

© У.В.Харламова, О.Е.Ильичева, 2010
 УДК 611.018.74+616-008.841.5]:616.61-008.64-036.12-085.38

У.В. Харламова¹, О.Е. Ильичева¹

СОСТОЯНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ И СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ НА ГЕМОДИАЛИЗЕ

U.V. Kharlamova, O.E. Il'icheva

STATE OF ENDOTHELIAL FUNCTION AND HEMOSTASIS SYSTEM IN PATIENTS ON HEMODIALYSIS

¹Кафедра внутренних болезней и военно-полевой терапии Челябинской государственной медицинской академии, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – оценить состояние эндотелиальной функции и показателей агрегационной функции тромбоцитов, коагуляционного гемостаза, антикоагулянтной активности у пациентов, находящихся на лечении программным гемодиализом. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Проведено обследование 89 пациентов на гемодиализе. Всем пациентам определяли концентрации стабильных метаболитов сыворотки крови (нитритов, нитратов, суммарных метаболитов оксида азота), показатели липидограммы, уровень гомоцистеина. Изучались: агрегационная функция тромбоцитов, коагуляционный гемостаз, антикоагулянтная активность, тесты активации свертывания крови. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Средние концентрации гомоцистеина, фактора Виллебранда у гемодиализных больных были выше, чем в группе сравнения. Концентрация стабильных метаболитов оксида азота в обследуемых группах была достоверно ниже, чем у практически здоровых лиц. Выявлено достоверное повышение атерогенных липопротеинов у пациентов, находящихся на программном гемодиализе. Выявленные изменения показателей гемостаза указывают на наличие признаков активации внутрисосудистого свертывания крови. По данным корреляционного анализа, многофакторного регрессионного анализа, отмечено существование взаимосвязи между концентрацией гомоцистеина, атерогенных показателей липидограммы, фактора Виллебранда и показателями гемостазиограммы. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** У больных, получающих лечение программным гемодиализом, имеется активация внутрисосудистого свертывания крови, не выявляемая рутинными коагулологическими исследованиями. У пациентов, находящихся на гемодиализе, выявлена дисфункция эндотелия. По данным корреляционного анализа, многофакторного регрессионного анализа, отмечено существование взаимосвязи между показателями функции эндотелия и гемостазиограммы.

Ключевые слова: гемостаз, эндотелиальная дисфункция, гемодиализ.

ABSTRACT

THE AIM of the study – to assess the state of endothelial function and indices of aggregation of platelet function, coagulation hemostasis and anticoagulant activity in patients on program hemodialysis treatment. **PATIENTS AND METHODS.** Examined 89 patients on hemodialysis. All patients measured the concentration of stable metabolites in blood serum (nitrites, nitrates, total metabolites of nitric oxide), indicators of lipid profile, homocysteine levels. The aggregation of platelets, coagulation hemostasis, anticoagulation activity, activation of blood coagulation tests were studied. **RESULTS.** Mean concentrations of homocysteine, von Willebrand factor in hemodialysis patients were higher than in the comparison group. The concentration of stable metabolites of nitric oxide in the studied group was significantly lower than in healthy individuals. Significant improvement of atherogenic lipoproteins in patients on hemodialysis was discovered. The changes in hemostasis indicate the presence of signs of activation of intravascular coagulation. According to the correlation analysis, multivariate regression analysis indicated the existence of a relationship between homocysteine concentration, indicators of atherogenic lipid profile, von Willebrand factor and indicators hemostasiogrammy. **CONCLUSION.** In patients receiving hemodialysis treatment there is activation of intravascular coagulation of blood does not reveal the routine coagulation studies. In patients on hemodialysis was revealed endothelial dysfunction. According to the correlation analysis, multivariate regression analysis there is an interrelation between indices of endothelial function and hemostasiogramma.

Key words: hemostasis, endothelial dysfunction, hemodialysis.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большинство пациентов, нуждающихся в почечно-заместительной терапии терминальной почечной недостаточности, получают лечение программным гемодиализом. Частыми осложнениями этой процедуры являются нару-

шения свертывания крови. Прежде всего, это обусловлено активацией свертывания при взаимодействии потока крови с диализной мембраной, материалом сосудистых протезов и магистралей экстракорпорального контура [1]. Кроме того, у гемодиализных пациентов, годами получающих гепарин, наблюдается истощение в эндотелиальных клетках запасов ингибитора тканевого факто-

Харламова У.В. 454007, г. Челябинск, пр. Ленина, д. 19, кв. 4;
 Тел.: 89124723820, E-mail: top120@yandex.ru

ра, подавляющего активность внешнего механизма свертывания крови [2].

