

МАРКЕРЫ ПОРАЖЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ И АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ И ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ

А.П. Щёктова

Курс клинической лабораторной диагностики ФПК и ППС ГБОУ
ВПО ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь

Контакты: Алевтина Павловна Щёктова al_shchekotova@mail.ru

Цель исследования — оценка взаимосвязи поражения эндотелия, количества и агрегационной функции тромбоцитов при вирусном хроническом гепатите С (ХГС) и циррозе печени (ЦП).

Материалы и методы. Обследованы 50 больных ХГС и 28 пациентов с ЦП. Методом иммуноферментного анализа изучали уровень общего оксида азота, эндотелина-1, васкулоэндотелиального фактора роста, активность фактора Виллебранда (ФВ), подсчитывали количество десквамированных эндотелиоцитов (ДЭЦ) в плазме крови по методу Hladovec (1978), определяли агрегацию тромбоцитов (АТ) с аденозиндифосфатом, коллагеном, ристоцетином.

Результаты. Продемонстрирована взаимосвязь ДЭЦ и ФВ при ХГС ($p = 0,014$) и ЦП ($p = 0,000004$). При ЦП выявлены статистически значимые корреляции исследованных показателей поражения эндотелия с количеством тромбоцитов и АТ, а у больных ХГС таких взаимосвязей не обнаружено. При этом значимое повышение АТ с ристоцетином отмечено только при ХГС. Снижение количества тромбоцитов у пациентов с ХГС и особенно при ЦП и повышенная активность ФВ могли изменить показатели истинной АТ. С учетом поправочного коэффициента ФВ/тромбоциты, который при ХГС и ЦП был существенно выше нормы, рассчитывалась скорректированная АТ, показатели которой при заболеваниях печени были значительно повышены.

Заключение. Маркеры эндотелиальной дисфункции как при ХГС, так и при ЦП демонстрируют взаимосвязь со снижением уровня тромбоцитов и повышением АТ. Определение скорректированной АТ позволяет выявить у всех пациентов с ХГС и ЦП нарушение тромбоцитарного гемостаза в виде повышенной агрегации.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, агрегация тромбоцитов, хронический гепатит, цирроз печени

ENDOTHELIUM LESION MARKERS AND THROMBOCYTE AGGREGATION IN CHRONIC HEPATITIS AND HEPATIC CIRRHOSIS

A.P. Shchekotova

SBEI HPE Perm State Academy of Medicine named after Academician E.A. Wagner of Ministry of Health and Social Development of Russia

Aim — to estimate endothelium lesion, quantity and thrombocyte aggregation function correlation in viral chronic hepatitis C (CHC) and hepatic cirrhosis (HC).

Materials and methods. 50 CHC patients and 28 HC patients were examined. Using IFA method the total nitric oxide, endothelin-1, vasoendothelial growth factor levels, Willebrand factor (vWF) activity were investigated, blood plasma desquamated endotheliocyte (DEC) number was calculated with Hladovec method, 1978, thrombocyte aggregation (TA) with ADP, collagen, ristocetine was determined.

Results. DEC and vWF demonstrated correlation in CHC ($p = 0.014$) and HC ($p = 0.000004$). In HC patients reliable correlation of all the investigated indices of endothelium lesion with the thrombocyte number and TA was detected, but in CHC patients no correlations were revealed. Thus, significant elevation of TA with ristocetine was noted only in CHC. Decrease in thrombocyte amount among CHC patients and, especially in HC, and heightened vWF activity could change true TA indices. The corrected TA, whose indices in hepatic diseases significantly increased, was calculated taking into account the correction factor vWF / thrombocytes that in CHC did not differ from that of healthy patients and in HC was essentially higher.

Conclusion. Endothelium dysfunction markers in CH and HC demonstrate correlation with thrombocyte reduction and TA elevation. Determination of corrected TA permits to reveal disturbances of thrombocyte hemostasis in the form of elevated aggregation in all CHC and HC patients.

Key words: endothelial dysfunction, thrombocyte aggregation, chronic hepatitis, hepatic cirrhosis

Введение

Дисфункция эндотелия (ДЭ) нуждается в углубленной оценке и определении ее места как важного патогенетического механизма в прогрессировании гепатопатий, в том числе в сосудистой перестройке и фиброзе.

