

УДК 161.155.194:616.98

**Г.Р. ХАСАНОВА<sup>1,2</sup>, Е.Ю. СТЕПАНОВА<sup>2</sup>, И.Г. МУСТАФИН<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Казанский государственный медицинский университет, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49

<sup>2</sup>Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ МЗ РТ, 420097, г. Казань, ул. Вишневого, д. 2а

## Эритропоэтин и анемия хронического заболевания у больных ВИЧ-инфекцией

**Хасанова Гульшат Рашатовна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры детских инфекций врач-инфекционист, тел. (843) 267–80–06, e-mail: gulshatra@mail.ru<sup>1,2</sup>

**Степанова Екатерина Юрьевна** — кандидат медицинских наук, врач-инфекционист со СПИД и ИЗ, тел. (843) 238–17–43, e-mail: katyastep@mail.ru<sup>2</sup>

**Мустафин Ильшат Ганиевич** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Казанского государственного медицинского университета, заведующий лабораторией клинической иммунологии Республиканского центра по профилактике и борьбе со СПИД, тел. (843) 236–28–89, e-mail: ilshat64@mail.ru<sup>1,2</sup>

*Проведена оценка уровня эритропоэтина у больных ВИЧ-инфекцией с анемией хронического заболевания. В исследование включены 98 ВИЧ-инфицированных пациентов (63 — с анемией хронического заболевания (АХЗ) и 35 — с железодефицитной анемией (ЖДА). Определялись уровни эритропоэтина, провоспалительных цитокинов и острофазных белков. Установлены сильные отрицательные корреляции гемоглобина с эритропоэтином не только в группе с ЖДА, но и в группе с АХЗ. Высокие уровни провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли- $\alpha$  и интерлейкина- $1\beta$ ) выявлены в обеих исследуемых группах, что отражает состояние хронической иммунной активации у больных с ВИЧ-инфекцией. Тем не менее в группе АХЗ при сравнении с группой ЖДА выявлены достоверно более высокие показатели острофазных белков — С-реактивного белка и ферритина и относительно низкий уровень отрицательного белка острой фазы — трансферина. Корреляции эритропоэтина с уровнями цитокинов и острофазных белков не установлено. Таким образом, для анемии хронического заболевания на фоне ВИЧ-инфекции характерен адекватный ответ эритропоэтин-продуцирующих клеток на снижение гемоглобина.*

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, анемия, эритропоэтин, воспаление.

**G.R. KHASANOVA, E.Yu. STEPANOVA, I.G. MUSTAFINA**

<sup>1</sup>Kazan State Medical University, 49 Butlerov St., Kazan, Russian Federation, 420012,

<sup>2</sup>Republic Centre for Disease Prevention and Control of AIDS and ID MH of RT, 2a Vishnevsky St., Kazan, Russian Federation, 420097

## Erythropoietin and anemia of chronic disease in HIV-positive patients

**Khasanova G.R.** — Cand. Med. Sc., Associate Professor of the Department of Pediatric Infectious Diseases of Kazan State Medical University, infectious diseases specialist of the Republic Centre for Disease Prevention and Control of AIDS and ID, tel. (843) 267–80–06, e-mail: gulshatra@mail.ru<sup>1,2</sup>

**Stepanova E.Yu.** — Cand. Med. Sc., Infectious Diseases Specialist, tel. (843)238–1743, e-mail: katyastep@mail.ru<sup>2</sup>

**Mustafin I.G.** — D. Med. Sc., Professor, Head of the Biochemistry Department of Kazan State Medical University, Head of the Clinical Immunology Laboratory of the Republic Centre for Disease Prevention and Control of AIDS and ID, tel.: (843) 236–28–89, e-mail: ilshat64@mail.ru<sup>1,2</sup>



