

УДК: 616.13/14-002:612.111:544.77.052.2:612.112:576.52

О.О. Урясьєва

АНАЛІЗ МЕХАНІЗМІВ ЗМІНИ АГРЕГАЦІЇ ЕРИТРОЦИТІВ І АДГЕЗІЇ ЛЕЙКОЦИТІВ У ХВОРИХ НА КРІОГЛОБУЛІНЕМІЧНИЙ ВАСКУЛІТ

*Дніпропетровська державна медична академія
кафедра терапії і сімейної медицини, факультет післядипломної освіти
(зав.- д.мед.н., проф. А.М.Василенко)
м. Кривий Ріг*

Ключові слова:

*кріоглобулінемічний васкуліт,
мікрореологічна активність
еритроцитів та лейкоцитів,
мікроциркуляція*

Key words: *cryoglobulin vasculitis,
microrheological activity of
erythrocytes and leukocytes,
microcirculation*

Резюме. *Проведено дослідження патогенетических механізмів і сигнальних шляхів зміни агрегації еритроцитів і адгезії лейкоцитів при порушеннях судинного тону в умовах запалення у хворих КГВ, а також визначення характеру гемореологічного профіля, вираженого в збільшенні в'язкості крові при низьких швидкостях зсувів в кореляції з агрегацією еритроцитів. Розраховані коефіцієнти кореляції стосовно досліджуваних станів організму, при яких спостерігається підвищення мікрореологічної активності еритроцитів і лейкоцитів, зміни опору кровотоку і зниження транспортної спроможності крові, особливо на рівні мікроциркуляції. Сформульовані висновки стосовно процесів агрегації еритроцитів і адгезії лейкоцитів, їх впливу один на одного і ініціювання шляхом активації загальних сигнальних шляхів.*

Summary. *In patients with cryoglobulinemic vasculitis (CGV), research of pathogenetic mechanisms and signal ways of changes of erythrocyte aggregation and leukocytes adhesions in disorders of a vascular tone in the conditions of inflammation, character of hemorheological profile definition, expressed in increase of blood viscosity at low speeds of shifts in correlation with erythrocytes aggregation is conducted. Correlation coefficients with regard to the investigated conditions of an organism especially at microcirculation level at which microrheological activity of erythrocytes and leukocytes increases, blood flow resistance changes, transport potential of blood decreases are calculated. Conclusions concerning processes of erythrocytes aggregation and leukocytes adhesions, their influences on each other and initiation by activation of the general signal ways are drawn.*

Змішана кріоглобулінемія (ЗК) - системний васкуліт, пов'язаний із проліферацією клонів В-клітин, що синтезують "патогенний" імуноглобулін (Ig). ЗК супроводжується розвитком широкого спектру клінічних проявів, виразність яких варіює від вираженого шкірного васкуліту за типом пурпури, артралгій і астенії (синдром ЗК) до тяжких неврологічних порушень і ураження нирок. На сьогодні переконливо доведена роль вірусу гепатиту С (ВГС) у розвитку ЗК (60-90% пацієнтів), а в 36-55% пацієнтів, інфікованих ВГС, розвивається кріоглобулінемія. При цьому у 15-20% пацієнтів зі ЗК, асоційованою із ВГС, розвивається тяжкий васкуліт, який під час не ефективного лікування може привести до летального результату в 15-20% із кріоглобулінемічним васкулітом (КГВ), пов'язаним із ВГС, і в 50% – зі ЗК. Активація імунними комплексами, біологічно активними речовинами з наступним роз-

витком каскаду тромбоцитарних реакцій також відіграє важливу роль у розвитку порушення мікроциркуляції, мікротромбоутворення, ішемії й ушкодження тканин при даній патології [1,3,9].

