

© К.Н.Зеленин, А.М.Есаян, А.Ш.Румянцев, 2017
 УДК 616.61-008.64-036.12 : 616.151.5
 doi: 10.24884/1561-6274-2017-21-4-79-83

К.Н. Зеленин^{1,2}, А.М. Есаян², А.Ш. Румянцев^{3,4}

АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ НА ПРОГРАММНОМ ГЕМОДИАЛИЗЕ

¹Отделение гемодиализа Первой городской клинической больницы им. Е.Е. Волосевич, г.Архангельск, ²кафедра нефрологии и диализа Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, ³кафедра факультетской терапии Санкт-Петербургского государственного университета, ⁴кафедра пропедевтики внутренних болезней Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова

K.N. Zelenin^{1,2}, A.M. Esayan², A.Sh. Romyantsev^{3,4}

PLATELET AGGREGATION IN PATIENTS ON HEMODIALYSIS

¹ Hemodialysis unit, First city clinical hospital named after E. E. Volosevich, Arkhangelsk, ² Department of nephrology and dialysis, Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, ³ Department of faculty therapy, Saint-Petersburg state University, ⁴ Department of propedeutic of internal diseases, Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Russia

РЕФЕРАТ

Тромбоэмболические осложнения у больных на гемодиализе оказывают существенное влияние на длительность и качество жизни пациентов. **ЦЕЛЬ:** изучить функциональное состояние тромбоцитов при ХБА С5д. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследовали 61 пациента с ХБП С5д. Длительность заместительной почечной терапии 133 (74–177) мес. Функциональную активность тромбоцитов оценивали в пробах с аденозиндифосфатом и адреналином. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Средняя величина агрегации тромбоцитов в пробе с АДФ составила 59,5 (32,5–87,5)%. Функциональная активность тромбоцитов была снижена у 35 пациентов и не изменена у 26 пациентов. Средняя величина агрегации тромбоцитов в пробе с адреналином составила 68,5 (57,5–73,5)%. Функциональная активность тромбоцитов была снижена у 38, нормальной – у 8 и повышена у 15 пациентов. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Проба с адреналином является предпочтительной при изучении функциональной активности тромбоцитов при ХБП С5д.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, гемодиализ, функциональная активность тромбоцитов.

ABSTRACT

Thromboembolic complications in patients on hemodialysis have a significant impact on the duration and quality of life of patients. **THE AIM:** to study the functional status of platelets at the CKD 5d. **PATIENTS AND METHODS.** We examined 61 patients with CKD 5d. The duration of renal replacement therapy 133 [74-177] months. The functional activity of platelets was evaluated in the samples with adenosine diphosphate and adrenaline. **RESULTS.** The average value of platelet aggregation in the sample with adenosine diphosphate was 59.5 [of 32.5 and 87.5]%. The functional activity of platelets was decreased in 35 of patients and not changed in 26 patients. The average value of platelet aggregation in the sample with epinephrine accounted for 68.5 [57.5-73.5]%. The functional activity of platelets was reduced in 38, normal in 8 and increased in 15 patients. **CONCLUSION.** Test with adrenaline is preferred in the study of the functional activity of platelets in CKD 5d.

Key words: chronic kidney disease, hemodialysis, functional activity of platelets.

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения свертывающей системы крови представлены у больных с терминальной почечной недостаточностью широким спектром тяжелых клинических состояний от желудочно-кишечных кровотечений до тромбозов артериовенозной фистулы. Причинами последних считают нарушения в свертывающей системе крови, особенности расположения АВФ, наличие стенозов и аневризм. Однако, нередко тромбоз сосудисто-

го доступа возникает без очевидных причин, что предполагает участие активации тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза [1].

Тромбоциты у больных на гемодиализе (ГД) подвергаются различным влияниям: токсическим, лекарственным, гемодинамическим. Поэтому детальный анализ конкретной причины изменения их функциональной активности нередко затруднен. Кроме того, в большинстве случаев объемы выборки пациентов невелики. Возможно, по этим причинам публикации последних лет иногда носят противоречивый характер [2, 3].