Дополнительным фактором риска тромбообразования у пациентов, получающих терапию программным гемодиализом, является развитие эндотелиальной дисфункции. Эндотелиальные клетки сосудов в норме обладают высокой антиагрегационной, антикоагулянтной и фибринолитической активностью, обусловленной синтезом в них простациклина, оксида азота, антитромбина III и активаторов плазминогена. При развитии эндотелиальной дисфункции появляются нарушения фибринолитической и антикоагулянтной активности стенки сосудов. Снижение антитромбогенной активности сосудистой стенки вносит существенный вклад в тромбогенез [3]. Таким образом, представляется актуальным изучение показателей системы гемостаза и эндотелиальной функции у пациентов, получающих терапию программным гемодиализом.

Цель исследования – оценить состояние эндотелиальной функции и показателей агрегационной функции тромбоцитов, коагуляционного гемостаза, антикоагулянтной активности у пациентов, находящихся на лечении программным гемодиализом.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 89 больных с терминальной хронической почечной недостаточностью, получающих лечение программным гемодиализом в отделении гемодиализа на базе МУЗ ГКБ №8 г. Челябинска. Гемодиализ проводили на аппарате «Fresenius» с использованием бикарбонатного диализирующего раствора и полисульфоновых диализаторов F 8 и F 10 HPS. Продолжительность сеанса гемодиализа составляла 4–5 ч 3 раза в неделю. Обеспеченная доза диализа (индекс $spKT/V$) составляла не менее 1,3 по логарифмической формуле Дж. Даугирдаса.

Биохимические и иммуноферментные методы исследования проведены в центральной научно-исследовательской лаборатории Челябинской государственной медицинской академии (зав. д-р мед. наук, проф. Л.Ф. Телешева).

Всем пациентам проводили определение концентрации стабильных метаболитов сыворотки крови (нитритов, нитратов, суммарных метаболитов оксида азота), показателей липидограммы: холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), триглицеридов.

Уровень гомоцистеина исследовали методом иммуноферментного анализа на анализаторе «AXIS-SHEILD» (Diagnostics Limited UK).

Расширенное гемостазиологическое исследование выполнено по общепринятым методикам на лазерном агрегометре «Биола LA 230-2» (Россия) и полуавтоматическом коагулометре «CD4» (Швейцария). Проводилось изучение агрегационной функции тромбоцитов, коагуляционного гемостаза (определяли активированное частичное тромбопластиновое время, АЧТВ), протромбиновое время (ПТВ), тромбиновое время, активированное время рекальцификации (ABP), фибриноген; антикоагулянтной активности (антитромбин III), тестов активации свертывания крови (растворимые фибрин-мономерные комплексы – РФМК). Забор крови проводился из артериальной магистрали перед проведением процедуры гемодиализа до введения низкомолекулярного гепарина.

В качестве контрольной группы были обследованы 20 здоровых добровольцев сопоставимого возраста (10 женщин и 10 мужчин, средний возраст – $43,9 \pm 15,5$ лет).

Статистическая обработка выполнена с использованием пакета статистических прикладных программ SPSS for Windows. Данные представлены как «среднее $\pm$ стандартное отклонение». Значимость различий для количественных данных между группами оценивалась с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Статистическая связь между количественными показателями выявлялась с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Методом множественного пошагового регрессионного анализа изучалась степень влияния различных факторов на исследуемый. Критический уровень значимости (*p*) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящее время одним из методов оценки степени нарушений эндотелиальной функции является определение содержания факторов в крови, концентрация которых сопоставима с морфофункциональными изменениями эндотелиального плацдарма. К ним относятся: фактор Виллебранда, гомоцистеин, стабильные метаболиты оксида азота, показатели липидного обмена.

