

ТРОМБОЦИТАРНОЕ ЗВЕНО СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И СОДЕРЖАНИЕ ГОМОЦИСТЕИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ КОКСАРТРОЗЕ

УДК 616.72—002—007.248—074

Поступила 24.05.2010 г.



И.А. Федосеева, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии;
И.Ю. Ежов, к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения ортопедии взрослых;
И.Н. Чарыкова, врач отделения консервации тканей

Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии Минздравсоцразвития, Н. Новгород

Цель исследования — изучение содержания гомоцистеина в сыворотке крови и анализ агрегационной активности тромбоцитов у пациентов, страдающих дегенеративно-дистрофическими заболеваниями тазобедренного сустава (коксартроз).

Материалы и методы. Исследование проводилось у 155 больных коксартрозом и у 45 здоровых — мужчины и женщины 45—65 лет. Изучение агрегационной способности кровяных пластинок выполняли с использованием в качестве индуктора агрегации аденозиндифосфата (АДФ) в малых дозах (1,25 мкг/мл) и коллагена (2,0 мг/мл). Материалом для исследования являлась венозная кровь.

Результаты. Выявлена тенденция к гиперагрегации кровяных пластинок и к увеличению в крови больных содержания гомоцистеина, при этом увеличение концентрации гомоцистеина положительно коррелирует с возрастанием агрегационной активности тромбоцитов. Эти отклонения являются дополнительным фактором, провоцирующим развитие тромботических осложнений.

Заключение. Раннее выявление гипергомоцистеинемии и повышения активности кровяных пластинок, а также своевременное проведение соответствующей терапии могут быть важным звеном в профилактике послеоперационных тромбозов у больных с патологией тазобедренного сустава.

Ключевые слова: коксартроз, гомоцистеин, агрегация тромбоцитов.

English

Platelet component of hemostasis system and the content of homocysteine in blood serum in coxarthrosis

I.A. Fedoseeva, PhD, Senior Research Worker, Biochemical Laboratory;
I.Y. Ezhov, PhD, Leading Research Worker, the Department of Adult Orthopedics;
I.N. Tcharykova, Physician, the Department of Tissue Preservation

Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics of the Ministry of Health and Social Development, Nizhny Novgorod

The aim of the investigation is to study the content of homocysteine in blood serum and the analysis of thrombocyte aggregation activity in patients suffering from degenerative-dystrophic diseases of coxofemoral joint (coxarthrosis).

Materials and methods. There have been examined 155 patients with coxarthrosis and 45 healthy men and women aged 45—65 years old. The platelet aggregation ability has been studied using adenosine diphosphate (ADP) in small doses (1.25 mkg/ml) and collagen (2.0 mg/ml) as an aggregation inductor. Investigation material has been venous blood.

Results. There has been found platelet tendency for hyperaggregation and of homocysteine increase in patients' blood, homocysteine concentration increase correlating positively with the increase of thrombocyte aggregation activity. These deviations are an additional factor promoting the development of thrombotic complications.

Conclusion. Early detection of hyperhomocysteinemia and the increase of platelet aggregation activity as well as appropriate early therapy can be an important part of the prevention of postoperative thromboses in patients with hip pathology.

Key words: coxarthrosis, homocysteine, thrombocyte aggregation.

Гомоцистеин — серосодержащая аминокислота, которая не встречается в естественных белках, употребляемых с пищей, а является промежуточным продуктом обмена аминокислот метионина и цистеина.

Получаемый с пищей в составе белка метионин метаболизируется с образованием **S-аденозилгомоцистеина**, который в результате гидролиза превращается в гомоцистеин. Впервые гомоцистеин был обнаружен в

Для контактов: Федосеева Ирина Александровна, тел. раб. 8(831)436-87-13; e-mail: fedoseeva.58@mail.ru.