Целью настоящего исследования было изуче-

Зеленин К.Н. Россия, 163001, г. Архангельск, ул.Суворова, д. 1. ГБУЗ «Первая городская КБСМП им. Е.Е. Волосевич», отделение гемодиализа. Тел.: (8182) 27-67-72, 63-27-34, E-mail: knzelenin@mail.ru

ние функциональной активности тромбоцитов у пациентов с хронической болезнью почек С5д (ХБП С5д).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследовали 61 пациента с ХБП С5д, получавших лечение программным ГД в отделения диализа ГБУЗ «Первая городская клиническая больница им. Е. Е. Волосевич» г. Архангельска.

Критериями включения в исследование были:

- длительность заместительной почечной терапии не менее 3 мес;
 - отсутствие обострений основного заболевания в течение 6 мес;
 - отсутствие госпитализаций в течение 3 мес;
 - отсутствие трансплантации почки в анамнезе.
- Критериями исключения считали:
- инфекционный эндокардит;
 - ревматические пороки сердца;
 - гемодинамически значимые нарушения сердечного ритма;
 - наличие в анамнезе острого инфаркта миокарда или острого нарушения мозгового кровообращения;
 - сердечную недостаточность III–IV ф. кл.;
 - прием дезагрегантов;
 - системные заболевания соединительной ткани;
 - выраженные клинические проявления атеросклероза церебральных сосудов и сосудов нижних конечностей;
 - злоупотребление алкоголем;
 - хронические заболевания печени;
 - тяжелую степень БЭН (индекс массы тела <math><19 \text{ кг/м}^2</math>; концентрация в сыворотке крови альбумина <math><25 \text{ г/л}</math>, трансферрина <math><1,6 \text{ г/л}</math>, абсолютное количество лимфоцитов <math><0,9 \times 10^9/\text{л}</math>).

Среди больных было 30 мужчин и 31 женщина, средний возраст 49,0 (39,0–55,0) лет. Основной причиной развития ХБП явились: хронический гломерулонефрит – у 31, хронический интерстициальный нефрит – у 6, аномалия развития почек – у 8, сахарный диабет 1-го типа – у 4, АДПП – у 8 и у 4 человек – артериолосклеротический нефросклероз.

Длительность лечения гемодиализом составила 133 (74–177) мес. У 10 человек была диагностирована ИБС. Среди пациентов 14 человек (22,9%) не курили никогда, 37 (60,7%) – курили и перестали, 10 (16,4%) – курят по настоящее время. Неблагоприятная наследственность по сердечно-сосудистой патологии была отмечена у 28 больных (45,9%).

Сосудистым доступом у 52 пациентов являлась

АВ-фистула и у 9 – протез. Анализировали функцию только нативной артериовенозной фистулы. ГД больным проводили по стандартной программе (3 раза в неделю по 4–4,5 ч) на аппаратах «F4008 S» («Fresenius») с использованием бикарбонатного диализирующего раствора. Процедуру осуществляли на индивидуально подобранных полисульфоновых диализаторах «F6», «F7», «F8 HPS» («Fresenius»), клиренс которых по мочевины *in vivo* колебался от $196 \pm 9,0$ до $234 \pm 11,0$ мл/мин. Скорость кровотока составляла 350 ± 27 мл/мин, поток диализирующего раствора – 500 мл/мин. Обеспеченная доза диализа (индекс spKT/V) составляла не менее 1,3 [4]. Тромбоз фистулы в анамнезе регистрировали у 28 пациентов (53,8%): 1 раз – у 17 (32,7%), 2 раза – у 6 (11,5%), 3 и 4 раза соответственно – у 1 (1,9%) и более 4 раз – у 3 пациентов (5,7%).

У всех больных было проведено традиционное нефрологическое обследование. Биохимические показатели определяли на автоматическом биохимическом анализаторе «Cobas-Integra 400» (Швейцария) реагентами этой же фирмы. Результаты приведены в табл. 1.