К маркерам ДЭ относят прежде всего оксид азота (ОА) и эндотелин-1 (Ет-1), маркерами повреждения эндотелия являются васкулоэндотелиальный фактор роста (ВЭФР), фактор Виллебранда (ФВ) и др. [1]. Контакт эндотелиального монослоя с клетками и факторами

свертывания крови обуславливает его важнейшую роль в регуляции гемостаза. Повреждение эндотелия инициирует нарушения в системе гемостаза вследствие обнажения субэндотелиального матрикса и избыточного синтеза ФВ [2]. При нарушении функции или структуры эндотелия он становится инициатором свертывания крови и спазма сосудов. В норме это защитная реакция, но при длительном воздействии этиологического фактора активность эндотелия усугубляет патологический процесс [3]. Активация адгезивно-агрегационных свойств тромбоцитов при ДЭ также связана со снижением уровня ОА, который является мощным антиагрегантом, а при повреждении эндотелия этот эффект ослабляется, что в конечном итоге приводит к повышению агрегационной функции тромбоцитов [2, 4]. Следует отметить, что степень ДЭ коррелирует с продолжительностью и тяжестью заболевания, и это сопровождается более значительными и порой необратимыми изменениями в системе сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Сдвиги в сосудисто-тромбоцитарном звене гемостаза зависят от активности инфекционного воспалительного процесса в печени и от уровня вирусной нагрузки. У больных вирусным хроническим гепатитом С (ХГС) с низкой репликативной активностью вируса зарегистрировано увеличение показателей агрегации тромбоцитов (АТ), по мере увеличения вирусной нагрузки отмечалась выраженная тромбоцитопения со снижением степени агрегации [5]. На стадии цирроза печени (ЦП) происходит дальнейшее уменьшение количества тромбоцитов и их функциональной активности на фоне развития гиперспленизма и эндогенной интоксикации [6]. Степень повреждения эндотелия оценивают по активности ФВ и функциональному состоянию тромбоцитов. Процессы неоангиогенеза в печени также тесно связаны с функциональной состоятельностью эндотелия [3]. ВЭФР, выработка которого увеличивается при повреждении эндотелия, является важным регулятором ангио- и васкулогенеза, инициирует процессы ремоделирования существующих сосудов и формирование новых коллатералей, оказывает влияние на проницаемость сосудов, в том числе при воспалении в печени [7]. Однако ДЭ, возникшая на фоне воспаления, вызывает ремоделирование стенок сосудов в виде утолщения интимы и меди, что приводит к нарушению сосудистой архитектоники при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, это же может происходить и при развитии ЦП [7].

Взаимосвязь параметров тромбоцитарного гемостаза и маркеров поражения эндотелия при ХГС и ЦП изучена недостаточно, хотя эти процессы участвуют в патогенезе и развитии клинических проявлений при хронических заболеваниях печени и могут служить мишенью для патогенетической терапии.

Цель исследования — оценка взаимосвязи поражения эндотелия, количества и агрегационной функции тромбоцитов при ХГС и ЦП.

Материалы и методы

Всего обследовано 78 пациентов. В 1-ю группу были включены 50 больных ХГС в фазе реактивации, во 2-ю — 28 пациентов с ЦП в исходе ХГС, В класс по классификации Чайлда—Пью. Критерием исключения являлось наличие сердечно-сосудистой патологии и других заболеваний, сопровождающихся выраженной эндотелиальной дисфункцией. Средний возраст больных ХГС составил $38,8 \pm 14,5$ года, при ЦП — $49,8 \pm 12,2$ года. Контрольная группа состояла из 34 практически здоровых лиц, не имеющих в анамнезе заболеваний печени, возраст — $32,8 \pm 8,3$ года. В предыдущих исследованиях было показано отсутствие взаимосвязи между показателями ДЭ, возрастом и полом при хроническом гепатите и ЦП [8].

Исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации; протокол одобрен Этическим комитетом Пермской государственной медицинской академии, получено информированное согласие пациентов.

Изучались тесты оценки функционального состояния эндотелия иммуноферментным методом на анализаторе StatFax: в плазме крови устанавливали содержание ОА (SYSTEMS, США), Et-1 (BIOMEDICA CRUPPE, США), ВЭФР (BIOSOURCE, США), подсчитывали количество десквамированных эндотелиоцитов (ДЭЦ) по методу Hladovec (1978) [7]. АТ определяли на агрегометре модели 230LA (НПФ «Биола», Москва), в качестве индукторов/агонистов агрегации применялись аденозиндифосфат (АДФ), коллаген и ристоцетин (НПО «Ренам», Москва). Количественную оценку активности ФВ в плазме крови проводили на агрегометре Биола. Метод основан на способности ФВ в присутствии антибиотика ристоцетина вызывать агглютинацию фиксированных и лиофильно высушенных тромбоцитов. Активность ФВ в исследуемой плазме оценивается по вызываемой этой плазмой агглютинации стандартизованного препарата тромбоцитов [9].

