изучению геморрагического синдрома, единичные и в основном связаны с изучением состояния печени у больных ГЛД.

Отсутствие комплексного подхода к изучению данной проблемы, необходимость оценки вклада геморрагического синдрома в тяжесть течения ГЛД определили цель работы.

Цель работы

Повышение качества диагностики ГЛД на основании комплексной оценки клинического, неврологического, биохимического и гемостазиологического статуса у больных с различными формами болезни.

Задачи исследования

1. Оценить частоту встречаемости основных неврологических синдромов и их сочетание с геморрагическими проявлениями у больных ГЛД.
2. Изучить особенности геморрагических проявлений у больных ГЛД.
3. Исследовать тромбоцитарное и плазменно-коагуляционное звено гемостаза у больных ГЛД.
4. Изучить связь между нарушением обмена меди и изменениями в системе гемостаза у больных ГЛД.
5. Оценить динамику клинических и лабораторно-инструментальных данных, включая показатели тромбоцитарного и плазменно-коагуляционного гемостаза, у больных ГЛД на фоне проводимой медьэлиминирующей терапии.

б. Изучить влияние ионов меди на агрегацию тромбоцитов *in vitro* в экспериментальной модели на тромбоцитах здоровых волонтеров.

Научная новизна

Впервые у больных ГЛД проведено комплексное гемостазиологическое исследование и уточнена роль нарушений в системе гемостаза в патогенезе и тяжести ГЛД. Показаны высокая частота встречаемости геморрагического синдрома, отличительные особенности геморрагических проявлений при ГЛД, разнонаправленные изменения в тромбоцитарном и плазменно-коагуляционном звеньях гемостаза.

Проведен анализ частоты встречаемости геморрагического синдрома в сочетании с другими характерными для ГЛД клиническими и лабораторными проявлениями, что позволило выделить комплекс ведущих клинико-лабораторных синдромов при неврологической и висцеральной стадиях заболевания.

Установлено влияние нарушений обмена меди у больных ГЛД на морфофункциональные свойства тромбоцитов и уточнен их вклад в развитие геморрагического синдрома, обоснована необходимость коррекции тромбоцитарных нарушений на фоне эффективной медьэлиминирующей терапии.

Предложен алгоритм интерпретации показателей обмена меди. Обосновано использование комплекса гемостазиологических показателей в диагностике тяжести заболевания и контроле эффективности лечения больных ГЛД.

Предложены дополнительные клинико-лабораторные критерии для ГЛД и обосновано включение их в диагностический алгоритм.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты исследования расширяют рамки современных представлений о клинической картине и патогенезе ГЛД, создают основу для внедрения в клиническую практику комплекса клинико-гематологических тестов, способствующих дальнейшему совершенствованию методов диагностики, оценки тяжести и эффективности терапии ГЛД.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в соответствии с принципами доказательной медицины. В исследовании использовались клинические, лабораторные, инструментальные и статистические методы, проводилось анкетирование. Исследование включало экспериментальную часть. Объектом исследования явились больные с различными стадиями ГЛД, в качестве группы сравнения изучались больные с заболеваниями печени «невильсоновской» этиологии (БПНВЭ), в экспериментальной части работы исследовалась кровь здоровых добровольцев. Предмет исследования – особенности клинико-anamnestических и лабораторно-инструментальных характеристик заболевания.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Геморрагический синдром является одним из ведущих при ГЛД. Анамнестические данные о ежедневных или еженедельных геморрагических проявлениях капиллярного типа, а также о наличии геморрагических эпизодов в детском возрасте должны рассматриваться как характерный диагностический критерий при проведении дифференциального диагноза в пользу ГЛД.

2. Нарушение обмена меди у больных ГЛД вызывает количественные и качественные изменения в тромбоцитарном звене гемостаза. Хроническая интоксикация медью приводит к развитию коагулопатии, за счет снижения активности факторов свертывания, синтезируемых в печени (V, VII, X).

3. На фоне медьэлиминирующей терапии отмечается положительная динамика неврологических симптомов, морфофункционального состояния печени, нормализуются показатели плазменно-коагуляционного звена гемостаза, увеличивается количество тромбоцитов в крови, однако, сохраняются повышенные показатели внутрисосудистой активации тромбоцитов, что требует дополнительной коррекции.

Степень достоверности результатов. Работа выполнена на достаточном количестве материала – 75 больных ГЛД. Для анализа полученных результатов использовались адекватные статистические методы.

Личный вклад автора в проведенное исследование. Разработка дизайна исследования, анализ источников литературы по изучаемой теме, формирование групп исследования, разработка анкеты для оценки частоты встречаемости и отличительных особенностей геморрагических проявлений у больных ГЛД, сбор анамнеза, клинический осмотр, работа с медицинскими документами, личное участие в проведении лабораторных исследований, наблюдение пациентов в динамике, экспериментальная часть работы, статистическая обработка полученных данных и написание глав диссертации.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на 79-ой конференции Студенческого Научного Общества СПбГМА им. И.И. Мечникова (2006, Санкт-Петербург), 80-ой конференции Студенческого Научного Общества СПбГМА им. И.И. Мечникова (2007, Санкт-Петербург), на Всероссийской Юбилейной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы психиатрии и неврологии» (2007, Санкт-Петербург), на научно-практической конференции «Исследования и разработки по приоритетным направлениям в медицине» (2008, Санкт-Петербург), на 21st International Medical Sciences Student Congress (2008, Istanbul), 82-ой конференции Студенческого Научного Общества СПбГМА им. И.И. Мечникова (2009, Санкт-Петербург), на X Всероссийском съезде неврологов с международным участием (2012, Нижний-Новгород), на 16th Congress of the European Federation of Neurological Societies (2012, Stockholm, Sweden), на XXI World Congress of Neurology (2013, Vienna, Austria), на XX World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders (2013, Geneva, Switzerland), на 11-ой Школе выходного дня для неврологов Санкт-Петербурга и Северо-Западного Федерального Округа РФ «Инновации в клинической неврологии» (2013, Зеленогорск), на Всероссийской научно-практической конференции «Патология гемостаза – общеклиническая проблема» (2013, Санкт-Петербург).

Работа апробирована и рекомендована к защите на заседании сотрудников лаборатории свертывания крови ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России 13 января 2015, а также на заседании кафедры неврологии им. акад. С.Н. Давиденкова ГОУВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова 18 июня 2015.

Внедрение в практику. Научные положения и практические рекомендации диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры неврологии им. академика С.Н. Давиденкова и включены в комплекс диагностических мероприятий при ГЛД в ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Публикации. Основные результаты диссертационного исследования отражены в 17 печатных работах, 2 из них в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией Российской Федерации.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 149 страницах машинописного текста. Состоит из введения, четырех глав («Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждения», «Заключение»), выводов, практических рекомендаций, библиографического указателя, включающего 266 работ, в том числе зарубежных – 212, и трех приложений. Работа иллюстрирована 32 таблицами, 13 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Объектом исследования стала группа из 75 больных ГЛД (40 мужчин, 35 женщин) в возрасте от 10 лет до 61 года (средний возраст – $30,1 \pm 11,5$ лет), находившихся на лечении в клиниках неврологии, внутренних болезней СЗГМУ им. И.И. Мечникова и наблюдавшихся амбулаторно в период с 2007 по 2014 год.

Диагноз ГЛД устанавливали по совокупности клинических и лабораторных критериев, рекомендованных European Association for Study of Liver (EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease, 2012), с учетом баллов по Лейпцигской количественной шкале для диагностики ГЛД (8th International Meeting on Wilson's and Menkes disease, Leipzig, 2001). Выделение стадий и форм заболевания адаптировали к существующим классификациям (Коновалов Н.В., 1960, Walshe J., 1989).