У системі мікроциркуляції ефективність кровотоку й судинний опір значною мірою залежать від таких мікрореологічних характеристик, як агрегація еритроцитів і адгезія лейкоцитів [4, 8]. Агрегація еритроцитів реалізується, в основному, у венолярному відділі мікросудинного русла й створює до 60% опору в цьому судинному сегменті. Завдяки адгезії лейкоцитів до судинного ендотелія вони можуть бути перешкодою руху еритроцитів [7].

При багатьох патологічних станах негативно змінюється весь комплекс реологічних характеристик крові, що погіршує її транспортний потенціал [2]. Одним із компонентів цих порушень є агрегація еритроцитів [6]. Механізми її

зміни є предметом численних досліджень у фундаментальних і прикладних науках [5, 9]. У клінічній практиці її розглядають як один із патогенетичних механізмів розвитку захворювань і їхніх ускладнень [3].

При такому патологічному стані, як запалення, спостерігають підвищену агрегацію еритроцитів і виражену адгезію лейкоцитів [2]. Сумісна гіперактивація цих клітин приводить до утруднення кровотоку на рівні мікроциркуляції через оклюзію капілярів активованими лейкоцитами [3]. При цьому лейкоцит може зупинити рух від 50 до 700 еритроцитів у мікросудині, внаслідок чого розвивається локальна ішемія [2].

Незважаючи на велику кількість робіт, присвячених вивченню агрегації еритроцитів і адгезії лейкоцитів, механізми їхніх змін при різних патологічних станах залишаються недостатньо вивченими. Не проведено дослідження поза- і внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, асоційованих зі змінами агрегації й адгезії клітин крові. Не вивчені можливі молекулярні мішені, діючи на які можна домогтися корекції порушень мікрореологічних властивостей клітин крові.

Взаємодія активованих тромбоцитів з ендотелієм є однією з причин надбаня інтимою судин протромботичних властивостей, що призводить до прогресуючих судинних порушень [4, 7]. Клінічно це проявляється синдромом трофічних розладів, ішемічним синдромом, а також геморагічним синдромом [8, 9]. Розробка в дослідженні комплексного підходу до діагностики порушень гемостазу, динамічної оцінки його змін дозволяє запобігти розвитку ускладнень захворювання.

Мета роботи: дослідження патогенетичних механізмів і сигнальних шляхів змін агрегації еритроцитів і адгезії лейкоцитів при порушеннях судинного тону в умовах запалення у хворих на КГВ; визначення характеру гемореологічного профілю, що є вираженим у збільшенні в'язкості крові при низьких швидкостях зрушення, у кореляції з агрегацією еритроцитів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Визначення концентрації антигену фактора Вілебранда (ФВ:Аг) у сироватці крові проводилося за допомогою твердофазного імуоферментного методу з використанням комерційних реактивів за міжнародними стандартами.

Для оцінки ступеня деформації еритроцитів розраховували індекс ригідності (Тк) за формулою: $Tk = (\eta_o^{0,4} - 1) / \eta_o^{0,4} \cdot Hct$,

де η_o – відносна в'язкість суспензії, Hct – гематокрит (у відносних величинах).

Розрахунки цього показника проводили для суспензій еритроцитів із гематокритом 0,40 (40%) і постійною в'язкістю суспензійного середовища [6].

Агрегацію еритроцитів вимірювали шляхом прямої мікроскопії суспензій еритроцитів в аутологічній плазмі з наступною комп'ютерною обробкою зображення. При агрегатометрії реєстрували число агрегатів і кількість неагерованих еритроцитів. Розраховували відношення числа агрегатів до кількості неагерованих клітин і це відношення розглядали як показник агрегації еритроцитів (індекс агрегації).

Для стандартизації реологічних вимірів і комплексної оцінки отриманих при дослідженні даних використовували наступний порядок подання результатів виміру: 1 – в'язкість крові при високій напрузі зрушення, 2 – в'язкість крові при відносно низькій напрузі зрушення, 3 – в'язкість плазми, 4 – гематокрит, 5 – в'язкість суспензії еритроцитів у буфері, 6 – індекс ригідності еритроцитів (Тк), 7 – показник агрегації еритроцитів (усереднені дані трьох індексів), 8 – білок плазми. На основі вищевказаних даних, отриманих при вимірюванні реологічної картини крові, розраховували розходження у відсотках стосовно обраного контролю.