1932 г., в 60-е годы описаны генетические изменения, связанные с нарушением его обмена. Взаимосвязь повышения концентрации гомоцистеина в плазме крови с увеличением риска сосудистой патологии достоверно установлена в ходе Фрэмлингемского исследования (1996). Результаты исследования **European Collaborative Study** показали, что **гипергомоцистеинемия** представляет собой независимый модифицируемый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний [1—4].

Высокая концентрация гомоцистеина в крови ведет к созданию негативных условий, которые реализуются за счет нескольких механизмов, приводящих к развитию эндотелиальной дисфункции. В процессе окисления сульфгидрильных групп гомоцистеина образуются реактивные субстанции кислорода, токсичные для клеток эндотелия. Эти соединения приводят к ингибированию эффектов оксида азота, снижают его биодоступность и влияют на чувствительность тканей к нему [5, 6].

В условиях гомоцистеинемии снижается синтез простаглицина, происходит накопление в мембранах клеток и межклеточном пространстве липопротеинов низкой и очень низкой плотности и их окисление, а также уменьшение синтеза серосодержащих гликозаминов, что приводит к снижению эластичности стенок сосудов и их способности к дилатации [7, 8].

Гомоцистеин воздействует также и на процессы тромбогенеза. С одной стороны, повреждение эндотелия способствует активации некоторых факторов гемостаза, с другой — гомоцистеин ингибирует экспрессию тромбомодулина на поверхности клеток. Кроме того, в литературе имеются сведения о том, что гомоцистеин нарушает функцию тканевого активатора плазминогена, блокируя его связывание с эндотелиоцитами, увеличивает сродство липопротеина (а) с фибрином, а также ингибирует функцию естественных антикоагулянтов (антитромбина III и протеина С), повышая активность тромбина. Гомоцистеин способен стимулировать некоторые факторы свертывания крови — V (за счет гомоцистеининдуцированного повреждения эндотелия), X и XII [9—14].

Таким образом, повышенное содержание гомоцистеина в сыворотке крови оказывает неблагоприятное влияние на механизмы, участвующие в регуляции сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, обмена липидов и коагуляционного каскада [15, 16].

Известно, что изменения функциональных свойств тромбоцитов зачастую играют существенную роль в инициации и прогрессировании тромбообразования [17]. С этой точки зрения, исследование состояния тромбоцитарного звена системы гемостаза и содержания гомоцистеина в крови пациентов с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями тазобедренного сустава представляет значительный интерес, так как параллельно существующие нарушения в этих звеньях механизма гемостаза являются дополнительным фактором, провоцирующим развитие тромбоза.

Риск повышенного тромбообразования нередко возникает при эндопротезировании тазобедренного сустава у пациентов, страдающих коксартрозом [18]. Выявление роли различных звеньев механизма раз-

вития тромбоза и оценка факторов, приводящих к его инициации и прогрессированию, будут способствовать пониманию процесса тромбообразования в целом и определению оптимальных принципов лечения таких состояний.

Цель исследования — изучение содержания гомоцистеина в сыворотке крови и анализ агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с коксартрозом.

Материалы и методы. Исследование проводилось у 155 больных коксартрозом (мужчины и женщины в возрасте 45—65 лет). Контрольную группу (n=45) составили здоровые мужчины и женщины аналогичного возраста, не имеющие в анамнезе дегенеративно-дистрофических заболеваний тазобедренного сустава, гипертонической болезни, ИБС и тромботических осложнений. Забор крови для исследования выполняли при поступлении больных в стационар до начала лечебных процедур, в утренние часы. В предшествовавшие исследованию 7—10 дней больные не получали препараты, влияющие на гемостаз (антикоагулянты, дезагреганты, препараты, изменяющие реологические свойства крови).