Результаты были обработаны при помощи пакета программ Statistica 6.0. Статистическую обработку данных осуществляли методом вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента. Для описания полученных количественных признаков, имеющих нормальное распределение, использовалось среднее арифметическое $M \pm$ одно среднее квадратичное стандартное отклонение (σ). Для корреляционного анализа применялся расчет средних величин показателей корреляционных отношений для количественных признаков по Пирсону (r). Связь между показателями оценивалась как сильная при $r > 0,7$, средней силы — при $r = 0,3-0,7$, слабая — при $r < 0,3$. Различия между выборками считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Показатели функционального состояния эндотелия при ХГС и ЦП значимо отличались от аналогичных

Таблица 1. Лабораторные показатели функционального состояния эндотелия

Показатель	Группа			p		
	контроль (n = 20)	ХГС (n = 40)	ЦП (n = 25)	1	2	3
ОА, мкмоль/л	29,4 ± 3,3	18,7 ± 3,0	13,0 ± 4,5	<0,001*	<0,001*	0,01*
Ет-1, фмоль/л	0,3 ± 0,13	0,68 ± 0,23	0,79 ± 0,24	<0,001*	<0,001*	<0,001*
ДЭЦ, 10 ⁴ /л	3,02 ± 1,21	5,89 ± 1,18	8,12 ± 2,67	<0,001*	<0,001*	0,01*
ВЭФР, пг/мл	158,9 ± 72,8	249,5 ± 94,3	375 ± 116,6	0,01*	<0,001*	<0,001*
ФВ, %	80,1 ± 16,2	102,1 ± 22,0	127,1 ± 20,8	<0,001*	<0,001*	0,001*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 4, 5: p₁ — значимость различий в группе контроля и у пациентов с ХГС; p₂ — значимость различий в группе контроля и у пациентов с ЦП; p₃ — значимость различий в группах пациентов с ХГС и ЦП; *p < 0,05.

Таблица 2. Количество и агрегационная способность тромбоцитов

Показатель	Группа			p		
	контроль (n = 20)	ХГС (n = 40)	ЦП (n = 25)	1	2	3
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	250 ± 46,7	210,7 ± 45,9	161 ± 41,5	0,02*	0,01*	< 0,001*
АТ с АДФ, %	59,4 ± 9,8	62,6 ± 15,5	67,3 ± 14,6	0,4	0,1	0,1
АТ с коллагеном, %	61,6 ± 11,2	73,2 ± 15,9	69,3 ± 15,6	0,1	0,07	0,1
АТ с ристоцетином, %	69,3 ± 8,3	81,1 ± 13,81	74,6 ± 17,3	0,004*	0,1	0,2

параметров в контрольной группе (табл. 1). Снижение уровня ОА как при ХГС (p = 0,001), так и при ЦП (p = 0,001) в сочетании с повышением концентрации Ет-1 (p_{1,2} = 0,001) указывает на дисбаланс соединений, влияющих на тонус сосудов. Значимое увеличение количества ДЭЦ у больных ХГС и при ЦП подтверждает наличие выраженного повреждения сосудистого эндотелия при данной патологии. Повышенное содержание ВЭФР у больных ХГС и ЦП свидетельствует о неоангиогенезе и сосудистой перестройке в печени на фоне повреждения эндотелия (p₁ = 0,01, p₂ = 0,001). Активность ФВ как маркера повреждения эндотелия также была статистически значимо повышена: у больных ХГС она составила 102,1 ± 22,0%, а у пациентов с ЦП — 127,1 ± 20,8%. Таким образом, показатели ДЭ были более выраженными при ЦП по сравнению с таковыми у больных ХГС.

Уменьшение выработки ОА и увеличение активности ФВ при хронических диффузных заболеваниях печени обуславливают повышение тромбогенности сосудистой стенки на фоне ДЭ. Такая ситуация частично нивелируется снижением количества тромбоцитов при ХГС за счет выработки антител, а также присоединением гиперспленизма при ЦП [6]. У пациентов обеих групп выявлено значимое снижение уровня тромбоцитов в плазме крови по сравнению с их содержанием у здоровых лиц, причем более выраженное уменьшение наблюдалось в группе больных ЦП (p₃ = 0,0004) (табл. 2).