Больным проводилось комплексное обследование, включавшее **неврологический осмотр, офтальмологическое обследование** (осмотр в щелевой лампе); нейровизуализационные методы – **магнитно-резонансная томография (МРТ)** головного мозга на магнитно-резонансном томографе Excite HD, 1,5 Тл (General Electric, США). Степень морфологических изменений печени определяли по данным **ультразвукового исследования (УЗИ)** органов брюшной полости на аппарате SonoAce X8 Medison (Medison, Корея), **фиброгастроуденоскопии (ФГДС)** на аппарате OLYMPUS GIF XQ 40 (OLYMPUS Inc., Япония), **эластометрии** печени на аппарате FibroScan FS 502 (ECHOSENS S.A., Франция) и **биопсии** печени. **Молекулярно-генетическое исследование** гена АТР7В проводилось на базе ФГБУ «Медико-Генетический Научный Центр» (ФГБУ «МГНЦ» РАМН), директор лаборатории Поляков А.В. **Лабораторное обследование**, включающее **клинический анализ крови** (количество тромбоцитов) выполнялось на гематологическом анализаторе «COULTER Ac*Т 5diff» (Beckman Coulter, США), **биохимический анализ крови** (Аланинаминотрансфераза (АЛТ), Аспартатаминотрансфераза (АСТ), Билирубин общий и прямой, Щелочная фосфатаза (ЩФ), Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ), Общий белок, Альбумин, Холестерин, Глюкоза) на автоматическом биохимическом анализаторе «COBAS INTEGRA 400 plus» (Roche Diagnostics, Швейцария), **обмен меди**: уровень ЦП методом кинетической нефелометрии на иммунохимическом анализаторе «UniCel DxС 600» (Beckman Coulter, США), уровень общей меди сыворотки крови и уровень меди в моче спектрофотометрическим методом на аппарате «DU 800 Spectrophotometer» (Beckman Coulter, США), «свободная» фракция меди сыворотки крови – расчетный показатель, вычислялась по формуле: (медь общая сыворотки крови в мкМ/л $\times 63,55$) – (ЦП в мг/л $\times 3$) = («свободная» медь в мкг/л $\div 10$) = «свободная» медь в мкг/дл (<http://www.wilsonsdisease.org/wilson-disease/wilsonsdisease-faqs.php>).

Углубленное исследование системы гемостаза проводилось 70 больным, включало определение количества тромбоцитов, **внутрисосудистой активации тромбоцитов (ВАТ)** и **индуцированной агрегации тромбоцитов**, показателей **плазменно-коагуляционного звена гемостаза**. Определение ВАТ проводили морфофункциональным методом с использованием фазово-контрастного микроскопа по А.С. Шитиковой (1992). Исследование индуцированной агрегации тромбоцитов проводилось по методу Борна на анализаторе агрегации тромбоцитов АТ-02 (НПФ «Медтех», Россия, Санкт-Петербург). В качестве индукторов агрегации использовались: АДФ («НПО РЕНАМ», Москва, Россия) в концентрациях 1 мкМ и 5 мкМ, ристомицин 1,0 мг/мл («CHRONO-PAR Ristocetin», CHRONOLOG, США), коллаген 2 мкг/мл («CHRONO-PAR Collagen», CHRONOLOG, США). Оцениваемые **показатели коагулограммы**: активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), активность фактора Виллебранда (ФВ), активность факторов V, VII, VIII, X, протромбиновый индекс (ПТИ), фибриноген, тромбиновое время (ТВ), антитромбин-III (АТ-III) – определяли на автоматическом коагулометре «ACL-2000» (Instrumental Laboratories, США). Время Хагеман-зависимого лизиса эуглобулиновой фракции плазмы определяли по методике, опубликованной в книге Баркагана З.С. и Момота А.П. «Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза». Содержание D-димера – латексным количественным методом с использованием набора «D-DI TEST» (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Франция).

Для диагностики ГЛД 24 больным до инициации патогенетической терапии (10 мужчин, 14 женщин, средний возраст $25,5 \pm 10,2$ лет) проводили пробу с D-пеницилламином. Для оценки пеницилламин-индуцированной купрурии, суточная доза пеницилламина составила 10-15 мг на кг веса, назначалась в день исследования в два приема с 12-часовым интервалом. Контрольную группу для проведения пробы составили 22 человека (средний возраст $25,6 \pm 4,3$ лет) без заболеваний печени и нарушений обмена меди, не принимающих какую-либо терапию минимум за 14 дней до проведения пробы.

Тяжесть неврологической симптоматики оценивали по **унифицированной шкале оценки тяжести симптомов ГЛД (UWDRS)** (Czlonkowska A., 2007).

Стадию диффузного поражения печени определяли по совокупности лабораторно-инструментальных данных. Цирротическую стадию поражения печени оценивали по шкале Child–Pugh.

Для изучения клинических и лабораторно-инструментальных особенностей ГЛД больные были разделены на группы: с учетом стадии и формы заболевания (висцеральная (29%) и неврологическая (71%) – дрожательная (43%) и дрожательно-ригидная форма (57%); с учетом тяжести поражения печени (хронический гепатит (33%), цирроз (67%): компенсированный – класс А по Child Pugh (70%) или декомпенсированный – класс В, С по Child Pugh (30%); а также проводимой медьэлиминирующей терапии – 40% больных были обследованы до начала патогенетической терапии, из них 17 человек в динамике через год от начала терапии; 60% больных с установленным диагнозом ГЛД и сроками патогенетической терапии более двух лет.

Группу контроля (КГ) составили 98 человек (42 мужчины, 56 женщин) в возрасте от 10 до 56 лет ($31,3 \pm 8,4$ лет), без заболеваний крови и печени, а также каких-либо хронических заболеваний и не имеющих проявлений кровоточивости в анамнезе, не принимавших лекарственных препаратов, влияющих на свертывающую функцию крови и функцию тромбоцитов минимум за 10 дней до исследования; у 30 из которых (средний возраст $26,5 \pm 6,5$ лет) проводилось исследование показателей тромбоцитарного и плазменно-коагуляционного звена гемостаза.

Для изучения особенностей клинических проявлений геморрагического синдрома при ГЛД проводили **анкетирование** среди 75 больных ГЛД, в группе БПНВЭ, а также представителей контрольной группы (КГ). Группу БПНВЭ составил 81 пациент в возрасте от 22 до 67 лет ($46,1 \pm 11,2$ лет): 60 человек с хроническим вирусным гепатитом (В, С), 16 – с аутоиммунными заболеваниями печени (аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз печени) и 5 – с неалкогольной жировой болезнью печени. Анализировали возраст появления, частоту, характер и степень тяжести геморрагических проявлений. Степень тяжести геморрагических проявлений оценивалась по обращению за амбулаторной или стационарной медицинской помощью. Анкета для заполнения респондентами была разработана сотрудниками ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Нарушения менструального цикла (НМЦ) и особенности акушерского анамнеза изучали более детально у 35 женщин с ГЛД (средний возраст $32,4 \pm 11,0$ лет, 14 – с висцеральной стадией заболевания, 21 – с неврологической). Оценивали возраст начала, регулярность и характер менструаций, НМЦ до постановки диагноза ГЛД и динамику НМЦ на фоне медьэлиминирующей терапии, а также акушерский анамнез.

В **экспериментальном исследовании влияния обмена меди на тромбоцитарное звено гемостаза** использовали кровь 32 здоровых добровольцев (20 мужчин и 12 женщин), средний возраст $27,5 \pm 4,4$ лет. Критерии включения в группу экспериментального исследования те же, что и для представителей КГ.

Исследование влияния на тромбоциты сульфата меди (CuSO_4), разведенного в 0,9% растворе NaCl выполняли *in vitro* на тромбоцитарной плазме. О влиянии сульфата меди судили по его способности снижать или повышать, по сравнению контрольным исследованием агрегацию тромбоцитов, индуцированную с помощью АДФ (5 мкМ/л) и коллагена (2 мкг/мл). В качестве контроля использовали 0,9% NaCl, служивший растворителем для CuSO_4 (Контроль 1) и аутологичную бестромбоцитную плазму (Контроль 2).

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы STATISTICA 10. Для систематизации данных применяли факторный анализ с использованием ортогонального вращения матрицы нагрузок Varimax normalized, метод выделения факторов – главные компоненты. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Манифестация ГЛД с признаков поражения печени встречалась наиболее часто (43%), геморрагический синдром, как первый признаки болезни (рецидивирующие носовые, десневые кровотечения, кожный геморрагический синдром), был вторым по частоте встречаемости (30%), в то время как дебют ГЛД с неврологических нарушений отмечался лишь в 16% случаев; доля остальных вариантов дебюта заболевания составила 11%: гемолитический – 6%, психический – 4%, почечный – 1%.