По результатам проведенного исследования (табл. 1) выявлено, что средние концентрации гомоцистеина, фактора Виллебранда у гемодиализных больных были выше, чем в группе сравнения. Концентрация стабильных метаболитов оксида азота в обследуемых группах была достоверно ниже, чем у практически здоровых лиц. При исследовании показателей липидограммы выявлено достоверное повышение атерогенных липопротеинов у пациентов, находящихся на программном ге-

**Показатели исследования функции эндотелия
в обследуемых группах**

Показатель	Пациенты, получающие лечение программным гемодиализом, n = 89	Группа сравнения, n=20	p
Гомоцистеин, мкмоль/л	22,07±7,56	7,12±2,56	0,001
Нитраты, ммоль/л	10,5±3,2	18,6±1,0	0,003
Нитриты, ммоль/л	3,6±3,0	4,8±2,3	0,02
Суммарная концентрация стабильных метаболитов оксида азота, ммоль/л	13,8±3,0	23,4±2,2	0,004
ХС, ммоль/л	5,3±0,6	5,0±0,1	0,008
Триглицериды, ммоль/л	2,1±0,8	1,3±0,2	0,01
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,5±0,4	3,1±0,1	0,04
ХсЛПВП, ммоль/л	0,9±0,1	1,3±0,3	0,001
Фактор Виллебранда, %	126,06±40,08	75,02±	0,005

Таблица 1

воротки крови: нитратов ($R = -0,21$, $p = 0,04$), нитритов ($R = -0,3$, $p = 0,009$), суммарных метаболитов оксида азота ($R = -0,34$, $p = 0,03$). Вместе с тем, отмечена положительная взаимосвязь между концентрацией гомоцистеина и агрегацией тромбоцитов ($R = 0,42$, $p = 0,05$), ОХС ($R = 0,28$, $p = 0,04$), концентрацией ХС ЛПНП ($R = 0,26$, $p = 0,04$), триглицеридов ($R = 0,22$, $p = 0,05$). Выявлена положительная взаимосвязь между концентрацией нитритов сыворотки крови и суммарной концентрацией стабильных метаболитов оксида азота ($R = 0,8$, $p = 0,0001$), нитратов ($R = 0,4$, $p = 0,0001$). Отмечена отрицательная взаимосвязь между концентрацией фактора Виллебранда и АЧТВ ($R = -0,4$, $p = 0,007$), АВР ($R = -0,3$, $p = 0,05$). Выявлена положительная связь между концентрацией фактора Виллебранда и РФМК ($R = 0,33$, $p = 0,02$), ПТВ ($R = 0,31$, $p = 0,03$), концентрацией гомоцистеина ($R = 0,4$, $p = 0,04$).

Показатели гемостазиограммы у пациентов на гемодиализе

Показатель	Пациенты на гемодиализе, n = 89	Группа сравнения, n=20	p
АВР, с	58,88±6,25	64,77±12,33	0,04
АЧТВ, с	31,88±3,84	38,18±9,22	0,24
ПТВ, с	14,63±1,54	15,27±1,63	0,45
Фибриноген, г/л	4,75±1,18	2,28±0,31	0,0004
Тромбиновое время, с	15,29±0,33	17,02±0,56	0,18
Антитромбин III, %	84,16±5,19	95,16±11,42	0,12
РФМК, мг/дл	6,79±3,82	2,16±0,18	0,00001
Агрегация тромбоцитов, %	2,66±1,82	2,05±0,44	0,13

Таблица 2

модиализе, при этом концентрация ХС ЛПВП была достоверно ниже, чем в группе сравнения.

При изучении показателей гемостаза (табл. 2) у больных с терминальной почечной недостаточностью, находящихся на лечении программным гемодиализом, показатели АЧТВ, ПТВ, антитромбина III, тромбинового времени, агрегация тромбоцитов достоверно не отличались от таковых у практически здоровых доноров. Однако значение антитромбина III у больных на почечно-заместительной терапии находилось на нижней границе референтных величин. Уровень РФМК, фибриногена у пациентов на гемодиализе был достоверно выше, чем в группе сравнения. Длительность активированного времени рекальцификации у больных с терминальной почечной недостаточностью была достоверно ниже, чем у практически здоровых лиц, что указывает на повышенный риск тромбообразования у пациентов, находящихся на почечно-заместительной терапии. Выявленные изменения показателей гемостаза указывают на наличие признаков активации внутрисосудистого свертывания крови.

При проведении корреляционного анализа выявлены отрицательные взаимосвязи между концентрацией гомоцистеина и антитромбина III ($R = -0,38$, $p = 0,05$), тромбиновым временем ($R = -0,3$, $p = 0,04$), стабильных метаболитов оксида азота сы-

стеина ($R = 0,4$, $p = 0,04$).

