

УДК 616.151.514-074

**СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА ПРИ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИИ
И ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ****Н. А. Костко, Г. М. Костин****Минский консультационно-диагностический центр**

При хроническом миелолейкозе и истинной полицитемии нарушения гемостаза выявлены на тех стадиях, где непосредственно участвует тромбоцитарный компонент, а именно на заключительном этапе формирования кровяного сгустка и на уровне первичного клеточного гемостаза. Скрининговые тесты вторичного гемостаза, отражающие работу только плазменных факторов, были практически сохранены в границах нормы (кроме АЧТВ). Гипокоагуляция 1 фазы, возможно, связана с наличием патологических антикоагулянтов. Таким образом, исходя из полученных данных, можно предположить, что в основе патогенеза тромбозов и геморрагий при данных заболеваниях в патологических сдвигах гемостаза тромбоцитарный компонент играет существенную роль. Дефектность тромбоцитов, в свою очередь, является следствием происхождения их из неопластического клона мегакариоцитов.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, истинная полицитемия, гемостаз, тромбоцит, функция

**THE SYSTEM OF HEMOSTASIS FOR POLYCYTHEMIA
AND CHRONIC MYELOLEUKOSIS****N. A. Kostko, G. M. Kostin****Minsk Consultative Diagnostic Center**

It has been discovered that for chronic myeloleukosis and polycythemia changes of a hemostasis are typical at those stage where directly participates platelet component, namely at the final stage of a blood clot formation and at a level of a platelet hemostasis. We demonstrate: on the background of normal or increased platelets level, saved based secondary hemostasis tests, the combination of hyperfibrinolysis, decrease in a clot volume, its density and a general hemostatic parameter results in functionally defective blood clot formation, which, in its turn, testifies about hemorrhagic risk.

Key words: chronic myeloleukosis, polycythemia, hemostasis, platelet, function

Одной из причин, угрожающих жизни пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями, являются осложнения, наблюдаемые со стороны системы гемостаза: инфаркты органов, язвенно-некротические проявления гангрены конечностей, внутренние кровотечения, ДВС-синдром и т. д. [1, 2].

Хронический миелолейкоз и истинная полицитемия (синонимы: эритремия, болезнь Вакеза) являются наиболее распространенными миелопролиферативными заболеваниями. Заболеваемость приблизительно одинакова при обеих нозологиях и составляет 1,0–1,5 на 100 000 человек в год [1, 2, 5].

В настоящее время ощущается недостаток адекватных методов, пригодных

для отбора больных ХМПЗ по группам риска развития тромбозов и кровоточивости. Недостаточно разработаны и вопросы тактики лечения и профилактики осложнений в системе гемостаза при данных патологиях. Существующие литературные данные зачастую противоречивы, так как основываются на результатах ограниченного количества методов без учета их информативности [5]. В связи с этим необходимо разработать алгоритм доступных методов для лабораторного мониторинга гемостаза при ХМПЗ для своевременного предупреждения возможных осложнений, а также быстрой и грамотной коррекции уже возникших нарушений.

Материалы и методы исследований

На базе клинико-диагностической лаборатории Минского консультационно-диагностического центра (МКДЦ) проведено исследование системы гемостаза у пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) — $n = 50$ и истинной полицитемией (ИП) — $n = 53$. Все обследованные пациенты находятся на диспансерном учете в МКДЦ. Контрольную группу ($n = 30$) составили здоровые доноры обоего пола, сопоставимые по возрасту.

Взятую путем пункции периферической вены венозную кровь стабилизировали 3,8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 1:9.

Экспериментальная часть включала исследование плазменного и тромбоцитарного гемостаза.

На первом этапе каждому пациенту проводили оценку плазменного гемостаза с помощью основных скрининговых тестов на каждую фазу свертывания крови:

1 фаза: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ);

2 фаза: протромбиновое время (международное нормализованное отношение — МНО);

3 фаза: тромбиновое время (ТВ) и концентрация фибриногена (Фиб);

4 (посткоагуляционная) фаза: ретракция кровяного сгустка, спонтанный фибринолиз, объем (V) и плотность сгустка (S), показатель гемостатической полноценности сгустка (Т).

Хронометрические показатели регистрировали на фотооптическом четырехканальном гемокоагулометре СТ — 2410 фир-

мы «Солар» (Беларусь) с использованием реагентов производства фирмы «Ренам» (Россия). Оценку свойств кровяного сгустка выполнили с использованием метода «Одновременного определения времени свертывания крови, ретракции, спонтанного фибринолиза и гемостатических свойств кровяного сгустка» (по Е. П. Иванову) [3].

Исследование первичного тромбоцитарного гемостаза включало: подсчет количества тромбоцитов, оценку агрегационных свойств тромбоцитов.