Забор крови для исследования системы гемостаза производили в вакутейнеры с 3,8% раствором цитрата натрия до сеанса ГД. Исследование функциональной активности тромбоцитов проводилось на оптическом агрегометре «Chronolog 490» (США) с использованием в качестве индукторов агрегации тромбоцитов растворов адреналина в конечной концентрации 5 мкмоль/л и аденозиндифосфата (АДФ) в конечной концентрации 10 мкмоль/л (соотношение плазма/индуктор = 500 мкл/5 мкл). Время наблюдения за агрегационной кривой в процессе исследования функциональной активности тромбоцитов составляло 6 мин. Получение богатой тромбоцитами и бестромбоцитной плазмы осуществляли с помощью центрифуги «Labsystems» (Финляндия) при частоте вращения 1000 об/мин в течение 5 мин и 2700 об/мин в течение 15 мин соответственно. Стандартизацию по количеству тромбоцитов плазмы, богатой тромбоцитами, не выполняли. Определение количества тромбоцитов проводили в венозной крови стабилизированной K_3EDTA на гематологическом анализаторе «Hemolux-18» (Китай).

Статистический анализ результатов выполняли с применением пакета прикладных статистических программ «Statistica v10.0» («StatSoft Inc», США). В связи с тем, что все изучаемые показатели имели несимметричное распределение, использовали непараметрические статистические

Таблица 1

Результаты лабораторного обследования пациентов

Показатель	Медиана	25-й квартиль	75-й квартиль
Гемоглобин, г/л	107,0	97,0	114,0
Гематокрит, %	30,7	29,2	33,2
«Доза диализа», КТ/V	1,50	1,40	1,70
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л	202,0	165,0	248,0
Креатинин до ГД, мкмоль/л	986,0	893,0	1133,0
Мочевина до ГД, ммоль/л	26,6	23,0	29,9
Билирубин, мкмоль/л	7,6	6,5	8,6
Альбумин, г/л	41,0	39,0	42,8
АЛТ, ЕД/л	14,5	10,0	24,7
АСТ, ЕД/л	16,7	13,3	20,5
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	79,4	57,9	105,0
Натрий до ГД, ммоль/л	139,0	135,5	142,03
Калий до ГД, ммоль/л	6,05	5,4	6,6
Кальций общий до ГД, ммоль/л	2,30	2,19	2,43
Кальций ионизированный до ГД, ммоль/л	1,14	1,03	1,23
Неорганический фосфат до ГД, ммоль/л	2,05	1,73	2,35
Общий холестерин, ммоль/л	4,9	4,2	5,7
Паратиреоидный гормон, пг/мл	117,0	57,6	405,6
C-реактивный белок, мг/л	1,5	1,0	2,0
Железо, мкмоль/л	10,4	7,0	14,9

критерии. Центральные тенденции представлены как медиана (нижний – верхний квартиль). Для попарного сравнения независимых групп использовался критерий Манна–Уитни. Для оценки силы связи между изучаемыми переменными использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий и связей отвергали при $p < 0,05$

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средняя величина агрегации тромбоцитов в пробе с АДФ составила 68,5 (57,5–73,5)%. Функциональная активность тромбоцитов была снижена у 35 (57,3%) пациентов и не изменена у 26 (42,6%) пациентов. При проведении корреляционного анализа были выявлены следующие взаимосвязи величины агрегации тромбоцитов с АДФ с величиной гематокрита ($R_s = -0,275$, $p = 0,033$), числом тромбоцитов ($R_s = 0,388$, $p = 0,002$), величиной объемного кровотока по артериовенозной фистуле ($R_s = -0,816$, $p = 0,007$), скоростью фибринолиза ($R_s = 0,363$, $p = 0,004$).