Геморрагический синдром манифестировал в более молодом возрасте ($8,5 \pm 5,4$ лет), затем в порядке увеличения возраста наблюдались признаки поражения печени ($13,8 \pm 10,7$ лет), острый гемолиз ($17,0 \pm 8,4$ лет), психические нарушения ($20,0 \pm 8,7$ лет), признаки поражения почек (23 года), неврологические симптомы, типичные для ГЛД ($26,3 \pm 11,7$ лет). При этом для геморрагического дебюта был характерен наиболее длительный период от появления первых симптомов заболевания до постановки диагноза (от 5 до 27 лет). В случае печеночного варианта манифестации для постановки диагноза требовалось в среднем около 10 лет. Наиболее короткий период от возникновения первых симптомов до момента установления диагноза ГЛД отмечался при неврологиче-

ском дебюте заболевания (в среднем около двух лет). Основные клинические синдромы у больных с различными стадиями ГЛД представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Основные клинические синдромы у больных с неврологической и висцеральной стадией ГЛД на момент постановки диагноза

Клинический синдром, (%)	Неврологическая стадия, N=53	Висцеральная стадия, N=22
Гиперкинетический	81	65
Нарушение речи (дизартрия, дисфония)	79*	18
Мозжечковый	70*	41
Геморрагические проявления	70	78
Астено-вегетативный	62	73
Аффективные расстройства	60*	32
Акинетико-ригидный	55	0
Гиперсаливация	47*	9
Пирамидный	42	45
Головные боли	32	50
Абдоминальные боли	53	21
Отечно-асцитический	11	27
Холестатический	9	23
Эпилептический	4	0

* $p < 0,05$ по сравнению с висцеральной стадией

Ведущими клиническими синдромами при неврологической стадии заболевания были: гиперкинетический, псевдобульбарный (дизартрия смешанного характера – атактическая, гиперкинетическая и гипокинетическая; дисфония), геморрагический и НМЦ у женщин (вторичная олиго и аменорея, меноррагия). Сочетание данных синдромов отмечено у 73% больных с неврологической стадией ГЛД. При висцеральной стадии заболевания наиболее характерным было сочетание геморрагического, астено-вегетативного, гиперкинетического (минимальный дрожательный гиперкинез верхних конечностей) синдромов и НМЦ – отмечалось в 67% случаев.

Ведущие лабораторные синдромы. Наряду с общепризнанными синдромами – нарушения обмена меди (встречались у 91% больных), цитолиза (59%) и холестаза (52%), как при висцеральной, так и при неврологической стадии заболевания, отмечались тромбоцитопения (57%), изменения функциональной активности тромбоцитов (96%), изменения в плазменно-коагуляционном звене гемостаза (в 2/3 случаев). Цитолитический и холестатический (гипербилирубинемия) синдромы встречались чаще ($p=0,04$ и $p=0,03$, соответственно) и были более выражены у больных с висцеральной стадией заболевания. Снижение ПТИ и числа тромбоцитов чаще отмечалось при неврологической стадии ГЛД ($p=0,03$ и $p=0,02$, соответственно).

Показатели обмена меди были типичны для больных ГЛД и представлены на рисунке 1.

При сравнении показателей обмена меди у больных с различными стадиями и формами ГЛД отмечены более выраженная гипоцерулоплазминемия ($p=0,004$) и более высокие значения суточной гиперкупурии ($p=0,0009$) у больных с неврологической стадией ГЛД.

ЦП
(108,8±68,5 мг/л)

Медь общая
(9,9±4,9 мкмоль/л)

Медь мочи
(5,7±6,2 мкмоль/сут)

Медь «свободная»
(24,3±16,8 мкг/дл)

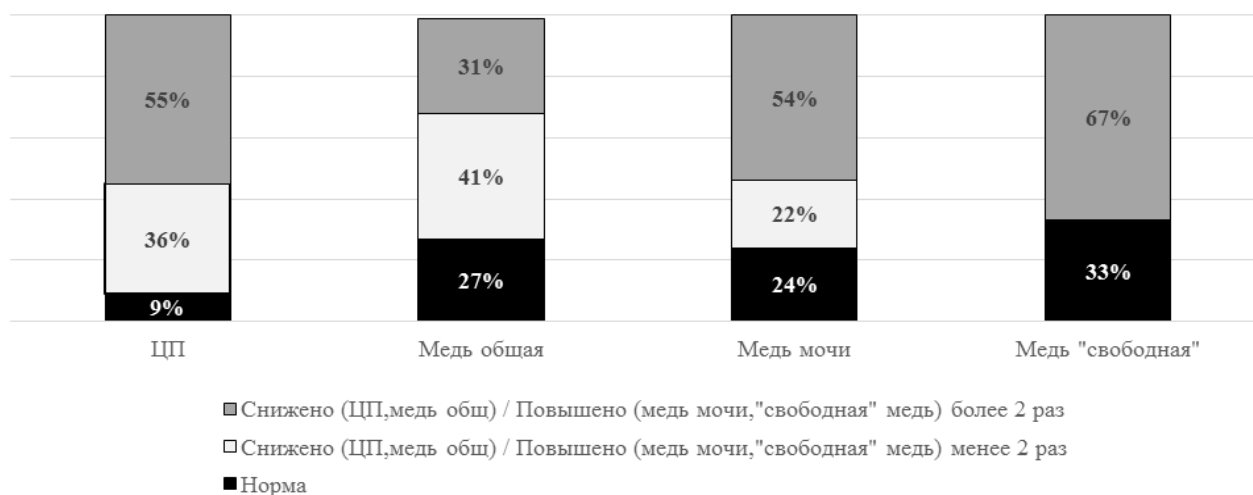


Рисунок 1- Показатели обмена меди у больных ГЛД до начала медьэлиминирующей терапии (N=67, из них 30 человек обследованных до начала патогенетической терапии и 37 человек – катamnестические сведения)

На фоне патогенетической терапии (более 2 лет) у больных уровень «свободной» меди снижался ($p=0,002$), но не достигал референтных значений, сохраняясь повышенным. Также отмечалась тенденция к нарастанию выраженности гипоцерулоплазминемии ($101,6 \pm 76,8$ мг/л), гипокупремии ($7,9 \pm 5,0$ мкмоль/л) и гиперкупурии ($7,3 \pm 5,7$ мкмоль/сут), однако, различий по сравнению с группой больных «до лечения» не выявлено. Пеницилламин-индуцированная купрурия составила $22,0 \pm 14,7$ мкмоль/сут, что превышало значения в группе контроля ($6,8 \pm 7,5$ мкмоль/сут) ($p=0,00003$).

Снижение уровня ЦП менее 100 мг/л является одним из биохимических маркеров ГЛД, имеющих наибольшее диагностическое значение (Ferenci P., et al., 2003), в то время как уровень ЦП более 100 мг/л может быть сомнительным в плане ГЛД и требует других клинико-лабораторных подтверждений болезни. Значимость показателей обмена меди возрастает в случае недостаточного для подтверждения диагноза ГЛД количества баллов (3 и менее) с учетом Лейпцигской количественной шкалы для диагностики ГЛД. В нашем исследовании уровень ЦП выше 100 мг/л выявлен в 45% случаев. В данной группе больных суточная базальная купрурия выше 2N ($>3,2$ мкмоль/сут) наблюдалась в 50% ($7,4 \pm 6,7$ мкмоль/сут), а индуцированная D-пеницилламином выше 5N (>8 мкмоль/сут) – в 100% ($23,0 \pm 15,7$ мкмоль/сут). При этом снижение уровня общей меди крови (<12 мкмоль/л) было в 35% случаев ($12,8 \pm 3,5$ мкмоль/л), а повышение «свободной» ее фракции (>15 мкг/дл) – в 50% ($29,3 \pm 15,0$ мкг/дл). Таким образом, при уровне ЦП >100 мг/л дополнительное диагностическое значение приобретает расчётный показатель «свободной» фракции меди в сыворотке крови, а также уровень базальной и индуцированной в пробе с D-пеницилламином суточной экскреции меди с мочой.

У больных с дрожательно-ригидной формой ГЛД отмечалась более тяжелая неврологическая симптоматика по шкале UWDRS, чаще выявлялись кольца Кайзера-Флейшера, очаговые изменения и признаки атрофии головного мозга с заместительной (преимущественно смешанной) гидроцефалией по данным МРТ по сравнению с больными с висцеральной стадией и дрожательной формой (Рис. 2). У больных с висцеральной стадией отмечался минимальный неврологический дефицит, представленный легкой анизорефлексией с расширением рефлексогенных зон сухожильных и надкостничных рефлексов, легким постуральным дрожательным гиперкинезом паль-

цев кистей, элементами интенционного тремора при выполнении пальце-носовой пробы. Минимальная степень выраженности неврологических симптомов у больных данной группы, их изолированность и непостоянство, а также преобладание симптомов поражения печени, не позволили нам отнести этих пациентов к неврологической стадии заболевания. У больных с висцеральной стадией ГЛД очаговые изменения по данным МРТ головного мозга встречались в 21% и локализовались преимущественно в области базальных ганглиев, случаев стволовой локализации очагов не отмечено, признаки атрофии и смешанной гидроцефалии выявлены в 47% случаев. Корреляции между минимальными неврологическими симптомами и наличием очаговых изменений по данным МРТ головного мозга у больных с висцеральной стадией ГЛД не получено. Клинико-инструментальная характеристика исследуемых групп больных представлена на рисунке 2.