Подсчет количества тромбоцитов (Тр) венозной крови осуществляли с помощью гематологического анализатора «System 9000» фирмы «Serono diagnostics». Агрегационную активность пластинок оценивали фотометрическим методом с использованием турбидиметрического агрегометра тромбоцитов AP-2110 фирмы «Солар» (Беларусь). Агрегатометрия выполнена со следующими индукторами: раствором натриевой соли АДФ в 4 концентрациях: 0.5; 1.5; 2.5; $5,0 \times 10^{-6}$ М/л, гидрохлоридом адреналина (АДР) в конечной концентрации $5,0 \times 10^{-6}$ М/л и раствором коллагена (КОЛ) 2,0 мг/мл.

Данные обработаны с использованием статистической программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

Тромбоцитоз характерен для всех хронических миелопролиферативных заболеваний, однако случаи с нормальным уровнем тромбоцитов также нередки. Для исследования в каждой нозологии были отобраны больные с нормальным ($150,0 - 450,0 \times 10^9/\text{л}$) и повышенным ($>450,0 \times 10^9/\text{л}$) уровнями тромбоцитов (табл. 1).

Таблица 1

Количество тромбоцитов в исследованных группах при хроническом миелолейкозе и истинной полицитемии, $X \pm S_x$

Параметр	Исследованные группы		
	контроль, $n = 30$	ХМЛ, $n = 50$	ИП, $n = 53$
Тр, $1 \times 10^9/\text{л}$	$310 \pm 9,8$	$728,4 \pm 81,1$ (150–2771)	$538,2 \pm 26,1$ (153–1016)

Оценка плазменного гемостаза.

Для характеристики коагуляционного гемостаза в обеих когортах пациентов с хроническим миелолейкозом и истинной полицитемией были выполнены базисные тесты,

принятые в Республике Беларусь, а именно: АЧТВ, МНО, ТВ и количество фибриногена. Предварительно определение аналогичного спектра коагулологических параметров было проведено у группы доноров (рис. 1).

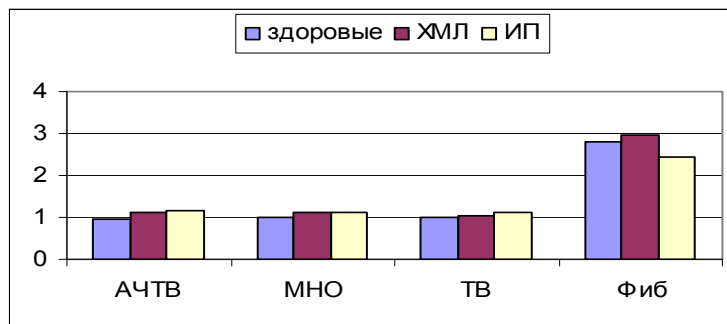


Рис. 1. Показатели исследования плазменного гемостаза у здоровых лиц, больных с хроническим миелолейкозом и истинной полицитемией

Для АЧТВ и тромбинового времени в качестве сравниваемой величины использовались относительные единицы (значение времени исследуемой плазмы пациента к значению контроля — R), что позволило избежать влияния различий в сериях реагентов.

Нами выявлено статистически значимое удлинение АЧТВ-теста как в группе с ХМЛ ($1,14 \pm 0,03$), так и с ИП ($1,18 \pm 0,03$) по сравнению с контролем ($0,97 \pm 0,01$). Гипокоагуляцию 1 фазы мы связываем с появлением в крови патологических вторичных антикоагулянтов, образующихся за счет распада большого количества неопластических клеток. Для подтверждения этой гипотезы нами была проведена корреляция между содержанием лейкоцитов в крови пациентов и значением АЧТВ-индекса. В результате выявлена положительная умеренная корреляционная связь только у больных с ИП: $r = 0,52$ с уровнем значимости $p = 0,03$, при ХМЛ: $r < 0,3$ ($p > 0,05$).

2 фаза свертывания крови, характеризующая внешний путь образования протромбиназы, была абсолютно сохранена в обеих нозологиях. Значения показателя МНО, ее главного критерия, при ХМЛ ($1,1 \pm 0,01$)

и ИП ($1,1 \pm 0,01$) находились в пределах нормы ($0,9 < \text{МНО} < 1,2$).

Тесты, относящиеся к 3 фазе — превращения фибриногена в фибрин, также не показали отклонения от нормы. Индекс ТВ составил при ХМЛ ($1,05 \pm 0,02$), ИП ($1,1 \pm 0,01$) по сравнению с донорами ($1,0 \pm 0,01$). Уровень фибриногена в плазме был равен $2,95 \pm 0,13$ (ХМЛ), $2,45 \pm 0,01$ (ИП), а в группе здоровых людей он оказался $2,79 \pm 0,08$.

Необходимо отметить, что не только скорость образования (т. е. вышеперечисленные тесты), но и качество кровяного сгустка — плотность (S), объем (V), способность к ретракции, а также возможность его лизиса фибринолизинном — во многом определяют полноценность остановки кровотечения.

Ретракция тромба имеет большое значение на этапе формирования кровяного сгустка как ткани, временно замещающей дефект и обеспечивающей гемостаз. Так, этот показатель был сохранен у больных с ХМЛ ($64,3 \pm 2,56$) при контроле ($66,9 \pm 0,83$). При ИП наблюдается статистически значимое $p < 0,05$ снижение ретракционной функции сгустка ($62,58 \pm 1,82$) (рис. 2).