При сравнительном анализе АТ в группе больных ХГС установлено повышение агрегационной активности тромбоцитов с агонистом ристоцетином (p₁ = 0,0037), что может быть связано с увеличением активности ФВ, который способствует не только адгезии тромбоцитов к коллагену и фибронектину, но и агрегации [2]. У пациентов с ЦП изменений АТ при прямом измерении не зарегистрировано, хотя активность ФВ у них была значимо выше, чем при ХГС. Такой результат может быть обусловлен имеющейся при ЦП тромбоцитопенией. Известно, что образование малых агрегатов (< 50–100 тромбоцитов) при тромбоцитопении может не сказываться на светопропускании суспензии тромбоцитов при исследовании АТ, т. е. приводит к занижению результатов исследования [10].

При проведении корреляционного анализа маркеров функционального состояния эндотелия, количества и агрегационной способности тромбоцитов в группе больных ЦП обнаружена значимая взаимосвязь указанных показателей (табл. 3). Взаимосвязь средней силы между ДЭЦ и ФВ отмечена при ХГС, и сильная — у пациентов с ЦП. Следовательно, чем больше десквамация эндотелиоцитов, тем выше активность ФВ, который присутствует в субэндотелии. Это соответствует современным представлениям о том, что не только ДЭЦ, но и ФВ является специфичным патофизиологическим маркером повреждения эндотелия.

Таблица 3. Корреляции показателей функционального состояния эндотелия, количества и агрегационной активности тромбоцитов

Показатель	ХГС		ЦП	
	r_1	p_1	r_2	p_2
ОА и количество тромбоцитов	0,12	0,45	0,8	< 0,001*
ОА и ристоцетин	-0,19	0,37	-0,52	0,04*
ОА и коллаген	-0,2	0,3	-0,53	0,05*
ОА и АДФ	-0,12	0,4	-0,6	0,05*
Ет-1 и количество тромбоцитов	-0,13	0,47	-0,75	0,004*
Ет-1 и ристоцетин	0,19	0,3	0,63	0,03*
ДЭЦ и количество тромбоцитов	-0,2	0,24	-0,83	< 0,001*
ДЭЦ и АТ с ристоцетином	0,16	0,47	0,5	0,03*
ДЭЦ и АТ с коллагеном	0,06	0,78	0,66	0,01*
ДЭЦ и АТ с АДФ	0,22	0,35	0,8	0,01*
ДЭЦ и ФВ	0,55	0,014*	0,8	< 0,001*
ВЭФР и количество тромбоцитов	-0,07	0,7	-0,94	0,005*
ВЭФР и АДФ	0,11	0,6	0,82	0,04*
ФВ и количество тромбоцитов	-0,16	0,38	-0,94	0,005*
ФВ и ристоцетин	0,31	0,13	0,5	0,04*
ФВ и коллаген	0,28	0,16	0,45	0,04*
ФВ и АДФ	0,19	0,36	0,73	0,01*
Количество тромбоцитов и АТ с ристоцетином	-0,09	0,68	-0,58	0,04*
Количество тромбоцитов и АТ с коллагеном	-0,07	0,7	-0,7	0,01*
Количество тромбоцитов и АТ с АДФ	-0,01	0,9	-0,7	0,01*

Примечание. r_1 — взаимосвязь показателей в группе больных ХГС; r_2 — взаимосвязь показателей в группе больных с ЦП; p_1 — значимость корреляции в группе больных ХГС; p_2 — значимость корреляции в группе больных с ЦП; * $p < 0,05$.

Продемонстрированы положительная взаимосвязь количества тромбоцитов с уровнем ОА и обратные корреляции — с Ет-1, ВЭФР, ФВ. Таким образом, чем более выражено поражение эндотелия, тем ниже содержание тромбоцитов у пациентов с ЦП. Показатели АТ имели отрицательную зависимость от количества тромбоцитов, что свидетельствует о возрастании агрегационной способности тромбоцитов по мере снижения их количества на фоне ДЭ. Выявлены положительная взаимосвязь между параметрами АТ со всеми индукторами и показателями ДЭ (Ет-1, ВЭФР, ФВ) и отрицательные корреляции с ОА.

Снижение уровня тромбоцитов при заболеваниях печени и повышенная активность ФВ могли повлиять на показатели истинной АТ. В связи с этим нами было оценено соотношение ФВ / тромбоциты (табл. 4).

Зафиксировано значимое увеличение соотношения ФВ/тромбоциты при ХГС и ЦП за счет снижения содержания тромбоцитов и повышения активности ФВ на фоне ДЭ. При этом также имелись значимые различия

между пациентами с ХГС и ЦП. Показатель ФВ/тромбоциты при ХГС возрос в 1,5 раза, при ЦП — в 2,3 раза. Путем введения поправочного коэффициента была определена скорректированная способность тромбоцитов к агрегации (табл. 5). Скорректированная АТ продемонстрировала значимое повышение показателей со всеми агонистами как у пациентов с ХГС, так и у больных ЦП.