*Erythropoietin synthesis is traditionally considered to be decreased in anemia of chronic disease. The purpose of our research was the evaluation of erythropoietin level in HIV-positive patients with anemia of chronic disease. 98 patients were included (63 – with anemia of chronic disease and 35 – with iron-deficiency anemia). The levels of erythropoietin, proinflammatory cytokines and acute-phase proteins were detected. Strong negative correlations of hemoglobin and erythropoietin were found in both groups:  $r=-0,8$ ,  $p=0,00005$  in group with iron-deficiency anemia and  $r=-0,5$ ,  $p=0,0003$  in group with anemia of chronic disease. High levels of proinflammatory cytokines (tumor-necrosis factor- $\alpha$  and interleukin- $1\beta$ ) were found in both groups, representing the state of chronic immune activation in HIV+ patients. Nevertheless, higher levels of acute-phase proteins (C-reactive protein and ferritin) and lower level of negative acute-phase protein – transferrin – were detected in the group with anemia of chronic disease. Correlations of erythropoietin level with levels of cytokines and acute phase proteins were not found.*

*Thus, we can state that adequate response of erythropoietin-producing cells to the decrease of hemoglobin level is characteristic for anemia of chronic disease in HIV-positive patients.*

**Key words:** HIV-infection, anemia, erythropoietin, inflammation

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, более 30% населения Земли страдает от анемии. При этом около 50% всех случаев обусловлено дефицитом железа [1]. Серьезной проблемой у больных с патологией почек, пожилых людей, а также у больных с заболеваниями, ассоциированными с хронической активацией иммунной системы, включая аутоиммунные заболевания, опухоли, сахарный диабет, ВИЧ-инфекцию, является также анемия хронического заболевания (АХЗ) или, иными словами, анемия воспаления [2-4]. В основе развития АХЗ лежит комплексное взаимодействие острофазных белков, цитокинов и клеток иммунной системы, итогом чего является нарушение гомеостаза железа в организме, процессов созревания и гибели эритроцитов и их предшественников [5, 6]. Цитокином, играющим ведущую роль в регуляции эритропоэза, является эритропоэтин (ЭПО) — белок, синтезирующийся в интерстиции почек в ответ на гипоксию [2]. Уровень ЭПО у больных анемией, иного вида, нежели АХЗ, как правило, обратно коррелирует с концентрацией гемоглобина крови. В большинстве исследований, относящихся к АХЗ, такая связь не выявлена [7, 8]. Считается, что это обусловлено ингибирующим влиянием цитокинов, образующихся в избытке в процессе воспаления, на образование ЭПО [9-11].

**Цель исследования** — оценка уровня эритропоэтина у больных ВИЧ-инфекцией с анемией хронического заболевания.

#### **Пациенты и методы**

В исследование включены 98 пациентов с ВИЧ-инфекцией и анемией со снижением коэффициента насыщения трансферрина железом (КНТ) менее 20%, т.е. с дефицитом функционального железа. У всех больных отмечалась норма- или микроцитарная анемия, за исключением пациентов, принимающих зидовудин. Критерием диагностики анемии явилось снижение уровня гемоглобина ниже 130 г/л у мужчин и ниже 120 г/л у женщин.

В соответствии с анамнестическими, клиническими и лабораторными данными все больные были поделены на 2 группы. Первую группу (63 человека) составили пациенты с АХЗ, которая диагностировалась у больных с уровнем ферритина выше 100 нг/мл при отсутствии других причин для развития анемии. У больных с уровнем ферритина от 30 до 100 нг/мл определялась концентрация растворимого рецептора трансферрина и высчитывалось отношение показателя растворимого рецептора трансферрина к логарифму концентрации ферритина. При отношении менее 1 также выставлялся

диагноз АХЗ. В дополнение к ВИЧ-инфекции в данной группе больных 3 пациента страдали от туберкулеза, у части больных наблюдались оппортунистические и другие хронические инфекции (табл. 1). Вторую группу (35 человек) составили больные с железodefицитной анемией (ЖДА). ЖДА диагностировалась при снижении уровня ферритина ниже 30 нг/мл. У всех больных этой группы отмечено также значительное снижение уровня сывороточного железа, повышение общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС), микро- и анизоцитоз эритроцитов. У 9 женщин в анамнезе отмечена гиперменорея, у 3 пациентов — эпизоды кровотечения из желудочно-кишечного тракта. Контрольную группу составили 22 условно здоровых человека.

Материалом для исследования служила сыворотка крови, которая хранилась при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Концентрация С-реактивного белка (С-РБ) определялась латексным иммунотурбидиметрическим тестом (тест-система HORIBA ABX) с использованием биохимического анализатора Pentra400, концентрация сывороточного железа и ОЖСС — биохимическими методами с использованием тест-систем RANDOX. Иммуноферментные тест-системы использовались для определения уровня растворимого рецептора трансферрина (тест-система производства Biovendor), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлейкина- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), ферритина и эритропоэтина (тест-системы производства ЗАО «Вектор-бест»).