Изучение агрегационной способности кровяных пластинок проводили на анализаторе агрегации тромбоцитов AP 2110 (SOLAR, Беларусь) с использованием в качестве индуктора агрегации аденозиндифосфата (АДФ) в малых дозах (1,25 мкг/мл) и коллагена (2,0 мг/мл). Материалом для исследования являлась венозная кровь, отбор проб осуществляли в 3,8% цитрат натрия в соотношении 1:9. В процессе исследования оценивали степень и скорость агрегации тромбоцитов, а также рассчитывали разработанный авторами интегральный показатель функциональной активности кровяных пластинок — ИПАТ (интегральный показатель агрегации тромбоцитов) [19]. Оценка ИПАТ позволяет объективизировать и повысить диагностическую значимость характеристики агрегационных свойств кровяных пластинок. С целью вычисления ИПАТ проводили запись процесса агрегации тромбоцитов, при этом в качестве индуктора использовали АДФ и коллаген. На основании результатов регистрации значений степени и скорости агрегации кровяных пластинок, а также данных характера кривой агрегатограммы рассчитывали интегральный показатель. У практически здоровых людей ИПАТ составляет $3,60 \pm 0,28$ ед. ($M \pm m$) и варьирует в пределах 1,6—5,5 ед. ($M \pm 2\sigma$). Достоинство нового способа оценки агрегационной активности кровяных пластинок заключается в том, что анализ различных параметров агрегатограммы при индукции тромбоцитов АДФ и коллагеном является комплексным, а его результат выражается одним показателем.

Определение тромбоцитарной формулы проводили на гематологическом анализаторе ADVIA 60 (Bayer Diagnostics, Германия). Исследовались следующие показатели: количество тромбоцитов, средний объем тромбоцитов, тромбокрит, распределение тромбоцитов по величине.

Гомоцистеин сыворотки крови вычисляли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа, используя соответствующий набор реактивов Axis-Shield (Нор-

вегия). Измерение проводили на фотометре Sunrise TECAN (Австрия). Чувствительность метода определения содержания гомоцистеина составляет 1 мкмоль/л. В условиях нормы данный показатель варьирует в пределах от 4,1 до 15,7 мкмоль/л ($M \pm 2\sigma$). Концентрация гомоцистеина свыше 15,7 мкмоль/л расценивалась нами как гипергомоцистеинемия.

Статистические исследования выполнены с применением программы Stadia [20, 21]. Данные представлены в виде средних арифметических и ошибки средней ($M \pm m$). Существенность различий средних величин оценивали по критерию Стьюдента. Критический уровень значимости «р» при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Обследование пациентов с коксартрозом позволило выявить следующие закономерности. Процесс дезагрегации тромбоцитов был проанализирован у 86 больных; у 8 из них он отсутствовал, что составляет 9,3%. Вторая волна агрегации кровяных пластинок обнаружена у 26 из 86 обследованных (30,2%). Степень агрегации тромбоцитов при индукции процесса малыми дозами АДФ у больных коксартрозом в два раза превышала аналогичный показатель у здоровых людей. Усредненная скорость агрегации кровяных пластинок у больных коксартрозом была выше аналогичного показателя в контрольной группе на 24,7%. Исследование агрегатограммы при индукции агрегации кровяных пластинок коллагеном не выявило статистически значимых изменений (табл. 1).

Таким образом, в результате комплексной оценки агрегатограммы с использованием ИПАТ у пациентов с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями тазобедренного сустава выявлена тенденция кровяных пластинок к гиперагрегации (наличие второй волны агрегации, отсутствие процесса дезагрегации и статистически значимое увеличение степени и скорости агрегации тромбоцитов при индукции малыми дозами АДФ). По результатам оценки степени и скорости агрегации тромбоцитов при индукции процесса коллагеном

Таблица 1

Показатели агрегации тромбоцитов у здоровых людей и пациентов, страдающих коксартрозом ($M \pm m$)

| Показатели | Контрольная группа | Больные коксартрозом |
|--------------------------------|--------------------|----------------------------|
| Индуктор агрегации — АДФ: | | |
| степень агрегации, % | 17,10±1,39 (n=19) | 35,00±1,75 (n=85) p=0,0001 |
| скорость агрегации, %/мин | 24,60±1,48 (n=19) | 30,70±1,27 (n=84) p=0,0001 |
| Индуктор агрегации — коллаген: | | |
| степень агрегации, % | 67,30±1,25 (n=18) | 66,50±1,38 (n=80) p=0,870 |
| скорость агрегации, %/мин | 47,80±3,64 (n=18) | 43,00±2,03 (n=82) p=0,294 |
| ИПАТ, усл. ед. | 3,70±0,15 (n=19) | 5,20±0,19 (n=79) p=0,0001 |

Примечание: р — статистически значимые различия анализируемых показателей в контрольной группе и при коксартрозе.

