

К патогенезу дисфункции тромбоцитов при уремической интоксикации

М. В. Осиков, В. Ю. Ахматов, Л. В. Кривохижина

Кафедра патологической физиологии ГОУ ВПО Челябинской государственной медицинской академии, отделение диализа ГМЛПУЗ Челябинской областной клинической больницы

Резюме

Исследована функциональная активность тромбоцитов у 25 больных с терминальной ХПН и у 27 нелинейных крыс с уремической интоксикацией. Уремию у крыс индуцировали введением хлорида ртути (II) в дозе 5 мг/кг. Адгезию тромбоцитов исследовали по способности прилипать к эндотелию сосудистой стенки. АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов изучали турбидиметрическим методом по Ворп G.V.R. Установлено угнетение адгезии и агрегации тромбоцитов. Нарушение адгезии тромбоцитов связано с изменением адгезивного потенциала эндотелиоцитов. Креатинин и мочевины не вносят вклада в дисфункцию тромбоцитов при уремии. Показано, что дисфункция тромбоцитов при уремии сопровождается повышением продукции оксида азота (II) в крови и изменением процессов свободно-радикального окисления в тромбоцитах.

Ключевые слова: уремия, тромбоциты, адгезия, агрегация, хемилюминесценция, продукты оксида азота (II).

Введение

Нарушение функции тромбоцитов рассматривают как основную причину кровоточивости у больных с уремией (1, 2). Показано изменение всех компонентов гемостатической функции тромбоцитов: адгезии, агрегации, секреции (3). В разное время доминировали концепции о роли в дисфункции тромбоцитов «уремических токсинов» (4, 5, 6, 7), нарушения синтеза и секреции АДФ, серотонина и других веществ (5, 6, 8, 9), дефектов рецепторного аппарата тромбоцитов (10, 11, 12, 13), нарушения ионного гомеостаза (14) и другие теории. По мнению некоторых авторов и в настоящее время характер и механизм нарушения функции тромбоцитов при уремии требует уточнения (15). Цель работы — исследовать некоторые механизмы дисфункции тромбоцитов в условиях уремической интоксикации.

Методы

Под наблюдением находились 25 больных с терминальной стадией ХПН в возрасте от 21 до 73 лет, из них 12 мужчин и 13 женщин. Все больные получали гемодиализную терапию в отделении диализа ГМЛПУЗ ЧОКБ на аппаратах «А4008Е» («Фрезениус», Германия) 2 раза в неделю сеансами по 5 часов, Кt/v 1,37±0,06. Кровь для исследований брали из артериального колена артерио-венозной фистулы до се-

анса гемодиализа. Группой контроля служили 15 кадровых доноров областной станции переливания крови.

Отдельные исследования выполнены с использованием 27 нелинейных крыс-самцов массой 220–240 г. Все манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с положениями Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, методическими рекомендациями по их выведению из опыта и эвтаназии. Экспериментальные животные были случайным образом разделены на 2 группы: 1 группа — интактные животные, 2 группа — животные с острой уремией. Уремию индуцировали подкожным введением в межлопаточную область водного 10% раствора хлорида ртути (II) в дозе 5 мг/кг (16). Поражение почек верифицировали морфологическими и биохимическими методами, критериями служили некроз клеток канальцев нефрона и статистически значимое увеличение содержания креатинина и мочевины в сыворотке. Исследования проводили на 5 сутки эксперимента — во время наиболее выраженных изменений в почечной ткани и уровня уремических токсинов в сыворотке.

Для изучения роли уремических токсинов в дисфункции тромбоцитов использовали растворы креатинина и мочевины на аутоплазме в концентрациях 30 ммоль/л и 1 ммоль/л соответственно. Эксперименты выполнены в условиях *in vitro* с использованием цельной крови 20 доноров областной станции переливания крови.

М. В. Осиков — к. м. н.;

Л. В. Кривохижина — д. м. н.