Індекс лейкоцитарної адгезії (ІЛА) визначали шляхом співвідношення підрахованого числа лейкоцитів у пробі крові після фільтрації до числа лейкоцитів у пробі крові до фільтрації [6]. Отриманий результат відображали у відсотках:

$$ILA = (L_1 - L_2) \times 100 / L_1,$$

де L_1 – вихідна кількість лейкоцитів; L_2 – кількість лейкоцитів після фільтрації.

Статистичну обробку отриманих цифрових матеріалів, включаючи кореляційний і регресійний аналіз, проводили на РС IBM, використовуючи табличний редактор Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Підвищення спонтанної агрегації тромбоцитів служить безумовною ознакою активації первинного гемостазу. У хворих на КГВ (100), включених у дослідження, таке підвищення зустрічалося у 80% випадків, відзначалися прямі кореляційні зв'язки між підвищенням спонтанної агрегації тромбоцитів і таких ознак, як пурпура, що пальпується (0,2155, $p < 0,01$), синдром Рейно (0,1922, $p < 0,01$), а також активністю запального процесу у хворих - підвищенням ANA (0,2632, $p < 0,01$); рівнем ревматоїдного чинника (РЧ) (0,250, $p < 0,05$); зниженням комплементу (СН50; С4) (0,1760, $p < 0,01$). Маркерами активації системи тромбоцитарного гемостазу, за даними низки досліджень, є підвищення індукованої

агоністами агрегації тромбоцитів. Одним із таких агоністів є ристоцетин, який побічно може також відображати ступінь активації ендотелія, тому що залежить від концентрації фактора фон Вілебранда і його активності в плазмі крові. В нашому дослідженні у 70% хворих встановлено підвищення ступеня агрегації тромбоцитів із ристоцетином, що корелювало з індексом активності (0,3407, $p < 0,05$), наявністю в пацієнтів ознак синдрому Рейно (0,1922, $p < 0,01$). Агрегація тромбоцитів під дією індуктора колагену свідчить про стан пулу зберігання тромбоцитів, а саме, зменшується при виснаженні цього пулу. Виснаження ж гранул зберігання тромбоцитів тим більше, чим більше вираженою і тривалою є активація тромбоцитів.

Підвищення вмісту в плазмі крові антигену ФВ є одним з основних лабораторних маркерів ушкодження ендотелія кровоносних судин. У даному дослідженні таке підвищення зафік-

совано у 80% хворих і достовірно корелювало зі ступенем вираження судинних порушень (сітчасте ліведо, кропивниця, виразково-некротичний ангіт (0,1467, $p < 0,05$), ураженням периферичної нервової системи (0,1441, $p < 0,01$), нирок (0,1481, $p < 0,01$), залученням суглобів та м'язів, ураженням слинних залоз (0,1321, $p < 0,01$), ознаками синдрому Рейно (0,1681, $p < 0,01$), рівнем Ig-РЧ та Ig (anti-HCV) (0,1754, $p < 0,01$). Зростання рівню ФВ Аг співпадало з підвищенням індексу клінічної активності васкуліту ($8,79 \pm 6,1$).

Результати дослідження гемореологічного профілю у хворих на КГВ свідчили про негативну зміну його макро- і мікрореологічних характеристик. Аналіз факторів, що визначають плинність цільної крові в даній групі спостережень, показав, що вона знижувалася як за рахунок приросту в'язкості плазми, так і через більш високий гематокрит.