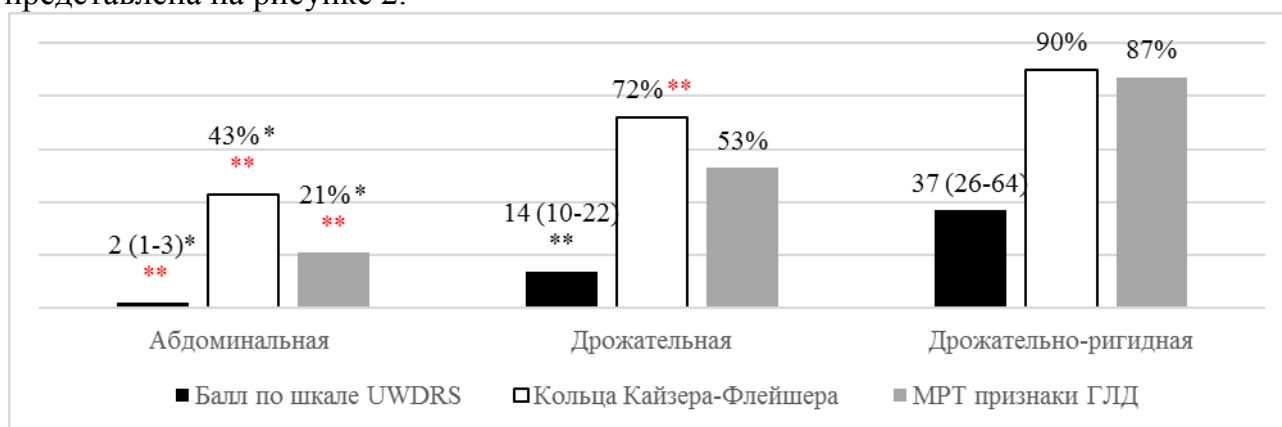


Рисунок 2- Тяжесть неврологических симптомов и инструментальные данные у больных с различными формами ГЛД, * $p < 0,05$ по сравнению с дрожательной формой, ** $p < 0,05$ по сравнению с дрожательно-ригидной формой

При проведении молекулярно-генетического исследования гена АТР7В (проведено у 22 человек), в 68% случаев у больных встречалась мажорная мутация, наиболее распространенная в Европе и России His1069Gln (замена гистидина на глутаминовую кислоту в позиции 1069 белка).

В 78% случаев при проведении биопсии печени (проводилась 13 больным) были выявлены цирротические изменения. Наличие у большей части больных выраженной коагулопатии являлось противопоказанием для проведения данного исследования.

Клинические проявления геморрагического синдрома при ГЛД

Для оценки распространенности и отличительных особенностей геморрагических проявлений среди больных ГЛД было проведено анкетирование. По результатам опроса частота встречаемости геморрагических проявлений у больных ГЛД на момент постановки диагноза составила 73% и была выше, чем в группе больных с БПНВЭ 47% ($p = 0,0024$) и КГ – 27% ($p < 0,0001$). Однако и в группе больных с БПНВЭ частота геморрагических проявлений была существенно выше значений КГ ($p = 0,01$).

Более половины опрошенных больных ГЛД сообщили о тех или иных геморрагических проявлениях в детском возрасте, что оказалось гораздо чаще, чем в КГ и группе БПНВЭ. Преобладающий возраст первых геморрагических проявлений у больных ГЛД был дошкольный (46%) и ранний школьный (43%).

По данным опроса установлено, что микроциркуляторный (капиллярный) тип кровоточивости является основным при ГЛД. Преобладающими в детском возрасте у

больных ГЛД были носовые кровотечения, которые встречались в 84% случаев. На момент постановки диагноза примерно в равной степени отмечались носовые (62%), десневые кровотечения (62%) и кожный геморрагический синдром (56%), которые встречались чаще по сравнению с КГ ($p < 0,001$ для каждого из видов кровоточивости) и группой БПНВЭ ($p < 0,01$ для каждого из видов кровоточивости). Желудочно-кишечные кровотечения у больных ГЛД встречались редко, лишь в 1% случаев.

Анализ менструальных кровотечений у женщин был затруднен и не учитывался в анализе, поскольку около 77% пациенток на момент диагноза имели дис- или аменорею. У 63% женщин отмечена вторичная аменорея продолжительностью более 6 месяцев, у 26% – вторичная олигоменорея, из них в 1/3 случаев наблюдалось сочетание вторичной аменореи и олигоменореи; кроме того, 11% женщин указали на наличие периодически обильных и болезненных менструаций (меноррагия). Треть опрошенных женщин ГЛД сообщали о неблагоприятном акушерском анамнезе, представленном в большинстве случаев бесплодием, повторными самопроизвольными абортами и внутриутробной смертью плода в первом триместре. Восстановление менструального цикла и его регулярность на фоне медьэлиминирующей терапии в течение 1,5 лет от ее инициации наблюдалось в 78 % случаев.

Лабораторные проявления геморрагического синдрома при ГЛД: нарушения в тромбоцитарном звене гемостаза

При исследовании тромбоцитарного звена гемостаза у всех обследованных больных ГЛД по сравнению с КГ на фоне умеренной тромбоцитопении наблюдалось усиление их внутрисосудистой активации – увеличение САФТр и ЧТрВА. Существенное повышение САФТр в крови наблюдалось преимущественно за счет увеличения дискоэхиноцитов (ДЭ), ЧТрВА – нарастания количества малых агрегатов в 1,6 раза (обратимость агрегации).

Таблица 2 - Показатели ВАТ у больных ГЛД до начала патогенетической терапии и на фоне лечения

Показатель		КГ, N=30	До лечения, N=25	На фоне лечения (>2 лет), N=45
Тромбоциты, $1 \times 10^9 / \text{л}$ ($M \pm \sigma$)		248,9 \pm 19,5	144,6 \pm 77,0 *	179,5 \pm 71,6 * #
САФТр, % ($Me \pm q$)		19,5 (13,7-25,3)	31,3 (27,3-40,5) *	32,5 (28,0-38,0) *
ЧТрВА, % ($Me \pm q$)		6,7 (4,9-8,5)	10,8 (8,5-12,5) *	9,6 (8,3-11,5) *
ЧМА ($Me \pm q$)	на 100 сво- бодных тромбоци- тов	3,2 (2,8-3,8)	5,6 (4,6-6,7) *	4,8 (4,2-5,8) *
ЧБА ($Me \pm q$)		0,0 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,2)	0,2 (0,0-0,2)

* – по сравнению с КГ ($p < 0,001$)

– по сравнению с группой больных ГЛД до лечения ($p < 0,05$)

Уровень тромбоцитов у пациентов с неврологической стадией заболевания составил $149 \pm 67,5 \times 10^9 / \text{л}$ был ниже по сравнению с КГ $248,9 \pm 19,5 \times 10^9 / \text{л}$ ($p = 0,0001$) и висцеральной стадией заболевания $204,2 \pm 80,1 \times 10^9 / \text{л}$ ($p = 0,0007$). Форма и стадия заболевания не оказывали существенного влияния на процессы внутрисосудистой активации тромбоцитов. Как при висцеральной, так и при неврологической стадии ГЛД отмечалось существенное повышение показателей ВАТ.

В таблице 2 представлены данные по уровню тромбоцитов и их внутрисосудистой активации у пациентов до начала патогенетической терапии и на фоне лечения.

У больных с впервые установленным диагнозом ГЛД и не получающих медьэлиминирующей терапии наблюдалась умеренная тромбоцитопения и усиление ВАТ. У больных на фоне терапии уровень тромбоцитов был выше по сравнению с первично обследованными больными ГЛД, однако, не достигал значений КГ. Показатели ВАТ в сравниваемых группах не отличались и были выше контрольных значений.

При исследовании индуцированной агрегации тромбоцитов у больных ГЛД по сравнению с КГ на фоне снижения в крови числа тромбоцитов выявлено снижение их агрегации, индуцированной АДФ и усиление агрегации тромбоцитов с ристомидином (Табл. 3).