Таблица 2

Показатели тромбоцитарной формулы у здоровых людей и пациентов, страдающих коксартрозом ($M \pm m$)

| Показатели | Контрольная группа (n=12) | Больные коксартрозом (n=53) |
|--|---------------------------|-----------------------------|
| Количество тромбоцитов, $\times 10^9$ /л | 264,0±19,7 | 271,0±9,7 p=0,844 |
| Средний объем тромбоцитов, фл | 8,10±0,18 | 8,20±0,12 p=0,645 |
| Тромбокрит — суммарный объем тромбоцитов, $\times 10^{-2}$ л/л | 0,21±0,01 | 0,22±0,07 p=0,899 |
| Распределение тромбоцитов по величине, % | 12,70±0,35 | 13,30±0,24 p=0,214 |

Примечание: р — статистически значимые различия анализируемых показателей в контрольной группе и при коксартрозе.

секреторная функция кровяных пластинок при коксартрозе оказалась в пределах нормы.

Результаты исследования кровяных пластинок показали, что количество тромбоцитов, средний и суммарный объемы тромбоцитов у больных коксартрозом практически не отличались от показателей в контрольной группе. Была выявлена лишь нечетко выраженная тенденция к возрастанию показателя распределения тромбоцитов по величине при коксартрозе в сравнении с практически здоровыми людьми (табл. 2).

При исследовании содержания гомоцистеина сыворотки крови у пациентов с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями тазобедренного сустава выявлены следующие результаты. Усредненная концентрация анализируемой аминокислоты у больных коксартрозом составила 12,00±0,48 мкмоль/л ($M \pm m$), что превышало показатели в контрольной группе (9,90±0,45 мкмоль/л) на 17,5% (p=0,0006). У 106 человек из 153 концентрация гомоцистеина в крови была выше среднего уровня контрольной группы, что составило 69,3%. Гипергомоцистеинемия выявлена у 17 человек (11,1%).

Корреляционный анализ показал, что у больных коксартрозом концентрация гомоцистеина в сыворотке крови положительно коррелировала со степенью агрегации тромбоцитов при индукции процесса малыми дозами АДФ (r=0,314; p=0,003) и ИПАТ (r=0,247; p=0,025).

По результатам метаанализа, охватившего 72 публикации и 9 контролируемых исследований, установлено, что при венозных тромбоэмболиях уровень гомоцистеина натошак повышен в 2,95 раза. По мнению авторов, гомоцистеин является независимым фактором риска развития тромбо-васкулярной болезни, если его уровень в сыворотке крови превышает 8—10 мкмоль/л. Концентрация 11,1—15,0 мкмоль/л оценивается как умеренная гипергомоцистеинемия, что уже создает опасность нежелательного взаимодействия этого метаболита с клетками крови и сосудистой стенкой, особенно в сочетании с дополнительными факторами риска (гипертензия, курение, ожирение и др.), которые

являются условиями для развития тромбоскулярной болезни [22].

Наши исследования показали, что у подавляющего большинства пациентов, страдающих дегенеративно-дистрофическими заболеваниями тазобедренного сустава, содержание гомоцистеина сыворотки крови находится в пределах 11,0—15,8 мкмоль/л (табл. 3).

На основании содержания гомоцистеина в сыворотке крови больные коксартрозом были разделены на три группы: 1-я группа — с нормальным содержанием гомоцистеина; 2-я группа — с умеренной гипергомоцистеинемией; 3-я группа — с высоким содержанием исследуемого метаболита (табл. 4). Полученные результаты показывают, что ИПАТ и степень агрегации тромбоцитов при индукции малыми дозами АДФ находятся в прямо пропорциональной зависимости от уровня содержания гомоцистеина в сыворотке крови.