Многофакторный регрессионный анализ показал независимое влияние уровня гомоцистеина на концентрацию нитритов ($\beta = 0,198$; $p = 0,008$), тромбиновое время ($\beta = -0,28$; $p = 0,06$). В ходе многофакторного регрессионного анализа выявлено независимое влияние на концентрацию фактора Виллебранда гомоцистеина ($\beta = 0,29$; $p = 0,03$), ПТВ ($\beta = 0,48$; $p = 0,002$), агрегации тромбоцитов ($\beta = 0,55$; $p = 0,05$), концентрации ОХС ($\beta = 0,73$; $p = 0,05$), концентрации ХС ЛПНП ($\beta = 0,72$; $p = 0,0000001$), суммарной концентрации стабильных метаболитов оксида азота ($\beta = -1,23$; $p = 0,0000001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным нашего исследования, у пациентов, находящихся на терапии программным гемодиализом, выявлена дисфункция эндотелия. Уровень гомоцистеина у пациентов на гемодиализе был достоверно выше, чем у практически здоровых доноров. По-видимому, могут иметь место как нарушения почечного обмена гомоцистеина [4], так и системные нарушения его метаболизма [5]. Проведенный анализ состояния липидного спектра у больных с хронической почечной недостаточностью, получающих лечение программным гемоди-

ализом, выявил существенные изменения. Эти изменения выражались в увеличении ОХС, ТГ, ХС ЛПНП и снижении ХС ЛВП. Известно, что дисбаланс в обмене жиров прогрессирует по мере ухудшения функции почек, с другой стороны – снижение функции почек усугубляет уже имеющиеся нарушения метаболизма липидов. Если на этапе сохранной функции почек более выражены гипо- и диспротеинемия, то на азотемической стадии развития болезни среди обменных нарушений больший удельный вес приобретают гипер- и дислипидемия [6]. Средний уровень нитратов сыворотки крови был ниже у всех больных в сравнении с донорами. Снижение активности продукции оксида азота (NO) в эндотелии связано со снижением эндотелий-зависимой вазодилатации. Гемодиализ способствует инактивации NO за счет образования при контакте лейкоцитов с диализной мембраной большого количества свободных радикалов [7]. Вместе с тем, существуют данные о связи гомоцистеина с продукцией NO через NO-синтазу, что позволило объяснить механизм дисфункции эндотелия [8]. Альтернативно гомоцистеин может приводить к накоплению ассиметричного диметиларгинина, являющимся эндогенным ингибитором NO-синтазы [9, 10]. Процессы аутоокисления гомоцистеина в плазме приводят к окислительной инактивации NO [11, 12]. Процесс окисления гомоцистеина способствует и окислению липопротеидов низкой плотности, что стимулирует процессы атерогенеза [13]. Окисленные липиды стимулируют экспрессию провоспалительных цитокинов, непосредственно инактивируют азотную окись, являются цитотоксичными по отношению к эндотелиоциту [11]. В итоге сосуды теряют эластичность, снижается их способность к дилатации, что в значительной степени обусловлено дисфункцией эндотелия [12, 14].

При изучении показателей гемостаза выявлено, что у больных, получающих терапию гемодиализом, несмотря на нормальные значения рутинных коагуляционных тестов, имеются признаки активации внутрисосудистого свертывания крови. При уремии развиваются тромбофилическое состояние, вклад в которое вносят гиперфибриногенемия, гипергомоцистеинемия, снижение концентрации антитромбина III, повышение фактора Виллебранда, дислипидопропротеинемия [15]. Процедуры гемодиализа за счет контактной активации свертывания при взаимодействии потока крови с диализной мембраной, материалом сосудистых протезов и магистралей экстракорпорального контура усиливают тромбогенный потенциал крови [1]. Кроме того, у гемодиализ-

ных пациентов, годами получающих гепарин, отмечается истощение в эндотелиальных клетках запасов ингибитора тканевого фактора, подавляющего активность внешнего механизма свертывания крови [2].

У пациентов на гемодиализе выявлены тесные взаимосвязи между показателями гемостаза и эндотелиальной функции. Установлено, что гомоцистеин вмешивается в метаболизм арахидоновой кислоты, что приводит к повышению адгезии и агрегации тромбоцитов вследствие увеличения высвобождения тромбоксана A₂ в тромбоцитах, подавления синтеза простагландина в эндотелиоцитах, увеличения высвобождения на эндотелии фактора Виллебранда. Выявлено, что гомоцистеин стимулирует агрегацию тромбоцитов, нарушает функцию тканевого активатора плазминогена, способствует связыванию липопротеина(а) с фибрином, а также ингибирует функцию естественных антикоагулянтов, таких как антитромбин III и протеин C. Кроме того, гомоцистеин стимулирует некоторые факторы свертывания – V, X и XII [16, 17].