Таблица 3 - Показатели индуцированной агрегации тромбоцитов у больных ГЛД до начала патогенетической терапии и на фоне лечения (Me±q)

Показатель		Контроль, N=30	До лечения, N=25	На фоне лечения, N=45
АДФ 1 мкМ	Скор. на 30-й сек, %/мин	19,7 (15,4-25,6)	10,0 (3,1-18,7) *	12,0 (5,4-16,0) *
	Макс. Амплитуда, %	17,7 (14,1-22,5)	8,8 (3,3-17,5) *	9,9 (4,1-13,8) *
АДФ 5 мкМ	I волна	Скор. на 30-й сек, %/мин	34,2 (30,2-37,0)	21,4 (15,4-33,9) *
		Макс. Амплитуда, %	31,1 (29,1-32,3)	24,5 (20,4-31,3) *
	II волна	Скор. на 30-й сек, %/мин	21,0 (18,6-23,2)	5,3 (0,0-20,8) *
		Макс. Амплитуда, %	17,3 (14,1-21,0)	3,5 (0,0-17,0) *
Ристомидин 1,0 мг/мл	I волна	Скор. на 30-й сек, %/мин	21,0 (15,5-29,6)	18,8 (15,5-34,4)
		Макс. Амплитуда, %	30,5 (26,7-34,1)	35,6 (29,3-41,9) *
	II волна	Скор. на 30-й сек, %/мин	30,4 (22,2-37,6)	27,7 (19,9-39,4)
		Макс. Амплитуда, %	41,9 (34,9-47,7)	36,1 (27,8-49,4)
Коллаген 2 мкг/мл	Скор. на 30-й сек, %/мин	12,8 (11,2-15,9)	8,2 (4,1-18,9)	10,6 (5,6-22,9)
	Макс. Амплитуда, %	44,6 (39,3-49,6)	33,8 (11,9-59,8)	54,9 (19,2-64,9)

* – по сравнению с КГ (p<0,01)

Агрегация кровяных пластинок, индуцированная коллагеном, у больных ГЛД как с висцеральной, так и с неврологической стадиями не менялась по сравнению с показателями КГ. Независимо от стадии заболевания наблюдалось уменьшение агрегации тромбоцитов, индуцированной пороговой дозой АДФ (1 мкМ), при увеличении концентрации индуктора снижение показателей агрегации было выявлено только у больных с неврологической стадией заболевания. Увеличение максимальной амплитуды I волны агрегации, индуцированной ристомидином (1,0 мг/мл), было особенно значимо в группе

больных с неврологической стадией ГЛД и коррелировало с нарастанием активности ФВ ($R=0,3$), уровень которого при ГЛД повышен.

Угнетение АДФ-индуцированной агрегации у больных ГЛД возможно связано с воздействием «свободной» (токсичной) фракции меди на аденозинфосфорные рецепторы на мембране тромбоцитов (P2Y₁₂), их качественным или количественным изменением. Наличие повышенной ВАТ у больных ГЛД приводит к уменьшению числа диско-видных форм тромбоцитов, способных реагировать на действие индуктора. Кроме того, повышение ВАТ приводит к выделению содержимого плотных гранул хранения тромбоцитов, в частности АДФ, что может также приводить к снижению чувствительности рецепторов кровяных пластинок на экзогенный индуктор. Более выраженные нарушения АДФ-индуцированной агрегации (как с минимальной, так и с максимальной дозами агониста) при неврологической стадии ГЛД возможно объясняются более выраженными нарушениями обмена меди и длительностью течения заболевания.

На фоне патогенетического лечения отмечалось восстановление до уровня референтных значений показателей агрегации тромбоцитов индуцированной ристомидином и оптимальной дозой АДФ (5 мкМ), однако, при индукции пороговой дозой АДФ (1 мкМ) нарушения сохранялись (Табл. 3).

Лабораторные проявления геморрагического синдрома при ГЛД: нарушения в плазменном звене гемостаза у больных ГЛД

У больных с впервые установленным диагнозом ГЛД по сравнению с КГ выявлены разнонаправленные изменения в плазменно-коагуляционном звене гемостаза: в сторону гипокоагуляции – удлинение АПТВ, снижение ПТИ за счет снижения активности факторов V, VII и X, удлинение ТВ, повышение уровня D-димера у 82% больных; в сторону гиперкоагуляции – увеличение активности фактора VIII и ФВ.

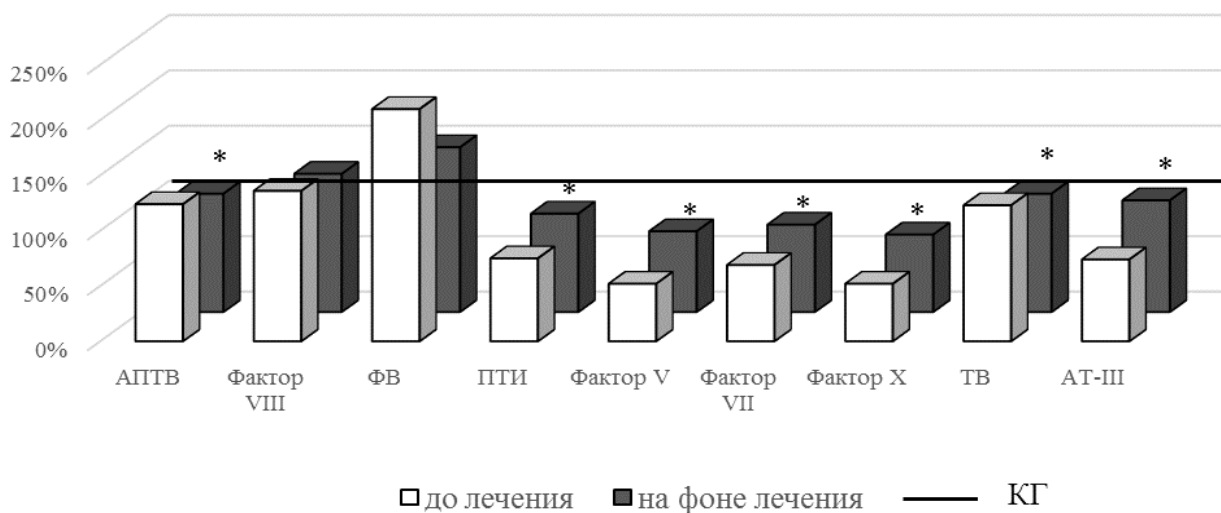


Рисунок 3 - Показатели плазменно-коагуляционного звена гемостаза при ГЛД до лечения и на фоне терапии, * $p<0,05$ – по сравнению с КГ

На рисунке 3 представлены показатели плазменно-коагуляционного звена гемостаза у больных ГЛД на момент постановки диагноза и на фоне проводимой медьэлиминирующей терапии; для наглядности значения контрольной группы взяты за 100%, а исследуемые показатели указаны относительно значений контроля.

На фоне терапии отмечалась нормализация таких показателей коагулограммы как активность факторов V, VII и X, ТВ, уровень АТ-III; уменьшалось содержание D-димера

($p=0,04$) (Рис. 3). Для больных с неврологической стадией заболевания были характерны более грубые нарушения в плазменно-коагуляционном звене гемостаза за счет нарастания гипокоагуляционных изменений: удлинения АПТВ, снижения активности VII фактора, удлинения ТВ, снижения активности АТ-III. У больных с висцеральной стадией ГЛД отмечалось снижение ПТИ за счет X фактора, повышение ФВ и VIII фактора.