Агрегация тромбоцитов с адреналином была снижена у 38 (62,3%), нормальной – у 8 (13,1%) и повышена – у 15 (24,6%). При проведении корреляционного анализа были выявлены следующие взаимосвязи величины агрегации тромбоцитов с адреналином: с концентрацией в сыворотке крови мочевины до сеанса ГД ($R_s = 0,262$, $p = 0,042$), щелочной фосфатазы ($R_s = 0,260$, $p = 0,045$), скоростью фибринолиза ($R_s = 0,324$, $p = 0,011$).

В табл. 2 представлено распределение больных в зависимости от величины агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ и адреналином.

Несмотря на наличие статистически значимой взаимосвязи обоих показателей ($R_s = 0,650$, $p = 0,001$), одновременное увеличение стимулированной агрегации тромбоцитов отмечалось лишь у 19,7% пациентов.

В табл. 3 и 4 приведены результаты исследования плазменного гемостаза в зависимости от реакции на стимуляцию тромбоцитов адреналином.

Функциональная активность тромбоцитов при стимуляции АДФ не была увеличена ни у кого из пациентов. Независимо от того, соответствовала ее величина нормальным значениям или была снижена, медиана уровня фибриногена, величины АЧТВ и АТ III не превышали нормальных значений, ТВ и D-димеры находились в области верхней границы нормы, а скорость фибринолиза и концентрация РКФМ были увеличены.

Таблица 2

Распределение больных в зависимости от величины агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ и адреналином, $\chi^2 = 29,337$, $p = 0,0001$

С АДФ	С адреналином			Всего
	снижена	норма	повышена	
норма	32	0	3	35
повышена	6	8	12	26
Всего	38	8	15	61

Вместе с тем, при стимуляции адреналином у пациентов с активацией тромбоцитов отмечалась наиболее высокая скорость фибринолиза одновременно с нормальным уровнем D-димеров.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пациенты с ХБП С5д являются наиболее сложной группой для изучения гемостаза. Слишком много факторов оказывают влияние на состояние свертывающей системы крови. К ним можно отнести и влияние собственно уремии, и применение антикоагулянтов во время процедуры ГД, и прием ряда препаратов, опосредованно способствующих созданию ситуации тромбофилии [5].

Мы акцентировали внимание на показателях тромбоцитарного гемостаза, так как полагаем, что у больных без тяжелой сопутствующей патологии сердечно-сосудистой системы ведущей причиной тромботических осложнений являются именно нарушения тромбоцитарного гемостаза. Поэтому в исследование не были включены лица, получавшие дезагреганты. В целом группа обследуемых, несмотря на значительную длительность заместительной почечной терапии, характеризовалась

стабильным клиническим состоянием, адекватным ГД, целевыми значениями АД, отсутствием признаков системного воспаления. Несмотря на целевые значения концентрации ПТГ в плазме крови, уровень ионизированного кальция имел тенденцию к снижению, а неорганического фосфата был повышен. В связи с этим нельзя было исключить влияние гиповитаминоза D.

По нашим данным, результаты стимуляции тромбоцитов АДФ создают впечатление о том, что функциональная активность тромбоцитов не увеличена. Однако при использовании адреналина практически у каждого четвертого пациента были выявлены признаки протромботического состояния тромбоцитарно-сосудистого звена коагуляции. Одной из причин может быть нарушение фосфорно-кальциевого обмена. Например, низкие концентрации ионизированного кальция в плазме обуславливают более выраженный эффект адреналина на α_2 -адренорецепторы тромбоцитов. Известно, что, несмотря на снижение уровня ионизированного кальция в плазме, активированные тромбоциты благодаря экспрессии IP_3 рецепторов могут активно захватывать кальций, что в дальнейшем способствует выделению гранул, содержащих

Таблица 3

Результаты исследования плазменного гемостаза в зависимости от реакции на стимуляцию тромбоцитов АДФ