Из цельной крови центрифугированием при 150 g и 1200 g получали обогащенную и бедную тромбоцитами плазму соответственно. В рабочей суспензии концентрация тромбоцитов составила 300×10^9 /л. Адгезивную способность тромбоцитов исследовали оригинальным методом по их способности прилипнуть к эндотелию сосудистой стенки. Для этого у наркотизированной крысы пропускали через участок аорты определенной площади фиксированный объем аутологичной крови с известным количеством тромбоцитов под постоянным давлением 100 мм рт. ст. при температуре 37°C и подсчитывали количество клеток на выходе с определением % адгезии тромбоцитов. Агрегацию тромбоцитов исследовали турбидиметрическим методом в аутологичной плазме при температуре 37°C по (17). Для индукции агрегации применяли 1×10^{-6} М раствор АДФ. Регистрировали максимальную амплитуду (МА, %), время агрегации (ВА, мин), скорость агрегации: (СА, %/мин) и аналогичные показатели для 1-й и 2-й волн агрегатограммы. Процессы СРО в тромбоцитах исследовали методом хемилюминесцентного анализа (ХЛ) на приборе «ХЛ-003» (18). Реакционная среда включала 100×10^9 /мл тромбоцитов, люминол в конечной концентрации 1×10^{-6} М. Свечение индуцирова-

ли добавлением 7×10^{-6} М раствора АДФ. ХЛ лейкоцитов исследовали в цельной крови, индуцированное свечение оценивали после адгезии клеток к стеклянной поверхности. Уровень продукции эндогенного оксида азота (II) оценивали по концентрации конечных стабильных метаболитов NO (NO_x) с помощью реакции Griess по методу Емченко Н. Л. (19).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica v. 6.0 for Windows» (20, 21). Для описания результатов использовали М-среднее значение признака, s-среднее квадратичное отклонение, характеристику выборки представляли в формате M(s). Для анализа вида распределения данных применяли критерий Шапиро-Уилка, для проверки равенства дисперсий в группах — критерий Левена. Проверку статистических гипотез в группах в зависимости от вида распределения проводили с использованием параметрических (t-критерий Стьюдента) и непараметрических (U-критерий Манна-Уитни и WW-критерий Вальда-Вольфовитца) критериев. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки связи между показателями использовали методы корреляционного анализа.

Таблица 1. Влияние гемодиализа на показатели агрегации тромбоцитов у больных с уремией

Группы сравнения / показатели	Группа 1, контроль, n=12	Группа 2, уремия, n=25	Значение p
Максимальная амплитуда, %	29,02 (8,52)	18,99 (7,19)	<0,001
Время агрегации, мин	8,09 (1,71)	8,57 (2,66)	>0,05
Скорость агрегации, %/мин	3,62 (0,84)	2,31 (0,87)	<0,001
Амплитуда первой волны, %	24,46 (7,48)	15,29 (5,98)	<0,001
Время первой волны, мин	4,06 (0,67)	3,55 (0,97)	0,048
Скорость первой волны, %/мин	6,07 (1,84)	4,44 (1,92)	0,015
Амплитуда второй волны, %	4,55 (1,32)	3,59 (1,65)	0,046
Время второй волны, мин	4,03 (1,42)	5,02 (2,10)	>0,05
Скорость второй волны, %/мин	1,17 (0,22)	0,78 (0,30)	<0,001

Таблица 2. Влияние уремических токсинов на показатели агрегации тромбоцитов при инкубации с цельной кровью