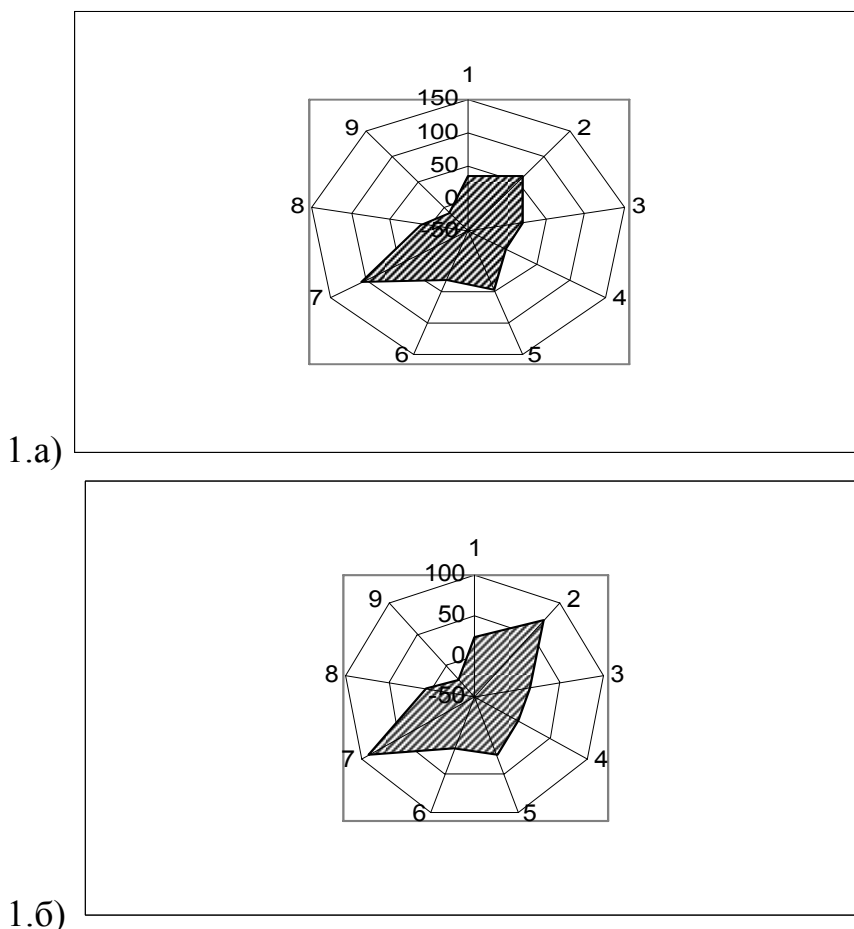


Рис. 1. Зміни гемореологічного профілю у хворих на КГВ (%)

1 – в'язкість крові при високій нарузі зрушення, 2 – в'язкість крові при відносно низькій нарузі зрушення, 3 - в'язкість плазми, 4 - гематокрит, 5 - в'язкість суспензії еритроцитів у буфері, 6 - індекс ригідності еритроцитів (Тк), 7 - показник агрегації еритроцитів (усереднені дані трьох індексів), 8 - білок плазми, 9 - індекс ефективності доставки кисню в тканини (Hct/*).
 1. а) без ознак синдрому Рейно; 1. б) з ознаками синдрому Рейно

У мікрореологічній частині профілю виявлене підвищення ригідності й агрегації еритроцитів.

Висока в'язкість крові при низьких швидкостях зрушення значною мірою може бути зумовлена

агрегацією еритроцитів. Було встановлено, що показник агрегації еритроцитів у групі осіб з ознаками Рейно був на 90% ($p < 0,01$) вище, ніж без таких. Підвищена агрегація могла позначитися на величині АТ, оскільки вона є причиною зміни в'язкості цільної крові при низьких величинах напруги зрушення, що у свою чергу позитивно корелює з діастолічним артеріальним тиском. Найбільш виражено змінювалася агрегація еритроцитів. Цілком імовірно, що високий ступінь приросту в'язкості крові, вимірюваної при низьких напругах зрушення, значною мірою зумовлений агрегацією еритроцитів. На це вказувала позитивна кореляція між цими двома характеристиками ($r = 0,580$; $p < 0,05$). Відомо, що неньютонівська поведінка крові (підвищення в'язкості при зниженні швидкості або напруги зрушення) значною мірою зумовлена зворотною агрегацією еритроцитів. Кореляційний аналіз показав, що між в'язкістю при низькому швидкісному зрушенні й показником агрегації еритроцитів в осіб із КГВ є позитивний зв'язок ($r = 0,620$; $p < 0,05$).