АДФ	Фибриноген, г/л Me	Фибриноген, г/л Q25–Q75	АЧТВ, с Me	АЧТВ, с Q25–Q75	АТ-III, % Me	АТ-III, % Q25–Q75	Фибринолиз, с Me	Фибринолиз, с Q25–Q75	РКФМ, мг/дл Me	РКФМ, мг/дл Q23–Q75	ТВ, с Me	ТВ, с Q25–Q75	D-димеры, мг/мл Me	D-димеры, мг/мл Q25–Q75
Снижена n=35	3,43	2,85–3,99	35,6	34,0–37,6	88,0	79,0–92,0	83,0	71,0–102,0	14,0	11,0–23,0	22,0	19,0–27,0	0,49	0,27–0,98
Нормальная n=26	3,60	3,30–3,80	36,0	34,0–38,8	84,0	74,0–93,0	105,0	92,0–120,0	19,0	11,0–24,0	24,0	20,0–27,0	0,46	0,22–0,90
p	0,516		0,474		0,909		0,011		0,558		0,803		0,723	

Примечание. Здесь и в табл. 4: АДФ – реакция на аденозиндифосфат, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, АТ-III – антитромбин III, РКФМ – растворимые комплексы фибрин–мономер, ТВ – тромбиновое время.

Таблица 4

Результаты исследования плазменного гемостаза в зависимости от реакции на стимуляцию тромбоцитов адреналином

АДР	Фибриноген, г/л Me	Фибриноген, г/л Q25–Q75	АЧТВ, с Me	АЧТВ, с Q25–Q75	АТ-III, % Me	АТ-III, % Q25–Q75	Фибринолиз, с Me	Фибринолиз, с Q25–Q75	РКФМ, мг/дл Me	РКФМ, мг/дл Q23–Q75	ТВ, с Me	ТВ, с Q25–Q75	D-димеры, мг/мл Me	D-димеры, мг/мл Q25–Q75
Снижена n=38	3,46	2,85–3,90	35,0	33,5–38,0	87,5	81,0–96,0	85,0	71,0–105,0	14,5	11,0–23,0	24,0	19,0–28,0	0,52	0,29–0,98
Нормальная n=8	3,40	3,00–3,76	36,0	36,0–39,6	82,0	74,0–89,0	92,0	82,0–95,0	20,0	8,5–32,0	25,0	20,0–28,0	0,46	0,22–0,83
Увеличена n=15	3,60	3,30–4,18	36,0	34,4–38,8	85,0	74,0–93,0	116,0	116,0–140,0	17,0	10,0–24,0	21,0	16,0–24,0	0,33	0,22–0,91
p	0,183		0,940		0,705		1/3=0,00082 2/3=0,027		0,807		0,141		0,600	

биологически активные вещества, способствующие агрегации тромбоцитов [6].