Группы сравнения / показатели агрегации	Контроль, n=10	Мочевина, n=10	Креатинин, n=10
Максимальная амплитуда, %	16,69 (6,36)	18,60 (10,63)	18,48 (10,62)
Время агрегации, мин	4,88 (1,57)	5,60 (3,06)	5,48 (3,19)
Скорость агрегации, %/мин	3,39 (0,81)	3,49 (1,39)	3,58 (1,18)
Амплитуда 1-ой волны, %	13,52 (5,24)	15,49 (8,36)	15,43 (8,33)
Время 1-ой волны, мин	2,41 (0,75)	2,75 (0,98)	2,69 (1,06)
Скорость 1-ой волны, %/мин	5,67 (1,95)	5,49 (3,08)	5,62 (2,97)
Амплитуда 2-ой волны, %	3,25 (1,71)	3,11 (2,68)	3,05 (2,72)
Время 2-ой волны, мин	2,46 (1,28)	2,86 (2,23)	2,80 (2,29)
Скорость 2-ой волны, %/мин	1,33 (0,27)	1,12 (0,40)	1,18 (0,54)

Таблица 3. Влияние уремических токсинов на показатели агрегации тромбоцитов при инкубации с клетками

Группы сравнения / показатели агрегации	Контроль, n=10	Мочевина, n=10	Креатинин, n=10
Максимальная амплитуда, %	18,86 (6,14)	17,96 (6,70)	18,20 (3,76)
Время агрегации, мин	7,18 (2,48)	6,78 (2,57)	6,20 (1,62)
Скорость агрегации, %/мин	2,75 (0,91)	2,65 (0,93)	2,98 (0,35)
Амплитуда 1-ой волны, %	16,19 (6,54)	15,99 (7,33)	15,01 (3,47)
Время 1-ой волны, мин	3,72 (0,92)	3,51 (0,91)	3,12 (0,82)
Скорость 1-ой волны, %/мин	4,31 (1,17)	4,56 (1,22)	4,86 (0,59)
Амплитуда 2-ой волны, %	2,66 (1,41)	1,96 (1,27)	23,18 (0,86)
Время 2-ой волны, мин	3,47 (1,94)	3,27 (2,01)	3,08 (0,86)
Скорость 2-ой волны, %/мин	0,79 (0,19)	0,59 (0,31)	1,05 (0,20)

Таблица 4. Показатели хемилюминесценции клеток крови у больных с уреемией

Группы сравнения / показатели	Контроль, n=10	Уремия, n=25	Значение p
Спонтанная светимость тромбоцитов, у.е.	0,98 (0,39)	1,42 (1,77)	0,008 (WW)
Амплитуда быстрой вспышки тромбоцитов, у.е.	1,06 (0,44)	1,69 (2,11)	0,008 (WW)
Амплитуда медленной вспышки тромбоцитов, у.е.	2,73 (1,03)	5,19 (5,87)	>0,05
Спонтанная светимость фагоцитов, у.е.хмин/10 ⁵ клеток	21,16 (15,02)	3,44 (3,90)	<0,001
Индукцированная светимость фагоцитов, у.е.хмин/10 ⁵ клеток	110,84 (24,57)	17,95 (10,40)	<0,001

Таблица 5. Содержание продуктов NO в сыворотке у больных с уреемией

Показатели	Контроль, n=15	Уремия, n=20	Значение p
нитриты, мкмоль/л	3,40 (0,65)	5,38 (2,61)	0,035
нитраты, мкмоль/л	11,01 (1,97)	16,99 (5,68)	0,005 (U)
сумма, мкмоль/л	14,39 (2,07)	21,69 (7,47)	0,015 (U)

Результаты

Развитие уремии сопровождается дисфункцией тромбоцитов, что выражается в нарушении адгезивной и агрегационной способности клеток. Установлено снижение адгезии тромбоцитов к эндотелиальной выстилке сосуда. В опытной группе показатель составил 25,15 (5,84)%, в контрольной — 28,20 (8,39)%; $p=0,013$ (WW). Депрессия адгезии тромбоцитов к эндотелию при уремии может быть связана с нарушением функциональной активности тромбоцитов и/или эндотелиальных клеток. Для ответа на поставленный вопрос исследовали, во — первых, адгезивную способность уремических тромбоцитов по отношению к интактному эндотелию (31,86 (5,13)%; в контрольной группе 28,51 (7,67)%; $p>0,05$). Во — вторых, адгезию интактных тромбоцитов к уремическому эндотелию (25,87 (3,71)%; в контрольной группе 29,41 (6,23)%; $p=0,049$ (WW)). Таким образом, показано, что изменение адгезии тромбоцитов при уремии детерминировано изменением функциональной активности эндотелиоцитов, а не тромбоцитов.