В условиях нормы эндотелиальные клетки снижают неблагоприятный эффект этой аминокислоты путем образования релаксирующего фактора EDRF (**Endothelium Derived Relaxing Factor**), который участвует в превращении гомоцистеина в S-нитрозогомоцистеин. При высоком содержании циркулирующего гомоцистеина он не может быть полностью нейтрализован из-за возникающей недостаточности синтеза релаксирующего фактора, однако даже в небольших количествах этот метаболит обладает выраженной цитотоксической активностью по отношению к эндотелию [23].

Таким образом, в результате проведенного исследования некоторых показателей сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и содержания гомоцистеина в сыворотке крови были выявлены следующие закономерности.

1. При исследовании тромбоцитарной формулы у пациентов, страдающих коксартрозом, не обнаружено

значительных отклонений при сравнении с аналогичными показателями в контрольной группе, за исключением нечетко выраженной тенденции к возрастанию уровня неоднородности распределения тромбоцитов по величине ($p=0,214$).

2. Анализ агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с коксартрозом показал статистически значимое возрастание степени и скорости агрегации тромбоцитов, отсутствие дезагрегации и наличие второй волны агрегации у части больных при индукции процесса АДФ в малых дозах, а также увеличение интегрального показателя агрегации тромбоцитов, что свидетельствует о гиперактивности кровяных пластинок. Секреторная функция исследуемых клеток крови (индуктор — коллаген) оставалась без изменения.

3. Частота встречаемости гипергомоцистеинемии в сыворотке крови у больных коксартрозом оказалась выше, чем в контрольной группе.

4. При сравнении показателей агрегационной активности тромбоцитов (степени агрегации тромбоцитов при индукции АДФ и ИПАТ) и содержания гомоцистеина в сыворотке крови у пациентов с коксартрозом обнаружена положительная зависимость между этими величинами.

Заключение. Выявленные изменения в обмене гомоцистеина и повышение агрегационной активности кровяных пластинок у пациентов с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями тазобедренного сустава указывают на их тесную взаимосвязь, поэтому раннее обнаружение гипергомоцистеинемии (при поступлении пациентов в клинику), своевременное проведение соответствующей терапии, направленной на снижение содержания гомоцистеина, а также использование комплекса дополнительных противотромботических мероприятий будут являться важным звеном в системе профилактики послеоперационных тромбозов.

Таблица 3

Распределение пациентов по уровню содержания гомоцистеина в сыворотке крови у здоровых людей и пациентов, страдающих коксартрозом, абс. число/%

| Группы | Содержание гомоцистеина, мкмоль/л | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|----------|-----------|------------|
| | до 8,0 | 8,1—10,9 | 11,0—15,7 | более 15,8 |
| Контрольная (n=44) | 15/34,1 | 12/27,3 | 15/34,1 | 2/4,5 |
| Больные коксартрозом (n=153) | 17/11,1 | 48/31,4 | 71/46,4 | 17/11,1 |

Таблица 4

Соотношение показателей агрегационной активности тромбоцитов и содержания гомоцистеина в сыворотке крови больных коксартрозом (M±m)

| Больные | Содержание гомоцистеина, мкмоль/л | Степень агрегации тромбоцитов (АДФ), % | ИПАТ, усл. ед. |
|-------------------|-----------------------------------|--|----------------|
| 1-я группа (n=16) | 8,20±0,28 | 36,50±3,14 | 5,40±0,34 |
| 2-я группа (n=48) | 11,90±0,21 | 48,90±2,86 | 6,50±0,24 |
| 3-я группа (n=15) | 22,30±1,73 | 60,90±4,62 | 7,40±0,42 |