Статистический анализ данных проводился при помощи программы STATISTICA 6.0. Поскольку сравниваемые совокупности не подчинялись закону нормального распределения, использовался критерий Манна – Уитни и данные представлялись в виде медианы (Me) и 25-75% квартилей [25-75%]. Для оценки связи между количественными признаками применялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень статистической значимости  $p$  при проведении всех раз- делов исследования считали равным 0,05.

#### **Результаты**

Группы были сопоставимы по возрасту и полу. В группе больных с АХЗ регистрировались более высокие уровни «вирусной нагрузки» и меньшие показатели CD4+ клеток. Уровни гемоглобина в группах статистически не различались. В обеих группах регистрировались довольно низкие показатели сывороточного железа и КНТ, что отражает дефицит функционального железа. Более значительное снижение данных показателей было характерно для группы с ЖДА. В этой же группе выявлены более высокие показатели ОЖСС и низкие уровни

**Таблица 1.**  
**Клинико-лабораторная характеристика пациентов**

	Группы больных		p	Нормативные показатели
	АХЗ Me [25%-75%]	ЖДА Me [25%-75%]		
Количество пациентов	63	35		
Возраст	33 [28-38]	33 [29-37]	>0,05	
Пол, ж/м	31/32	13/12	>0,05	
CD4+ в 1 мкл	230 [130-360]	495 [245-626]	0,001	800-1200
Вирусная нагрузка, Log копий/мл	4,58 [3,46-5,27]	3,72 [2,7-4,28]	0,005	Не определяется
Хронические, в т.ч. оппортунистические, заболевания:	11 (17,4%)	5 (14,3%)	>0,05	
— кандидоз	3 (4,8%)	1 (2,9%)	>0,05	
— туберкулез	3 (4,8%)	-		
— волосистая лейкоплакия языка	5 (7,9%)	2 (5,8%)	>0,05	
— урогенитальные инфекции	29 (46%)	24 (68,6%)	>0,05	
— вирусные гепатиты				
Гемоглобин, г/л	107 [94-114]	96 [77-112]	0,11	120-160 (жен.) 130-180 (муж.)
Сывороточное железо, кМ/л	7,55 [4,95-10,33]	5,57 [2,21-8,93]	0,028	6,6-26,0 (жен.) 10,6-28,3 (муж.)
ОЖСС, мкМ/л	46,95 [37,17-56,51]	55,2 [42,7-61,4]	0,028	48,8-71,6
КНТ, %	0,18 [0,13-0,2]	0,096 [0,05-0,15]	0,00006	20-55
Ферритин, нг/мл	246,1 [66,88-412,5]	5,75 [2,49-11,39]	0,00000	10-150 (жен.) 20-350 (муж.)

p — статистическая значимость различий показателей групп с АХЗ и ЖДА

**Таблица 2.**  
**Показатели эритропоэтина и маркеров воспаления в исследуемых группах**

	АХЗ Me [25-75]	ЖДА Me [25-75]	p	Контрольная группа
Эритропоэтин, МЕ/л	14,62 [7,9-33,29]	25,3 [12,81-130,9]	0,078	4,2-27,0 #
IL-1β, пг/мл	25,09 [4,3-40,49]*	17,01 [0,8-60,43]*	0,997	0,0 [0,0-0,24]
TNF-α, пг/мл	4,21 [0,8-885]*	3,31 [0,12-6,36]*	0,74	0,0 [0,0-0,119]
С-РБ, мг/л	3,54 [0,19-38,26]*	0,66 [0-5,36]	0,04	0,1 [0,0-0,82]
Ферритин, нг/мл	246,1 [66,88-412,5] *	5,75 [2,49-11,39]*	0,00000	71 [48,6-119,8]

p — статистическая значимость различий показателей групп с АХЗ и ЖДА;

\* — статистическая значимость различий с показателями контрольной группы p<0,005;