Влияние тяжести поражения печени на основные клинико-лабораторные синдромы

Влияние тяжести поражения печени на лабораторные проявления ГЛД

Основные лабораторные показатели при различной степени тяжести поражения печени больных с впервые установленным диагнозом ГЛД представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Влияние тяжести поражения печени на ведущие лабораторные показатели при ГЛД

Показатель		Референтные значения / КГ	Хронический гепатит (ХГ)	Цирроз (Ц)	
Биохимические показатели					
Церулоплазмин, (мг/л)		200-450	131,1±88,6 *	86,3±55,2 * #	
Медь общая (мкМ/л)		12,6-24,4	11,7±5,6 *	8,8±4,1 * #	
Свободная фракция меди (мкг/дл)		5-15	25,1±19,4 *	23,8±15,3 *	
АЛТ, Ед/л		5-42	40,3±63,6	62,6±103,8 *	
АСТ, Ед/л		5-42	41,5±34,8	67,1±90,0 *	
Билирубин общий, мкМ/л		3,4-19	19,6±14,9	24,3±15,4 *	
Альбумин, г/л		34-48	41,6±3,2	35,3±5,9 * #	
Показатели функциональной активности тромбоцитов					
АДФ 1 мкМ	Скор. на 30-й сек, %/мин	19,7 (15,4-25,6)	7,2 (1,4-28,8) *	12,2 (3,4-18,0) *	
	Макс. Амплитуда, %	17,7 (14,1-22,5)	7,5 (2,6-20,1) *	9,6 (3,4-16,8) *	
АДФ 5 мкМ	I волна	Скор. на 30-й сек, %/мин	34,2 (30,2-37,0)	27,4 (15,8-34,2)	
		Макс. Амплитуда, %	31,1 (29,1-32,3)	23,4 (21,8-32,1)	
	II волна	Скор. на 30-й сек, %/мин	21,0 (18,6-23,2)	21,5 (0,0-27,8)	0,0 (0,0-16,6)*
		Макс. Амплитуда, %	17,3 (14,1-21,0)	16,0 (0,0-25,0)	0,0 (0,0-14,3)*
Концентрация и формы тромбоцитов					
Тромбоциты, 1×10^9/л		248,9±19,5	228,3±63,3	112,7±55,0 * #	
САФТр, % (Ме±q)		19,5 (13,7-25,3)	29,5 (23,0-32,0) *	32,5 (28,5-45,0) *	
СТрВА, % (Ме±q)		6,7 (4,9-8,5)	8,1 (5,3-10,9)	11,3 (9,1-13,7) *#	
Показатели коагуляционного звена гемостаза					
Активность фактора Виллебранда, %		94,0 (84,0-110,0)	108,5 (100,0-135,0)*	205 (190-260) * #	
ПТИ, %		97,0 (93,0-110,0)	94,0 (88,0-101,0)	71,0 (54,0-79,0)* #	
Антитромбин-III, %		90,5 (86,5-93,0)	86,0 (71,0-115,0)	67,0 (54,0-89,0)* #	

*– по сравнению с КГ ($p < 0,05$)

– по сравнению с группой хронического гепатита ($p < 0,05$)

Для показателей обмена меди и биохимических показателей N ХГ – 25, Ц – 42, для гемостазиологических показателей N ХГ – 9, N Ц – 16.

Из таблицы видно, что тяжесть поражения печени является одним из ведущих факторов в развитии основных лабораторных синдромов при ГЛД: цитолитического, холестатического, печеночно-клеточной недостаточности. Изменения плазменно-коагуляционного звена свидетельствуют о наличии у больных на цирротической стадии смешанной коагулопатии, обусловленной как значительным снижением синтетической функции печени, так и вероятным развитием коагулопатии потребления. Нарушения тромбоцитарно-сосудистого гемостаза выходят на первый план в случае развития клинических проявлений геморрагического синдрома на ранних стадиях поражения печени при ГЛД.

Влияние тяжести поражения печени

на клинические проявления геморрагического синдрома

Больные с циррозом печени как «вильсоновской», так и «невильсоновской» этиологии существенно чаще отмечали наличие геморрагических проявлений по сравнению с больными на доцирротической стадии поражения печени ($p = 0,02$ и $p = 0,04$, соответственно). У больных ГЛД на доцирротической стадии геморрагические проявления отмечались в 56% случаев, что было выше контрольных значений ($p = 0,008$), тогда как при БПНВЭ подобной закономерности выявлено не было. Пациенты с циррозом печени «вильсоновской» этиологии чаще отмечали наличие у них клинических проявлений геморрагического синдрома по сравнению с пациентами с «невильсоновским» циррозом ($p = 0,003$).

Интересно, что только для кожного геморрагического синдрома у больных ГЛД получена зависимость от тяжести поражения печени ($p = 0,01$); указания на другие геморрагические проявления встречались одинаково часто у пациентов с различной степенью поражения печени.

Динамика основных лабораторно-инструментальных параметров у 17 больных ГЛД на фоне проводимой медьэлиминирующей терапии

Через год от начала адекватной медьэлиминирующей терапии у больных ГЛД наблюдалось улучшение неврологического и соматического статуса, нормализация основных лабораторных показателей: существенно уменьшался неврологический дефицит по унифицированной шкале тяжести симптомов ГЛД ($p = 0,03$); сокращалось число декомпенсированных форм цирроза печени ($p = 0,001$); наблюдалась регрессия цитолитического (нормализация АЛТ ($p = 0,0022$) и АСТ ($p = 0,0071$), холестатического (нормализация уровня общего билирубина ($p = 0,03$)) синдромов, синдрома печеночно-клеточной недостаточности (повышение уровня альбумина ($p = 0,05$)). Отмечалась нормализация основного показателя коагулограммы: ПТИ (за счет V и X факторов, синтезирующихся в печени). В динамике на фоне проводимого лечения происходило изменение показателей обмена меди: нарастала гипокупремия ($p = 0,0041$) и снижался уровень «свободной» фракции меди сыворотки крови ($p = 0,0074$).

У большей части больных на фоне проводимого лечения при наличии положительной динамики неврологического статуса, лабораторно-инструментальных параметров функционального состояния печени и показателей плазменного гемостаза, со-

хранялись нарушения в его тромбоцитарном звене. Уровень тромбоцитов через год от начала проводимого лечения оставался сниженным; показатели ВАТ оставались повышенными; отмечалась нормализация лишь одного параметра индуцированной агрегации тромбоцитов – скорости I волны агрегации с АДФ в оптимальной концентрации (5 мкМ) ($p=0,05$).

Связь между нарушением обмена меди и изменениями в системе гемостаза у больных ГЛД

Для систематизации факторов, определяющих тяжесть заболевания, был проведен факторный анализ, с помощью которого выделено 3 ведущих фактора, вклад в общую дисперсию которых составил 35%, 30% и 19%, соответственно. В фактор 1 вошли показатели, определяющие тяжесть поражения печени: ПТИ, альбумин, общий билирубин (определяющим показателем является общий билирубин, коэффициент корреляции которого с фактором составил 0,92); в фактор 2 вошли показатели, отражающие изменения тромбоцитарного звена гемостаза (определяющим параметром является САФТр, $R=0,93$); в фактор 3 – нарушения обмена меди (определяющий показатель уровень ЦП, $R=0,97$).

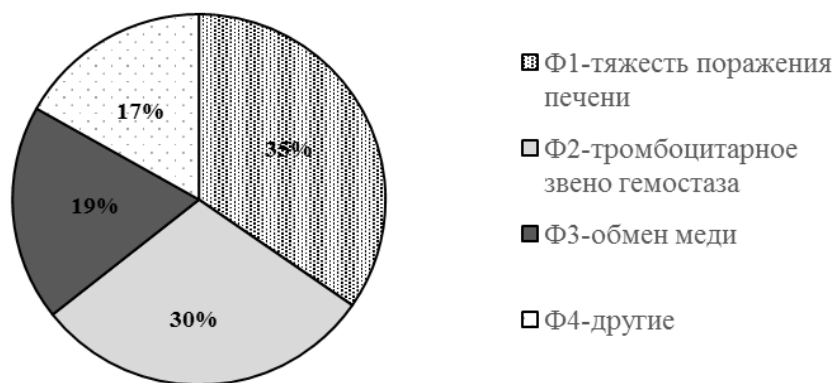


Рисунок 4 - Структура факторов, определяющих тяжесть течения ГЛД

Таким образом, нарушения тромбоцитарного гемостаза, а именно изменения морфофункциональной активности тромбоцитов выделены в отдельный самостоятельный фактор, влияющий на тяжесть течения ГЛД.

Было выдвинуто предположение о влиянии показателей обмена меди на морфофункциональные нарушения тромбоцитов.

Для подтверждения данной гипотезы было проведено вычисление коэффициента корреляции по Спирмену и двухфакторный дисперсионный анализ, где первый фактор – проводимая терапия (два уровня – проводилась, не проводилась), второй – выраженность нарушений обмена меди (три уровня для ЦП – норма, снижение до 100 мг/мл, снижение более 100 мг/мл; два уровня для «свободной» фракции меди – умеренно повышена (до 50%) и значительно повышена (>50%).

Также для проверки гипотезы о влиянии показателей обмена меди на морфофункциональные свойства тромбоцитов был проведен эксперимент с добавлением сульфата меди (CuSO_4) к крови здоровых доноров и оценкой показателей индуцированной агрегации тромбоцитов с АДФ и коллагеном.