Литература

- Graham M., Daly L., Refsum H. et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *Lancet* 1997; 22(3): 1775—1781.
- Hankey G., Eikelboom J. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407—413.
- Mayer E., Jacobsen D., Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 517—527.
- Stampfer M., Malinow M. Can lowering homocysteine levels reduce cardiovascular risk? *N Engl J Med* 1995; 33: 328—329.
- Шмелева В.М., Рыбакова Л.И. Состояние окислительных и антиокислительных систем у больных с атеросклерозом при наличии и отсутствии гипергомоцистеинемии. *Казанский медицинский журнал* 2008; 3: 281—285.
- Fu W., Dudman N., Perry M., Wang X. Homocysteinemia attenuates hemodynamic responses to nitric oxide in vivo. *Atherosclerosis* 2002; 161(3): 169—176.
- Баркаган З.С. Воспалительная концепция атеротромбоза и перспективы вазопротекторной профилактики

- и терапии больных пожилого и старческого возраста. Клиническая геронтология 2003; 1: 25—31.
8. *Белая О.Л., Федорова Н.В.* Изучение содержания гомоцистеина, липидов и продуктов их перекисного окисления в сыворотке крови у больных ишемической болезнью сердца. Клиническая медицина 2005; 11: 30—33.
 9. *Баркаган З.С., Котовщикова Е.Ф., Костюченко Г.И.* К вопросу о частоте сочетаний гиперагрегации тромбоцитов и гипергомоцистеинемии при тромбоэмических процессах. Тромбоз, гемостаз и реология 2004; 3: 36—45.
 10. *Васильев С.А., Виноградов В.Л.* Роль наследственности в развитии тромбозов. Тромбоз, гемостаз и реология 2007; 3: 3—15.
 11. *Сидоркина А.Н., Сидоркин В.Г., Преснякова М.В.* Биохимические основы системы гемостаза и диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови. Н. Новгород: Изд-во ННИИТО; 2008; 154 с.
 12. *Тарханова И.Ю., Фазлыев М.М., Мирсаева Г.Х.* Влияние гомоцистеина на гемостаз у больных артериальной гипертензией. В кн.: Материалы 4-й Всерос. научной конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии». М; 2009; с. 511.
 13. *Цыбиков Н.Н., Цыбикова Н.М.* Влияние гипергомоцистеинемии на систему гемостаза. Тромбоз, гемостаз и реология 2007; 4: 9—13.
 14. *Шитикова А.С.* Тромбоцитопатии, врожденные и приобретенные. Под ред. Л.П. Папаян, О.Г. Головиной. СПб: ИИЦ ВМА; 2008; 320 с.
 15. *Genser D.* Homocysteine, vitamins and restenosis after percutaneous coronary intervention. Cardiovasc Rev Rep 2003; 24(5): 253—258.
 16. *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.
 17. *Welch G., Upchurch G., Loscalo J.* Hyperhomocysteinemia and atherothrombosis. Ann NY Acad Sci 1997; 81: 48—58.
 18. *Коршунов Г.В., Пучиньян Д.М., Коршунов А.Г.* Коагуляционные и реологические свойства крови у больных с травмами и заболеваниями опорно-двигательной системы. В кн.: Материалы 1-й Всерос. научной конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии». М; 2003; с. 66.
 19. *Сидоркин В.Г., Чулошникова И.А. (Федосеева И.А.), Сидоркина А.Н., Преснякова М.В.* Способ оценки агрегационных свойств тромбоцитов. Пат. 2213976 РФ, МПК G01 N 33/48. 2003.
 20. *Кулаичев А.П.* Методы и средства анализа данных в среде Windows. Stadia 6.0. М: Информатика и компьютеры; 1998; 270 с.
 21. Анализ данных на компьютере. Под ред. В.Э. Фигурнова М: ИНФРА-М; 1995; 384 с.
 22. *Ефимов В.С., Цакалоф А.К.* Гомоцистеинемия в патогенезе тромбоваскулярной болезни и атеросклероза. Лабораторная медицина 1999; 2: 44—48.
 23. *Козлова Т.В.* Гипергомоцистеинемия как клиническое проявление риска тромбозов. Клиническая медицина 2005; 2: 9—12.