У мікроциркуляторному руслі на ефективність кровотоку впливають не тільки реологічні властивості еритроцитів, але й поведінка лейкоцитів (1). При аналізі проб крові у осіб з ознаками синдрому Рейно виявлена надмірна кількість лейкоцитів. Різниця з контролем склала майже 20% ($p < 0,05$). Підвищений рівень лейкоцитів у крові розглядається як фактор ризику для системи мікроциркуляції. При цьому між величиною адгезії лейкоцитів і їхнім загальним числом у пробі крові встановлена помітна кореляція (0,846; $p = 0,011$). У контролі взаємозв'язок концентрації лейкоцитів зі ступенем їхньої адгезії був не настільки вираженим ($r = 0,56$). Це стосувалося й адгезії клітин. Було виявлено, що в осіб із синдромом Рейно величина адгезії лейкоцитів була вище (34%). Отже, зі зміною стану судин спостерігається підвищення в'язкості цільної крові, як за рахунок

макрореологічних параметрів (гематокрит, в'язкість плазми), так і через мікрореологічні зміни самих еритроцитів (деформованість і агрегація клітин).

У свою чергу, була виявлена деяка позитивна кореляція між агрегацією еритроцитів і адгезією лейкоцитів. Коефіцієнт кореляції склав 0,482; ($p < 0,05$). Це може бути свідченням того, що або процеси агрегації еритроцитів і адгезії лейкоцитів впливають один на одного, або вони можуть ініціюватися шляхом активації загальних сигнальних механізмів.

Виявлене в нашому дослідженні збільшення ступеня адгезії лейкоцитів в осіб із КГВ може привести до утруднення кровотоку на рівні мікроциркуляції через оклюзію капілярів адгезованими лейкоцитами.

Отже, плинність крові при низьких швидкостях зрушення в значній мірі залежить від зворотної агрегації еритроцитів (у середньому на 28-36%). Це може бути свідченням того, що процеси агрегації еритроцитів і адгезії лейкоцитів або впливають один на одного, або вони можуть ініціюватися шляхом активації загальних сигнальних шляхів. Один із шляхів для трансдукції сигналу із зовнішнього середовища на мембранні рецептори еритроцитів може бути асоційований з катехоламінами. Відомо, що на мембрані людських еритроцитів і лейкоцитів є функціонально активні адренорецептори [9]. Після інкубації еритроцитів з адреналіном (10^{-6} М) спостерігали підвищення агрегації на 63% ($p < 0,05$). Якщо адреналін вірогідно підвищував агрегацію еритроцитів на 50% ($p < 0,01$), то попередня інкубація еритроцитів із папаверином знижувала досягнуте підвищення на 32% і 58%, відповідно (рис.2). Отже, при активації клітинного поводження катехоламінами можуть включатися різні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, які діють антагоністично та зменшують проагрегаційну дію адреналіну.