# — уровень ЭПО в контрольной группе не определялся; использовались референтные показатели

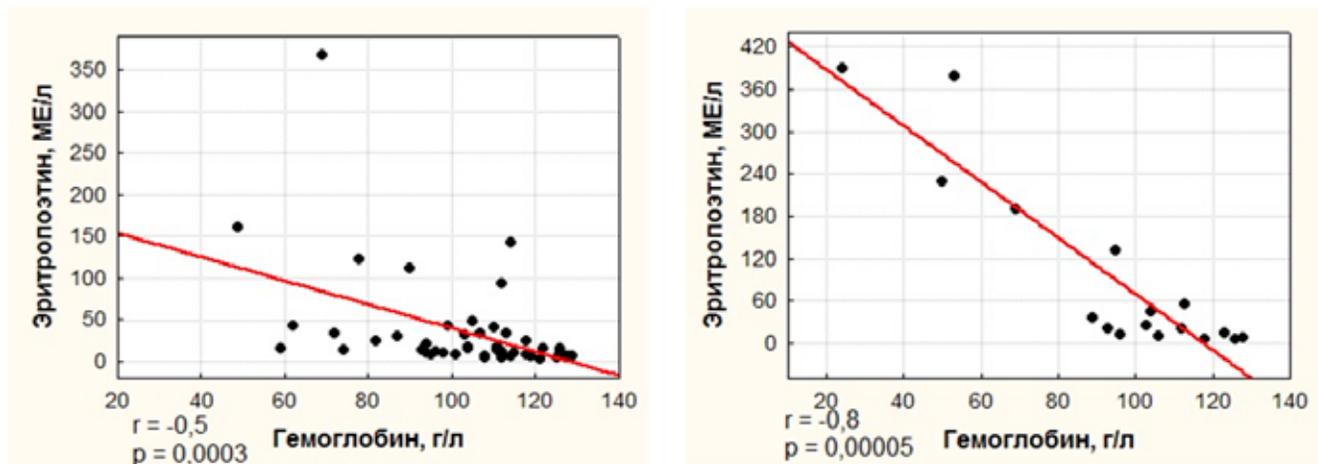
ферритина в сравнении с группой с АХЗ (табл. 1). Таким образом, показатели феррокинетики в группах были типичны для данных двух видов анемии.

Уровень эритропоэтина превышал максимальный референтный показатель (27 МЕ/л) у 15 (23,8%) больных с АХЗ и у 8 (22,9%) больных с ЖДА. У па-

циентов с ЖДА показатели ЭПО были несколько выше, чем у больных с АХЗ (p>0,05) (табл. 2). Установлены сильные отрицательные корреляционные связи гемоглобина с ЭПО не только в группе с ЖДА, но и в группе с АХЗ, хотя для группы ЖДА характерна большая сила связи (рис. 1). Причем выявлен-

Рисунок 1.

Корреляция ЭПО с гемоглобином в группах: АХЗ (левый график) и ЖДА (правый график)



ная зависимость сохранялась и при стратификации больных по тяжести анемии: при тяжелой форме АХЗ (уровень  $Hb < 90$  г/л)  $r = -0,56$ ;  $p = 0,000000$ ; в группе с уровнем  $Hb \geq 90$  г/л —  $r = -0,36$ ;  $p = 0,027$ . Для больных с тяжелой формой ЖДА  $r = -0,9$ ;  $p = 0,037$ ; в группе с уровнем  $Hb \geq 90$  г/л —  $r = -0,46$ ;  $p = 0,038$ .

Статистически значимых корреляций ЭПО с уровнями исследованных цитокинов и острофазных белков не выявлено.

Состояние гиперактивации иммунной системы, как было продемонстрировано ранее, является универсальным феноменом для ВИЧ-инфекции [12, 13]. Этим, по-видимому, объясняется высокий уровень провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ ) у всех больных ВИЧ-инфекцией — не только в группе с АХЗ, но и в группе с ЖДА (табл. 2). Тем не менее в группе АХЗ при сравнении с группой ЖДА выявлены достоверно более высокие показатели острофазных белков — С-РБ и ферритина и относительно низкий уровень ОЖСС, отражающего содержание в крови трансферрина — отрицательного белка острой фазы (табл. 1 и 2).