Интегральный показатель агрегации тромбоцитов — скорость процесса — уменьшался за счет 1-ой и 2-ой волн агрегации, то есть способности клеток к агрегации на внешний стимул (АДФ) и собственной проагрегантной активности, проявляющейся в ходе реакции высвобождения тромбоцитов (табл. 1).

Установлено, что мочевины и креатинин в условиях *in vitro* не изменяют адгезивную способность тромбоцитов. При инкубации с цельной кровью мочевины адгезивная способность тромбоцитов составила 28,34 (14,68)% ($p>0,05$ при сравнении с показателями в контрольной группе: 32,44 (10,93)%). В аналогичных условиях под влиянием креатинина — 31,25 (5,39)% ($p>0,05$). Кроме этого, мочевины и креатинин при инкубации как с цельной донорской кровью, так и выделенными тромбоцитами статистически значимо не влияют на показатели агрегации тромбоцитов (табл. 2 и 3).

У больных ХПН отмечено усиление процессов СРО в тромбоцитах по показателям ХЛ (табл. 4). Причем, возрастает как спонтанное, так и индуцированное АДФ свечение тромбо-

цитов. Установлено, что в данном случае изменение процессов СРО в тромбоцитах не имеет достоверной корреляции со скоростью агрегации клеток (коэффициент корреляции Пирсона=0,23; $p>0,05$). Отметим, что процессы СРО в тромбоцитах у крыс с уремией подавлены ($p<0,001$). Интегральный показатель свечения клеток - светосумма составляет 1,73 (0,29) у.е., в тоже время у интактных животных — 2,45 (0,26) у.е.

Фагоциты периферической крови не вносят вклад в патогенез дисфункции тромбоцитов, т.к. их функциональная активность по показателям ХЛ подавлена (табл. 4). Базальное и индуцированное свечение лейкоцитов снижается пропорционально примерно в 7 раз по сравнению с контрольной группой. Данный факт свидетельствует об угнетении способности фагоцитов генерировать активные формы кислорода.

Содержание конечных метаболитов NO у больных с уремией увеличивается с заинтересованностью нитритов и нитратов (табл. 5). Установлена отрицательная достоверная корреляция между суммарным содержанием продуктов NO (нитриты+нитраты) и скоростью агрегации тромбоцитов (коэффициент корреляции Пирсона = -0,69; $p=0,009$).

Обсуждение

Полученные данные согласуются с результатами других исследователей гемостаза при уремии. Показано, что дисфункция тромбоцитов при уремии связана с конформационными перестройками гликопротеина IIb-IIIa, что приводит к нарушению связывания тромбоцитов с фибриногеном и тромбоспондином и высвобождению содержимого альфа-гранул, то есть процессов, опосредующих агрегацию клеток (11). Castillo R. et al. установлено, что при перфузии цельной крови больных, а также отмытых тромбоцитов в нормальной плазме и наоборот, нормальных тромбоцитов в плазме больных, показано, что во всех трех случаях адгезия тромбоцитов к субэндотелию снижается (22).