При проведении корреляционного анализа у больных ГЛД выявлена прямая связь средней силы уровня ЦП с количеством тромбоцитов ($R=0,6$) и скоростью I волны агрега-

ции с АДФ (1 мкМ) ($R=0,5$), а также обратная связь средней силы уровня ЦП с САФТр ($R= -0,6$). Также оказалось, что в группе больных до инициации медьэлиминирующей терапии с уровнем ЦП в пределах референтных значений концентрация тромбоцитов не отличалась от показателей КГ. Однако при снижении уровня ЦП, также, как и при нарастании уровня «свободной» фракции меди в крови у больных ГЛД наблюдалось уменьшение количества кровяных пластинок, усиление их внутрисосудистой активации и угнетение агрегации, индуцированной АДФ в дозе 1 мкМ и 5 мкМ по сравнению с КГ. При этом по тяжести поражения печени больные в группах не отличались.

При оценке показателей коллаген-индуцированной агрегации у больных ГЛД обратил на себя внимание большой разброс значений показателей, в связи с чем больные были разделены на 3 группы: с пониженными значениями максимальной амплитуды и скорости, с нормальными и повышенными значениями максимальной амплитуды и скорости. При проведении двухфакторного дисперсионного анализа (1 фактор – группа, 2 фактор – уровень «свободной» меди) оказалось, что нарастание концентрации «свободной» меди в крови сначала приводит к усилению агрегационной способности тромбоцитов при добавлении в качестве индуктора коллагена, а затем к ее снижению (Рисунок 5). Столь разнонаправленные изменения можно объяснить действием малых (стимуляция эффектов) и больших (ингибирование эффектов) доз «окислителя» на функциональную активность клеток крови при окислительном стрессе (Соколовский В.В., 2008).

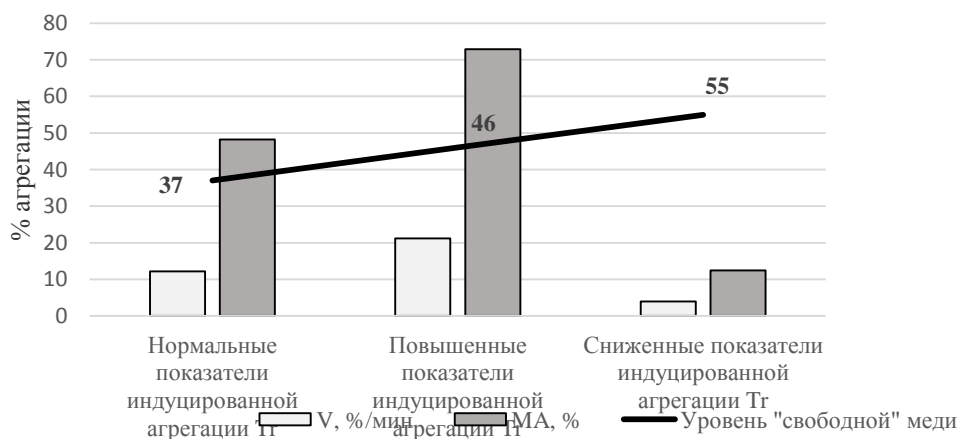


Рисунок 5- Показатели коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов в группах больных с различным уровнем «свободной» меди. МА – максимальная амплитуда и V – начальная скорость агрегации тромбоцитов

В экспериментальной модели мы выявили ингибирующее влияние «свободной» фракции меди на индуцированную агрегацию тромбоцитов с оптимальной дозой АДФ и коллагеном (Рисунок 6).

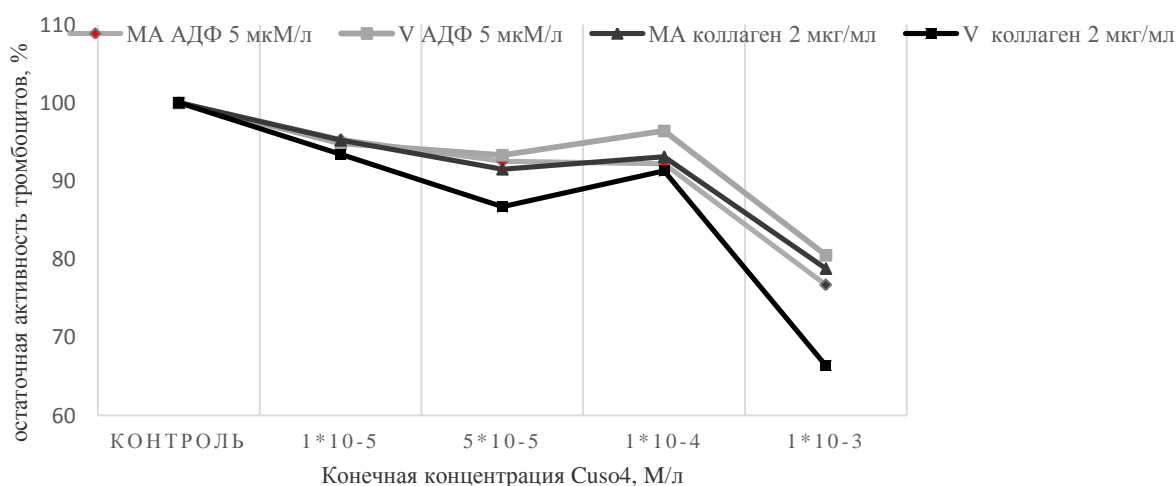


Рисунок 6 - Влияние различных концентраций CuSO_4 на максимальную амплитуду (МА) и начальную скорость агрегации (V) тромбоцитов

Таким образом, в эксперименте *in vitro* удалось подтвердить выявленные у больных ГЛД *in vivo* нарушения индуцированной агрегации тромбоцитов. Полученные экспериментальные данные являются еще одним доказательством влияния нарушений обмена меди на функциональную активность тромбоцитов.

ВЫВОДЫ

1. При неврологической стадии ГЛД в 73% случаев у больных отмечается сочетание геморрагического, псевдобульбарного (дизартрия, дисфония), гиперкинетического синдромов и нарушений менструального цикла. Сочетание геморрагического, астено-вегетативного, гиперкинетического, цитолитического синдромов и нарушений менструального цикла в 65% случаев отмечено при висцеральной стадии ГЛД. Стадия ГЛД не определяет характер геморрагических проявлений.
2. Геморрагический синдром при ГЛД представлен капиллярным типом (85%) – петехиально-пятнистыми кровоизлияниями в кожу, слизистые оболочки, кровотечениями из слизистой носа, десен с ежедневной или еженедельной частотой эпизодов. В 55% случаев геморрагические проявления дебютируют в возрасте до 12 лет. Тяжесть поражения печени является фактором, влияющим на частоту встречаемости геморрагических проявлений и развитие смешанного (капиллярно-гематомного) типа кровоточивости при ГЛД.
3. У больных ГЛД на фоне умеренного снижения количества тромбоцитов ($p=0,0001$) наблюдается усиление процессов внутрисосудистой активации кровяных пластинок (увеличение САФТр ($p=0,0001$) и ЧТрВА ($p=0,0001$) и снижение их индуцированной агрегации ($p<0,01$). Гипокоагуляционные изменения, характеризуются снижением протромбинового индекса за счет снижения активности факторов V, VII, X ($p<0,05$). Наряду с этим отмечено снижение активности антитромбина-III ($p=0,05$) и повышение уровня D-димера ($p=0,01$), что может быть свидетельством разнонаправленных нарушений в системе гемостаза при ГЛД.
4. Снижение уровня церулоплазмينا и повышение «свободной» фракции меди в крови являются факторами, способствующими развитию тромбоцитопении, повышению внутрисосудистой активации тромбоцитов у больных ГЛД. Хроническая интоксикация медью приводит к развитию коагулопатии за счет снижения синтеза в печени факторов свертывания.

5. На фоне медьэлиминирующей терапии у больных ГЛД несмотря на наличие положительной динамики неврологического статуса ($p=0,03$), лабораторных параметров и данных инструментальных исследований морфофункционального состояния печени, а также показателей плазменно-коагуляционного звена гемостаза, сохраняются нарушения морфологии и функции тромбоцитов.
6. В эксперименте установлено выраженное ($>50\%$) ингибирующее влияние CuSO_4 на индуцированную агрегацию тромбоцитов в плазме здоровых лиц.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При проведении дифференциального диагноза ГЛД сочетание геморрагического, псевдобульбарного (дизартрия, дисфония), гиперкинетического синдромов и нарушений менструального цикла у больных с неврологическими проявлениями болезни, и сочетание геморрагического, астено-вегетативного, гиперкинетического, цитолитического синдромов и нарушений менструального цикла у больных с изолированным поражением печени должно рассматриваться в пользу «вильсоновской» этиологии заболевания.