Механизмы активации тромбоцитов АДФ и адреналином опосредованы разными рецепторами. Так, стимуляция рецепторов P_2Y_1 может быть снижена за счет истощения депо или инактивации АДФ уремическими токсинами [7, 8]. Вместе с тем, чувствительность α_2 -адренорецепторов сохраняется [9]. Поэтому можно предположить, что для оценки функциональной активности тромбоцитов у диализных больных следует использовать в первую очередь пробу с адреналином. Однако это не означает, что от пробы с АДФ нужно отказаться. В частности, об этом свидетельствует статистически значимая негативная взаимосвязь показателя со скоростью объемного кровотока по артериовенозной фистуле.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Терминальная почечная недостаточность является классическим примером альтернативных нарушений системы гемостаза. Недостаточная информация о тонких механизмах нарушения функции тромбоцитарно-сосудистого звена у больных, получающих лечение программным ГД, является одной из причин нередких осложнений, включающих широкий диапазон нарушений от внутренних и наружных кровотечений до тромбозов артериовенозной фистулы. Небольшой размер изучаемой нами группы не позволяет делать однозначные выводы. Однако представляется целесообразным включать в рутинный план обследования пациентов с ХБП С5д пробы с АДФ и адреналином для оценки функционального состояния тромбоцитов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Thomas M, Nesbitt C, Ghouri M, Hansrani M. Maintenance of Hemodialysis Vascular Access and Prevention of Access Dysfunction: A Review. *Ann Vasc Surg* 2017 May 4. pii: S0890-5096(16)30813-5. doi: 10.1016/j.avsg.2017.02.014. [Epub ahead of print]
2. Martinović Z, Basić-Jukić N, Pavlović DB, Kes P. Importance of platelet aggregation in patients with end-stage renal disease. *Acta Clin Croat* 2013;52(4):472-477
3. Waki K, Hayashi A, Ikeda S, Ikeda S et al. Measuring platelet aggregation in dialysis patients with a whole blood aggregometer by the screen filtration pressure method. *Ther Apher Dial* 2011;15(2):203-6. doi: 10.1111/j.1744-9987.2010.00899.x
4. Daugirdas JT. Second generation logarithmic estimates of single-pool variable volume Kt-V: An analysis of error. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 1205–1213
5. Bauer A, Limperger V, Nowak-Göttl U End-stage renal disease and thrombophilia. *Hamostaseologie* 2016 May 10; 36(2):103-7. doi: 10.5482/HAMO-14-11-0063
6. Dolan AT, Diamond SL. Systems Modeling of Ca^{2+} Homeostasis and Mobilization in Platelets Mediated by IP_3 and Store-Operated Ca^{2+} Entry. *Biophys J* 2014 May 6; 106(9): 2049–2060. doi: 10.1016/j.bpj.2014.03.028
7. Mahaut-Smith MP1, Jones S, Evans RJ. The $P2X_1$ receptor and platelet function. *Purinergic Signal* 2011;7(3):341-56. doi: 10.1007/s11302-011-9224-0
8. Purvis JE, Chatterjee MS, Brass LF, Diamond SL. A molecular signaling model of platelet phosphoinositide and calcium regulation during homeostasis and $P2Y_1$ activation. *Blood* 2008 Nov 15; 112(10): 4069–4079. doi: 10.1182/blood-2008-05-157883
9. Passacuale G, Ferro A. Current concepts of platelet activation: possibilities for therapeutic modulation of heterotypic vs. homotypic aggregation. *Br J Clin Pharmacol* 2011;72(4):604-18. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.03906.x

Сведения об авторах:

Зеленин Константин Николаевич

Россия, 163001, г. Архангельск, ул.Суворова, д. 1. ГБУЗ «Первая городская КБСМП им. Е.Е. Волоsevич», отделение гемодиализа, заведующий. Тел.: (8182) 27-67-72, 63-27-34, E-mail: knzelenin@mail.ru

Konstantin N. Zelenin, MD

Affiliations: Russia, 163001, Arkhangelsk, Suvorov str., 1 First city clinical hospital named after E. E. Volosevich, hemodialysis unit, chief. Phone: (8182) 27-67-72, 63-27-34, E-mail: knzelenin@mail.ru

Проф. Есаян Ашот Мовсесович, д-р мед. наук

Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, кафедра нефрологии и диализа. Тел.: (812) 234-91-91

Prof. Ashot M. Esayan MD, PhD, DMedSci

Affiliations: Russia, 197022, St-Petersburg, L'va Tolstogo str. 6-8 Pavlov First Saint Petersburg State Medical University Department of nephrology and dialysis, chief. Phone (812) 234-91-91

Проф. Румянцев Александр Шаликович

Россия, 199106, Санкт-Петербург, 21-я линия В.О., д. 8а. Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра факультетской терапии. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, кафедра пропедевтики внутренних болезней. Тел.: +7 (812) 326-03-26, E-mail: rash.56@mail.ru

Prof. Alexandr Sh.Rumyantsev MD, PhD, DMedSci

Affiliations: Russia, 199106, Saint Petersburg, V.O., 21 line 8a. Saint Petersburg State University Department of Faculty Therapy. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University Department of propedeutic of internal diseases. Phone: +7(812) 326-03-26, E-mail: rash.56@mail.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 05.02.17 г.

Принята в печать: 06.06.17 г.