Особый интерес представляют исследования, раскрывающие роль конкретных уремических токсинов в нарушении функции тромбоцитов. По нашим данным, добавление мочевины и креатинина к тромбоцитарной плазме не изменяет функциональную активность тромбоцитов по показателям адгезии и агрегации. Другими исследователями получены убедительные доказательства того, что гуанидиноуксусная кислота, накапливающаяся вследствие усиления метаболизма L-аргинина по альтернативному пути, способна ингибировать агрегацию тромбоцитов. Этот механизм опосредован активацией NO-синтазы в тром-

бocyтах и повышением уровня внутриклеточного NO (23). Результаты собственных исследований позволили зафиксировать повышение концентрации конечных метаболитов NO в сыроворотке. Отметим, что литературные данные по этому вопросу противоречивы. Ряд исследователей фиксируют снижение продукции NO эндотелиоцитами и лейкоцитами и как следствие падение концентрации конечных метаболитов в крови и моче (24). Отметим также и существование прямо противоположной концепции. Так, Noris и Remuzzi в ряде работ указывают, что уремия сопровождается повышением синтеза NO и экспрессии NOS [25].

Установленное несоответствие между показателями агрегации и хемилюминесценции тромбоцитов, вероятно, связано с активацией тромбоцитов во время процедуры гемодиализа. Имеются данные, что во время гемодиализа происходит адгезия тромбоцитов к мембране диализатора и активация клеток (26, 27, 28). В пользу данного предположения свидетельствует факт угнетения процессов СРО в тромбоцитах при экспериментальной уремии.

На данном этапе исследования мы предположили, что активация процессов СРО в тромбоцитах опосредована фагоцитами — основными инициаторами СРО в крови. Однако полученные результаты опровергли это предположение. Результаты других исследователей также свидетельствуют об угнетении функции фагоцитов. Так, Muniz-Junqueira et al. констатируют снижение функции нейтрофилов у больных ХПН до диализа более чем в 10 раз по сравнению с контролем (29). Предположительно, уремические нейтрофилы имеют дефект доставки энергии к НАДФН-оксидазной системе. Реакция нейтрофилов на такие стимуляторы, как формил-метионин-лейцин-фенилаланин, *Staphylococcus aureus*, форболмиристил-ацетат снижена до диализа (30).

Таким образом, результаты проведенного исследования позволили установить угнетение адгезии и агрегации тромбоцитов в условиях уремической интоксикации организма. Креатинин и мочевина не вносят вклада в дисфункцию тромбоцитов при уремии. Снижение адгезии тромбоцитов обусловлено нарушением адгезивной способности эндотелиоцитов. Показано, что дисфункция тромбоцитов при уремии может быть связана с повышением продукции оксида азота (II) и изменением процессов свободно-радикального окисления в тромбоцитах.

Выражение признательности

Авторы выражают признательность за техническую помощь в осуществлении данного исследования к. м. н., старшему преподавателю кафедры патологической физиологии ГОУ ВПО ЧелГМА Макарову Е. В.