Всем пациентам с подозрением на висцеральную стадию ГЛД должен быть рекомендован осмотр невролога и МРТ головного мозга.

Наличие геморрагических проявлений с ежедневной и еженедельной периодичностью, анамнестические указания на возникновение геморрагических эпизодов в детском возрасте должны рассматриваться как малый диагностический критерий в пользу «вильсоновской» этиологии заболевания.

При постановке диагноза ГЛД комплексное обследование должно включать помимо стандартных лабораторно-инструментальных методов, анкетирование для оценки клинических проявлений геморрагического синдрома и расширенное гемостазиологическое исследование, включающее при хроническом гепатите показатели АДФ-индуцированной агрегации и ВАТ, а также определение ПТИ, ФВ, D-димера; при цирротической стадии поражения печени – показатели АДФ-индуцированной агрегации, ВАТ, а также АПТВ, ПТИ (V, VII и X факторы), ФВ, АТ-III, ТВ, D-димер. Рекомендуемые показатели целесообразно использовать при оценке тяжести и динамики течения заболевания на фоне проводимой медьэлиминирующей терапии, а также для разработки методов коррекции тромбоцитарного звена гемостаза.

При проведении дифференциального диагноза ГЛД при выявлении в крови ЦП более 100 мг/л необходимо учитывать уровень базальной экскреции меди с мочой более 2,1 мкмоль/сут, D-пеницилламин индуцированной – более 10 мкмоль/сут, «свободной» фракции меди более 19 мкг/дл.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мельникова М.Ю. Анализ заболеваемости болезни Вильсона-Коновалова по данным клиники неврологии СПбГМА им. И.И. Мечникова за 1995-2005 гг. // Материалы 79-ой конференции Студенческого Научного Общества СПбГМА им. И.И. Мечникова «Человек и его здоровье – 2006». – СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2006. – С. 235-237.
2. Федорова Т.Ф., Виноградова Л.Ю., Мельникова М.Ю. Госпитализированная заболеваемость гепатоцеребральной дегенерацией по данным клиники неврологии СПбГМА им. И.И. Мечникова за 1995-2005 гг. // Состояние окружающей среды и здоровье населения Северо-Западного региона. – СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2006. – С. 197-198.

3. Мельникова М.Ю. Полиморфизм генов системы детоксикации ксенобиотиков у больных гепатоцеребральной дегенерацией // *Материалы 80-ой конференции Студенческого Научного Общества СПбГМА им. И.И. Мечникова. «Человек и его здоровье – 2007».* – СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2007. – С. 140-141.
4. Мельникова М.Ю., Федорова Т.Ф. Полиморфизм генов системы детоксикации ксенобиотиков у больных гепатоцеребральной дегенерацией // *Всероссийская Юбилейная научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы психиатрии и неврологии».* Материалы конференции. – СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2007. – С. 244.
5. Melnikova M., Fedorova T. Polymorphism in genes of the system of xenobiotic detoxification among patients with Wilson's disease // *Abstract of 21-st International Medical Sciences Student Congress.* – 2008. – P. 98.
6. Федорова Т.Ф., Мельникова М.Ю., Виноградова Л.Ю., Зиновьева Е.Н., Дмитриева А.Р., Тарковская Л.Р., Папаян Л.П. Влияние нарушений обмена меди на внутрисосудистую активацию тромбоцитов у больных гепатоцеребральной дистрофией // *Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии.* – 2008. – № 4. – С. 88-91.
7. Федорова Т.Ф., Мельникова М.Ю., Виноградова Л.Ю., Матвиенко О.Ю., Тарковская Л.Р. Влияние нарушений обмена меди у больных гепатоцеребральной дистрофией на внутрисосудистую активацию тромбоцитов // *Материалы научно-практической конференции «Исследования и разработки по приоритетным направлениям в медицине».* – СПб: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2008. – С. 253-254.
8. Федорова Т.Ф., Виноградова Л.Ю., Мельникова М.Ю. Роль стволовых структур в развитии вегетативной дисфункции у больных гепатоцеребральной дистрофией // *Исследования и разработки по приоритетным направлениям в медицине.* – СПб: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2009. – С. 244-246.
9. Лобзин С.В., Федорова Т.Ф., Мельникова М.Ю., Панина Е.Б., Райхельсон К.Л., Хубларова Л.А. Пеницилламининдуцированная купрурия при заболеваниях печени вильсоновской и не «вильсоновской» этиологии // *Материалы X Всероссийского съезда неврологов с международным участием.* – Н.Новгород, 2012. – С. 337-338.
10. Melnikova M.Y., Lobzin S.V., Fedorova T.F., Panina E.B., Vedyukova L.P., Sisoeva G.I., Tarkovskaya L.R., Morozova T.V. Intravascular platelet activation in patients with hepatolenticular degeneration // *European journal of Neurology.* – 2012. – Vol. 19, suppl. 1. – P. 319.
11. Мельникова М.Ю., Федорова Т.Ф., Лобзин С.В., Александров М.В., Ключева Е.Г., Панина Е.Б., Тарковская Л.Р., Морозова Т.В. Распространенность геморрагических проявлений у больных гепатолентикулярной дегенерацией // *11-ая Школа выходного дня для неврологов Санкт-Петербурга и Северо-Западного Федерального Округа РФ «Инновации в клинической неврологии – 2013».*
12. Макарова В.А., Федорова Т.Ф., Александров М.В., Ключева Е.Г., Голдобин В.В., Мельникова М.Ю. Гепатолентикулярная дегенерация // *Клиническая неврология. Опыт, достижения, перспективы: материалы;* СПб. – 2013. – С. 36-44.
13. Мельникова М.Ю., Федорова Т.Ф., Лобзин С.В., Некрасова А.С., Райхельсон К.Л. Клинические проявления геморрагического синдрома у больных гепатолентикулярной дегенерацией // *Вестник гематологии.* – 2013. – Т. IX. – №4. – С. 47.
14. Melnikova M.Y., Fedorova, Lobzin S.V., Panina E.B., Raikhelson K.L., Tarkovskaya L.R., Silina N.N., Smirnova O.A. Hemorrhagic syndrome in Wilson's disease patients // *Journal of the Neurological Sciences.* – 2013. – Vol. 333, suppl. 1. – P. e105.

15. Melnikova M., Fedorova T., Lobzin S., Panina E., Raikhelson K., Tarkovskaya L., Silina N., Smirnova O., Matvienko O. Clinical and laboratory demonstration of hemorrhagic syndrome in Wilson's disease patients // Abstract book of XX World Congress on Parkinson's disease and Related Disorders. – 2013. – P. 111.
16. Мельникова М.Ю., Федорова Т.Ф., Лобзин С.В., Панина Е.Б. Нарушение менструального цикла и особенности акушерского анамнеза у женщин с гепатолентикулярной дегенерацией // Сборник тезисов Всероссийской ежегодной научно-практической конференции с международным участием «Давиденковские чтения». СПб. – 2014. – С. 158-159.
17. Мельникова М.Ю., Федорова Т.Ф., Лобзин С.В., Панина Е.Б., Стельмах В.В., Некрасова А.С., Тарковская Л.Р., Карпенко М.Н. Геморрагический синдром при гепатолентикулярной дегенерации: клинические особенности // Неврологический журнал. – 2014. – Т. 19. – №6. – С. 23-30.

Список сокращений

АДФ – аденозиндифосфат
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время
АСТ – аспартатаминотрансфераза
АТ-III – антитромбин-III
БПНВЭ – болезни печени невилльсоновской этиологии
ВАТ – внутрисосудистая активация тромбоцитов
ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза
ГЛД – гепатолентикулярная дегенерация
Д – дискоциты
ДЭ – дискоэхиноциты
МА – максимальная амплитуда агрегации
МРТ – магнитно-резонансная томография
НМЦ – нарушения менструального цикла
ПТИ – протромбиновый индекс
С – сфероциты
САФТр – сумма активных форм тромбоцитов
СЭ – сферозхиноциты
ТВ – тромбиновое время
ЦП – церулоплазмин
УЗИ – ультразвуковое исследование
ФГДС – фиброгастроуденоскопия
ЧБА – число больших агрегатов (по 4 и более тромбоцитов)
ЧМА – число малых агрегатов (по 2-3 тромбоцита)
ЧТрВА – число тромбоцитов в агрегатах
ЩФ – щелочная фосфатаза