Фактор Виллебранда может координировать образование фибрина и с помощью тромбоцитов, способствовать образованию тромбов на стороне повреждения клеток эндотелия; этот гликопротеид может опосредовать начальную адгезию тромбоцитов к субэндотелию путем присоединения его к специфическим рецепторам мембран тромбоцитов [18]. В случае повреждения клетки эндотелия гомоцистеином, окисленными липопротеинами освобождение фактора Виллебранда увеличивается, что приводит к активации сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза [19, 20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. У больных, получающих лечение программным гемодиализом, имеется активация внутрисосудистого свертывания крови, не выявляемая рутинными коагулологическими исследованиями.

2. У пациентов, находящихся на гемодиализе, выявлена дисфункция эндотелия: отмечено достоверное повышение уровней гомоцистеина, атерогенных показателей липидного спектра, фактора Виллебранда по сравнению с практически здоровыми лицами; концентрация конечных метаболитов оксида азота сыворотки крови у диализных пациентов оказалась достоверно ниже, чем в группе сравнения.

3. По данным корреляционного анализа, многофакторного регрессионного анализа, отмечено существование взаимосвязи между показателями функции эндотелия и гемостазиограммы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ильин АП, Богоявленский ВФ. *Тромбофилия при гемодиализе у больных хронической почечной недостаточностью и ее фраксинопрофилактика и терапия*. Казань, 2001; 3-32
2. Cella G, Vertolli U, Naso A. et al. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) activity in uremic patients during hemodialysis. *Thromb Res* 1996; 81: 671- 677
3. Манухина ЕБ, Малышев ИЮ. Роль оксида азота в сердечно-сосудистой патологии: взгляд патофизиолога. *Росс кардиологич журн* 2000; (5): 55-63
4. Bostom A, Brosnan JT, Hall B. Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo. *Atherosclerosis* 1995; 116: 59-62
5. Suliman ME, Divino Filho JC, Barany P. et al. Effects of high-dose folic acid and pyridoxine on plasma and erythrocyte sulfur amino acids in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1287-1296
6. Смирнов АВ, Есаян АМ, Каюков ИГ. и др. Современные подходы к замедлению прогрессирования хронической болезни почек. *Нефрология* 2004; (3): 89-99
7. Hoenich NA. Platelet and leucocytes behaviour during haemodialysis. *Contrib Nephrol* 1999; 125: 120-132
8. Lang D, Kredan MB, Lang D, Moat SJ. et al. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: Role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 5: 257-261
9. Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ. et al. Does folic acid decrease plasma homocysteine and improve endothelial function in patients with predialysis renal failure? *Circulation* 2000; 102: 871-875
10. Van Guldener C, Lambert J, Janssen MJ, Donker AJ, Stehouwer CD. Endothelium-dependent vasodilatation and distensibility of large arteries in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 14-18
11. Kanani P, Sinkey C, Browning R. et al. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocysteinemia in humans. *Circulation* 1999; 100: 1161-1168
12. Tawakol A, Forgiione M, Stuehlinger M. et al. Homocysteine impairs coronary microvascular dilator function in humans. *JACC* 2002; 40 (6): 1051-1058
13. Loscalo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98 (1): 5-7
14. Tawakol A, Omland T, Gerhard M. et al. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependant vasodilatation in humans. *Circulation* 1997; 95: 1119-1121
15. Sagripanti A, Cupisti A, Baicchi U. et al. Plasma parameters of the protrombotic state in chronic uremia. *Nephron* 1993; 63: 273-278
16. Mayer E, Jacobsen D, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 517-527
17. Stein J, Mc Bride P. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1301-1306
18. Bardic R, Rugerri ZM, Savion N et al. Platelet aggregation on extracellular matrix: effect of a recombination GPIIb-binding fragment of von Willebrand factor. *Thromb Haemos* 1993; 70: 522-526
19. Blann AD. Von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease. *Brit J Biomed Sci* 1993; 50: 124-134
20. Ruggery ZM, Ware J, Ginsberg D. Von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemorrhage* 1994; 67: 305-329

Поступила в редакцию 22.09.2010 г.

Принята в печать 17.11.2010 г.