Таким образом, при определении АТ у пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени на фоне ДЭ с увеличением ФВ и снижением количества тромбоцитов без коррекции результатов продемонстрированы относительно низкие, сопоставимые со здоровыми показатели, хотя в действительности имеются существенные нарушения в системе тромбоцитарного гемостаза. В связи с тем что синтез ФВ происходит и в мегакариocyтах, а АТ может зависеть от разных причин, интересным представляется именно оценка относительного показателя исследуемых параметров. Можно сказать, что чем более выражена ДЭ, тем значительно повышена агрегационная способность тромбоцитов,

Таблица 4. Соотношение ФВ/тромбоциты

Показатель	Группа			p		
	контроль (n = 20)	ХГС (n = 40)	ЦП (n = 25)	1	2	3
ФВ/тромбоциты	0,32 ± 0,07	0,48 ± 0,15	0,74 ± 0,16	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*
Поправочный коэффициент	1	1,5	2,3			

Таблица 5. Скорригированная АТ с различными агонистами

Скорригированная АТ	Группа			p		
	контроль (n = 20)	ХГС (n = 40)	ЦП (n = 25)	1	2	3
С АДФ, %	59,4 ± 9,8	93,9 ± 35,6	154,2 ± 60,0	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*
С коллагеном, %	61,6 ± 11,2	109,8 ± 33,0	159,4 ± 60,1	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*
С ристоцетином, %	69,5 ± 8,26	121,7 ± 23,1	171,6 ± 60,0	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

а это может predispose к образованию пристеночных агрегатов тромбоцитов и нарушению микроциркуляции в печени при ХГС и ЦП. Полученные результаты свидетельствуют о том, что поражение эндотелия является патогенетически неблагоприятным фактором в нарушении кровообращения в печени, приводящим к развитию портальной гипертензии при гепатите и ЦП, а повышение ФВ и стимуляция АТ служат компенсаторным механизмом в отношении развития геморрагического синдрома при снижении содержания тромбоцитов на фоне патологии печени.

Заключение

На фоне ДЭ у больных ХГС и в большей степени — ЦП значительно возрастает активность ФВ, что обуславливает повышение тромбогенности эндотелия. Увели-

чение агрегационной функции тромбоцитов при ХГС общепринятым методом выявляется только при использовании в качестве индуктора ристоцетина, у пациентов с ЦП на фоне снижения количества тромбоцитов показатели агрегации при этом остаются в норме. Взаимосвязь АТ и ДЭ имеет место у пациентов с ЦП, при ХГС значимых корреляций не обнаружено, вероятно, вследствие меньшей выраженности поражения эндотелия. Определение скорригированной агрегационной способности тромбоцитов позволяет выявить у всех больных ХГС и ЦП нарушения тромбоцитарного гемостаза в виде повышения агрегации, что может являться подтверждением патогенетического значения ДЭ в развитии и прогрессировании хронических заболеваний печени и указывает на возможность проведения коррекции обнаруженных нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meigs J.B., Hu F.B., Rifai N., Manson J.E. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. JAMA 2004;297:1978–86.
2. Долгов В.В., Свирич П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М.: Триада, 2005.
3. Marx O.D, Christoph J., Leiting A., et al. Altered thrombus formation in von Willebrand factor-deficient mice expressing von Willebrand factor variants with defective binding to collagen or GPIIb/IIIa. Blood 2008;112(3):603–9.
4. Helmy A., Newby D.E., Jalan R., et al. Enhanced vasodilatation to endothelin antagonism in patients with compensated cirrhosis and the role of nitric oxide. Gut 2003;52:410–5.
5. Коломоец М.Ю., Хухлина О.С., Зоевicka О.С. Состояние системы гемостаза у больных хроническим гепатитом и холециститом. Украинский медицинский журнал 2004;(4):42–5.
6. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты в клинической практике. СПб.: ТЕЗА, 1996.
7. Le Couter J., Moritz D.R., Li B., et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. Science 2003;299:890–3.
8. Щёктова А.П. Дисфункция и повреждение эндотелия при гепатобилиарной патологии. Уральский медицинский журнал 2010;(1):96–9.
9. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюамед, 2001.
10. Gabbasov Z.A., Popov E.G., Gavrilov I.Y., Pozin EYa. Platelet aggregation: the use of optical density fluctuations to study microaggregate formation in platelet suspension. Thromb Res 1989;54(3):215–23.