### Обсуждение

Основные механизмы развития АХЗ включают: 1) уменьшение кишечной абсорбции железа и накопление его в клетках системы фиксированных макрофагов с соответствующим снижением содержания его в крови [3, 7, 14]; 2) снижение продукции ЭПО почками [15]; 3) снижение чувствительности клеток-предшественников к ЭПО и активация апоптоза их в костном мозге [15]; 3) уменьшение продолжительности жизни эритроцитов [2]. Вклад разных компонентов в патогенез анемии, по-видимому, различается у больных с разными хроническими заболеваниями.

Theurl I. с соавт. не выявили значительного повышения ЭПО и корреляции концентрации ЭПО с уровнем гемоглобина у больных с АХЗ на фоне различных хронических воспалительных заболеваний (системные заболевания и хронические бактериальные инфекции) в отличие от больных с ЖДА [7]. Аналогичные данные получены в большинстве исследований, касающихся АХЗ. Данный феномен объясняют подавлением синтеза ЭПО провоспалительными цитокинами [8, 15], что убедительно было продемонстрировано исследованиями на клеточных культурах и в экспериментах

на животных [9-11]. Тем не менее отдельные работы, особенно выполненные в педиатрии, все же демонстрируют повышение синтеза ЭПО в ответ на снижение уровня гемоглобина у больных с АХЗ [16, 17]. Проведенное нами исследование позволило выявить довольно высокие уровни ЭПО, зависящие от уровня гемоглобина, у больных с АХЗ на фоне ВИЧ-инфекции, т.е. наличие хорошего ответа эритропоэтин-продуцирующих клеток на гипоксию, что позволяет предположить, что подавление синтеза ЭПО цитокинами не играет существенной роли в генезе АХЗ при ВИЧ-инфекции. Это в какой-то степени подтверждается и тем, что мы не выявили статистически значимых корреляций ЭПО с уровнями провоспалительных цитокинов. Решающую роль в развитии АХЗ при ВИЧ-инфекции играют, видимо, другие механизмы, в т.ч. цитокин-опосредованное снижение чувствительности клеток костного мозга к ЭПО и активация процессов апоптоза клеток-предшественников эритроцитов.

Эти результаты, на наш взгляд, не противоречат результатам упомянутых выше экспериментальных исследований [9-11] и не отрицают роли отдельно взятых цитокинов. В состоянии хронического воспаления *in vivo* наблюдается повышение продукции и взаимодействие различных цитокинов, хемокинов, острофазных белков. Результаты этого взаимодействия зависят от огромного количества факторов и, естественно, будут отличаться от результатов исследований влияния одиночных цитокинов на эритропоэз и метаболизм железа в эксперименте.

Выявление достаточного уровня продукции ЭПО при АХЗ на фоне ВИЧ-инфекции не является основанием для отказа от использования препаратов рекомбинантного ЭПО для лечения данного состояния, тем более что имеются данные об их эффективности [18]. Данный эффект может быть объяснен тем, что большие дозы ЭПО могут способствовать преодолению цитокин-индуцированной резистентности предшественников эритроцитов к ЭПО.

Интересно то, что рецепторы к эритропоэтину обнаружены также на клетках моноцитарно-макрофагальной системы, вследствие чего ЭПО может демонстрировать и другие биологические эффекты, помимо стимуляции эритропоэза — в частности противовоспалительный эффект. Доказано, что ЭПО блокирует активацию в клетке фактора NF- $\kappa$ Bp65, способствуя снижению выброса та-



ких эффекторных молекул как TNF- $\alpha$  и NO. Видимо, вследствие этого высокие уровни ЭПО ассоциируются с замедлением элиминации возбудителя и со снижением показателей выживаемости больных при сальмонеллезном сепсисе. Напротив, при экспериментальном колите ЭПО демонстрирует протективный эффект за счет подавления воспалительных реакций [19]. Длительные курсы лечения ЭПО у больных с хронической почечной патологией сопровождаются снижением у них уровня TNF- $\alpha$  [20]. Показано также снижение активности воспаления параллельно с увеличением концентрации гемоглобина у больных ревматоидным артритом [21]. С учетом высокой активности воспалительного процесса и иммунной активации, считающихся в наши дни основными факторами прогрессирования ВИЧ-инфекции, ЭПО в перспективе может рассматриваться как средство патогенетической терапии не только анемии, но и самого хронического воспаления у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Таким образом, для больных ВИЧ-инфекцией с анемией хронического заболевания характерен адекватный ответ эритропоэтин-продуцирующих клеток на снижение гемоглобина.