Литература

1. Remuzzi G. Bleeding in renal failure. *Lancet* 1988; 8596: 1205-8.
2. Livio M., Benigni A., Remuzzi G. Coagulation abnormalities in uremia. *Semin Nephrol* 1985; 2: 82-90.
3. Kaw D., Malhotra D. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Semin Dial* 2006; 4: 317-22.
4. Evans E. P., Branch R. A., Bloom A. L. A clinical and experimental study of platelet function in chronic renal failure. *J Clin Pat* 1972; 25: 745-53.
5. Di Minno G., Martinez G., McKean M. L., De La Rosa G., Burke G. F., Murphy S. Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis. *Am J Med* 1985; 5: 552-9.
6. Ecnoyan G., Brown C. H. Biochemical abnormalities of platelets in renal failure. Evidence for decreased platelet serotonin, adenosine diphosphate and Mg-dependent adenosine triphosphatase. *Am J Nephrol* 1981; 1: 17-23.
7. Boccardo P., Remuzzi G., Galbusera M. Platelet dysfunction in renal failure. *Semin. Tromb Hemost* 2004; 5: 579-89.
8. Remuzzi G., Benigni A., Dodesini P. et al. Reduced Platelet Thromboxane in uremia. *J Clin Invest* 1983; 71: 762-8.
9. Viachoyannis J., Schoeppe W. Adenylate cyclase activity and cAMP content of human platelet in uremia. *Eur J Clin Invest* 1982; 12: 379-81.
10. Sloan E. M., Sloan J. A., Prodouz K. et al. Reduction of platelet glycoprotein Ib in uremia. *Br J Haematol* 1991; 77: 375-81.
11. Gawaz M. P., Dobos G., Spath M. et al. Impaired function of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 36-46.
12. Moal V., Brunet Ph., Dou L., Morange S., Sampol J., Berland Y. Impaired expression of glycoproteins on resting and stimulated platelets in uremic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1834-41.
13. Ballow A., Gader A. M., Huraib S., Al-Husaini K., Mutwalli A., Al-Wakeel J. Platelet surface receptor activation in patients with chronic renal failure on hemodialysis, peritoneal dialysis and those with successful kidney transplantation. *Platelets* 2005; 16: 19-24.
14. Tepel M., Bauer S., Kegel M., Raffelsiefer A., Wischniowski H., Zidek W. Increased cytosolic free in platelets from patients with early-stage chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 1: 27-34.
15. Brophy D. F., Martin E. J., Carr S. L., Kirschbaum B., Carr M. E. Jr. The effect of uremia on platelet contractile force, clot elastic modulus and bleeding time in hemodialysis patients. *Thromb Res* 2007; 119: 723-9.
16. Ершов Ю.А., Плетенева Т.В. Механизмы токсического действия неорганических соединений. М.: Медицина; 1989.
17. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-9.
18. Фархутдинов Р. Р., Лиховских В. А. Хемилюминисцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине. Уфа; 1998.
19. Емченко Н.Л., Цыганенко О. И., Ковалевская Т.В. Универсальный метод определения нитратов в биосредах организма. *Клин. лаб. диагностика* 1994; 6: 19-20.
20. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.

Полный список литературы см. на сайте umj.ru

Новый эритропозз-стимулирующий препарат Аранесп (дарбэпозтин альфа) в коррекции анемии почечного генеза

В. Ю. Шило

Рабочая группа по анемии (PFA);
Центр Диализа при ГКБ №20, Москва

Ключевые слова: хроническая болезнь почки; ренальная анемия; рчЭПО; хроническая почечная недостаточность; диализ.

Введение

Анемия является наиболее ранним и частым осложнением хронической почечной недостаточности (ХПН) и обычно развивается при снижении скорости клубочковой фильтрации (СКФ) до 60-40 мл/мин, хотя может наблюдаться и на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП). Анемия вносит существенный вклад в высокую кардиоваскулярную смертность, характерную для больных ХПН, как уже находящихся на заместительной терапии, так и ожидающих диализа. В отличие от других факторов риска сердечно-сосудистых осложнений, нефрогенная анемия является потенциально изменяемым фактором. Коррекция анемии эритропозз-стимулирующими препаратами снижает заболеваемость и смертность больных на заместительной почечной терапии

(ЗПТ), уменьшает и практически устраняет потребность в гемотрансфузиях, улучшает качество жизни и социальную реабилитацию больных. Анемия при ХБП носит характер гипорегенераторной, нормохромной и нормоцитарной, со сниженным числом ретикулоцитов, и имеет множественный генез. Основными причинами развития анемии при ХПН являются недостаток выработки эндогенного эритропозтина (ЭПО), уменьшение срока жизни эритроцитов в условиях уремического окружения (гемолиз), дефицит железа. Таким образом, почечную анемию можно характеризовать как гипорегенераторную («ЭПО-дефицитную»), с признаками гемолиза и дефицита железа. Ведущее значение в развитии анемии при ХПН принадлежит дефициту эндогенного ЭПО. Уремии свойственен не столько абсолютный, как