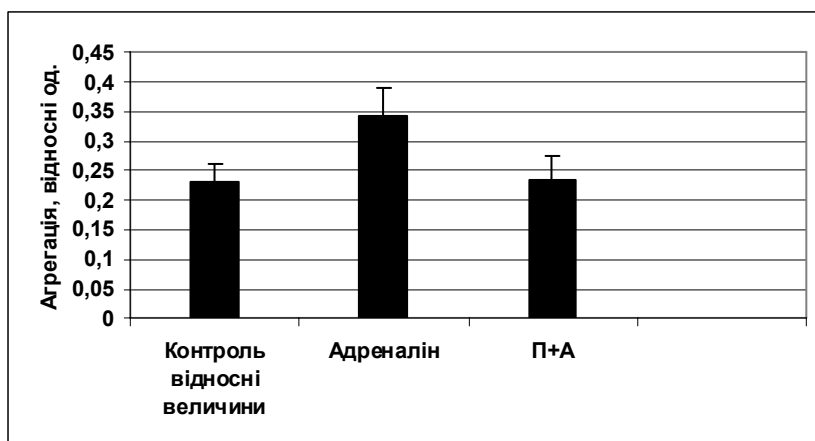


Рис.2. Зміна агрегації еритроцитів під впливом адреналіну і його сполучень із папаверином (П+А)

ПІДСУМОК

Таким чином, у хворих на кріоглобулінемічний васкуліт спостерігається підвищення мікрореологічної активності еритроцитів і лейкоцитів, що може істотно позначитися на опорі кровотоку й зниженні транспортного потенціалу крові, особливо на рівні мікроциркуляції. Було

встановлено, що така мікрореологічна характеристика, як агрегація еритроцитів, помітно корелює з низькоздвиговою в'язкістю крові. Отже, плинність крові при низьких швидкостях зрушення в значній мірі залежить від зворотної агрегації еритроцитів (у середньому на 26-38%).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анализ действия гормонов и их синтетических аналогов на микрореологических свойств эритроцитов/ Замышляева, М.В., Булаева, С.В., Маймистова, А.А., Муравьев, А.В. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция.- 2007.- Т.6, №2(22).- С. 18-23.

2. Влияние агрегации эритроцитов и адгезии лейкоцитов на текучесть крови у больных системной красной волчанкой / Чадаева, М.В., Замышляев А.В., Зубова Н.В., Майнугин С.В. // Тез. докл. междунар. конф. по гемореологии в микро- и макроциркуляции.- Ярославль, 2005.- С. 16.

3. Влияние разной величины гематокрита на адгезию лейкоцитов/ Чадаева М.В., Михайлов П.В., Муравьев А.А., Майнугин С.В. // Тез. докл. междунар. конф. по гемореологии в микро - и макроциркуляции.- Ярославль, 2005.- С.192.

4. Замышляева М.В., Замышляев А.В. Механизмы изменения агрегации эритроцитов и адгезии лейкоцитов в патофизиологических условиях // Материалы Всерос. науч. конф. с междунар. участием «Микроциркуляция в клинической практике». – М., 2006. - С.64.

5. Изменение микрореологических свойств эритроцитов под влиянием адреналина/ Замышляева М.В., Муравьев А.В., Булаева С.В. и др. // Тез. докл.

междунар. конф. по гемореологии в микро - и макроциркуляции.- Ярославль, 2007.- С.143.

6. Кузьміна А.П., Маркова О.Я. Спосіб прогнозування розвитку аутоімунної кризи. Деклар. патент №55244А G01№33/48, G01№33/50 від 17.03.03.

7. Чадаева М.В., Замышляев А.В. Влияние адренормиметиков на адгезию лейкоцитов // Тез. докл. междунар. конф. по гемореологии и микроциркуляции. – Ярославль, 2003. – С.20.

8. Чадаева М.В., Замышляев А.В. Влияние на адгезию лейкоцитов агонистов адренорецепторов и проникающего аналога цАМФ // Тез. докл. междунар. конф. по гемореологии в микро- и макроциркуляции.- Ярославль, 2005.- С.211.

9. Чадаева М.В., Замышляев А.В., Аршинов А.В. Зависимость реологических изменений от активности воспалительного процесса при системной красной волчанке и системной склеродермии // Тез. докл. междунар. конф. по гемореологии и микроциркуляции. – Ярославль, 2003. – С.59.

10. Чадаева М.В., Замышляев А.В., Зубова Н.В. Реологические нарушения у больных геморрагическим васкулитом // Сб. науч. тр. "Актуальные проблемы современной ревматологии". – Волгоград, 2005. – С. 44-45.