#### ЛИТЕРАТУРА

- McLean E., Cogswell M., Egli I., Wojdyla D. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005 // *Public Health Nutr.* — 2009. — Vol. 12, № 4. — P. 444-54.
- Weiss G., Goodnough L.T. Anemia of chronic disease // *N Engl J Med.* — 2005. — Vol. 352, № 10. — P. 1011-1023.
- Means R.T. Recent developments in the anemia of chronic disease // *Curr Hematol Rep.* — 2003. — Vol. 2. — P. 116-121.
- Cartwright G.E. The anemia of chronic disorders // *Semin Hematol.* — 1966. — Vol. 3. — P. 351-375.
- Cash J.M., Sears D.A. The anemia of chronic disease: spectrum of associated diseases in a series of unselected hospitalized patients // *Am J Med.* — 1989. — Vol. 87. — P. 638.
- Feelders R.A., Vreugdenhil G., Eggermont A.M. et al. Regulation of iron metabolism in the acute-phase response: interferon gamma and tumour necrosis factor alpha induce hypoferraemia, ferritin production and a decrease in circulating transferrin receptors in cancer patients // *Eur J Clin Invest.* — 1998. — Vol. 28. — P. 520-527.
- Theurl I., Mattle V., Seifert M. et al. Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease // *Blood.* — 2006. — Vol. 107, № 10. — P. 4142-4148.
- Miller C.B., Jones R.J., Piantadosi S. et al. Decreased erythropoietin response in patients with anemia of cancer. // *N Engl J Med.* — 1990. — Vol. 322. — P. 1689-1692.
- Faquin W.C., Schneider T.J., Goldberg M.A. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production // *Blood.* — 1992. — Vol. 79. — P. 1987-1994.
- Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production // *J Interferon Cytokine Res.* — 1998. — Vol. 18. — P. 555-559.
- Spivak J.L. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin // *Contrib Nephrol.* — 1989. — Vol. 76. — P. 67-75.
- Deeks S.G. Immune dysfunction, inflammation, and accelerated aging in patients on antiretroviral therapy // *Top HIV Med.* — 2009. — Vol. 17. — P. 118-123.
- Хасанова Г.Р., Биккинина О.И., Акчурина Л.Б. и др. Системный воспалительный ответ и прогрессирование ВИЧ-инфекции // *Вестник современной клинической медицины.* — 2013. — Т. 6, выпуск 3. — С. 21-27.
- Ludwiczek S., Aigner E., Theurl I., Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells // *Blood.* — 2003. — Vol. 101. — P. 4148.
- Papadaki H.A., Kritikos H.D., Gemetzi C. et al. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect // *Blood.* — 2002. — Vol. 99. — P. 1610.
- Cazzola M., Ponchio L., de Benedetti F. et al. Defective iron supply for erythropoiesis and adequate endogenous erythropoietin production in the anemia associated with systemic-onset juvenile chronic arthritis // *Blood.* — 1996. — Vol. 87. — P. 4824-4830.
- Corazza F., Beguin Y., Bergmann P. et al. Anemia in children with cancer is associated with decreased erythropoietic activity and not with inadequate erythropoietin production // *Blood.* — 1998. — Vol. 92. — P. 1793-1798.
- Saag M.S., Bowers P., Leitz G.J. et al. Once-weekly epoetin alfa improves quality of life and increases hemoglobin in anemic HIV+ patients // *AIDS Res Hum Retroviruses.* — 2004. — Vol. 20. — P. 1037.
- Nairz M., Schroll A., Moschen A.R. et al. Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B-inducible immune pathways // *Immunity.* — 2011. — Vol. 34, Issue 1. — P. 61-74.
- Ludwig H., Fritz E., Kotzmann H. et al. Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma // *N Engl J Med.* — 1990. — Vol. 322. — P. 1693-1699.
- Kaltwasser J.P., Kesler U., Gottschalk R. et al. Effect of recombinant human erythropoietin and intravenous iron on anemia and disease activity in rheumatoid arthritis // *J. Rheumatol.* — 2001. — Vol. 28. — P. 2430-2436.

WWW.MFVT.RU