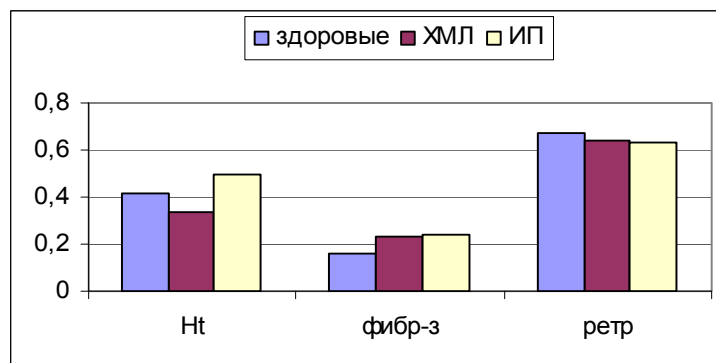


Рис. 2. Показатели исследования гематокрита, ретракции и фибринолиза у здоровых лиц, больных с хроническим миелолейкозом и истинной полицитемией

Тромбоциты (6 тромбоцитарный фактор — тромбостенин) принимают активное участие в ретракции тромба. Исходя из того, что при ХМПЗ встречаются как тромбоцитозы, так и случаи с нормальным

уровнем пластинок, мы провели корреляцию между содержанием тромбоцитов и показателем ретракции. Однако связь ни в одной из рассматриваемых нозологиях не была выявлена (табл. 2).

Таблица 2
Показатели коэффициентов корреляции между количеством тромбоцитов / ретракцией и количеством тромбоцитов / фибринолизом при хроническом миелолейкозе и истинной полицитемии

Коэффициенты корреляции	Исследуемые группы	
	ХМЛ	ИП
r Тр/ретракция	0,003	0,072
r Тр/фибринолиз	0,206	0,028

У большинства обследованных больных, независимо от их нозологической принадлежности, обнаружен общий характер дисфункции фибринолитической системы, а именно ее активация (рис. 2). При этом между значениями спонтанного фибринолиза при ХМЛ ($23,23 \pm 2,17$) и ИП ($24,41 \pm 2,14$) нет статистических различий ($p > 0,05$). Показатели фибринолиза доноров составили $12,7 \pm 0,39$. Ключевую роль в активации фибринолиза играют тромбоциты (8 тромбоцитарный фактор — P_8). Следовательно, гиперфибринолиз может являться результатом высвобождения больших количеств P_8 при активации пластинок. Это, в свою очередь, может привести к геморрагиче-

ским диатезам. Нами был изучен корреляционный анализ между количеством пластинок и показателем спонтанного фибринолиза. Связи установлено не было, что позволяет сделать вывод: содержание тромбоцитов не является определяющим для оценки степени нарушения фибринолитической активности плазмы в рассматриваемых нозологиях хронических лейкозов.

Степень надежности образовавшегося сгустка также оценивают с помощью показателей гемостатических свойств сгустка (V, S и T) (рис. 3). Эти параметры указывают на гемостатический дефект даже тогда, когда другие тесты коагулограммы изменены мало или неопределенно [3, 4].

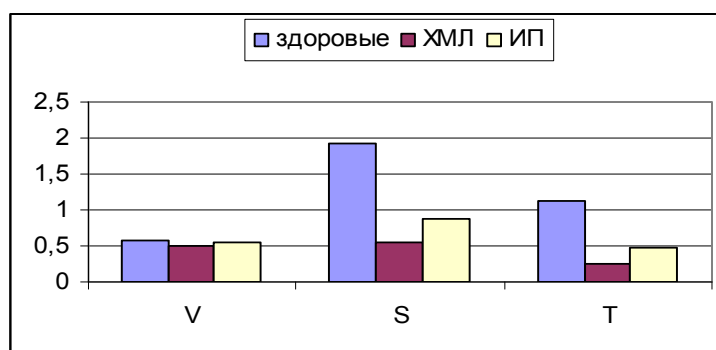


Рис. 3. Показатели исследования структурных свойств сгустка у здоровых лиц, больных с хроническим миелолейкозом и истинной полицитемией

Среди всех обследованных показатель гематокрита составил: при ХМЛ — $34,42 \pm 1,09$, ИП — $49,98 \pm 0,81$, контроль — $42 \pm 0,64$. В обеих исследуемых группах отмечается значимое снижение плотности сгу-

стка (S) — показателя соотношения в тромбе форменных элементов и сыворотки (ХМЛ — $0,54 \pm 0,03$, ИП — $0,88 \pm 0,03$, при норме — $1,93 \pm 0,06$, $p < 0,05$). Имеющееся уменьшение плотности сгустка, а следовательно,

преобладание в последнем количества жидкой фазы (сыворотки) над количеством плотной фазы (форменных элементов) приводит к образованию рыхлого тромба.

На фоне сохраненной ретрактильности у большинства обследованных пациентов образуются сгустки, меньшие по объему, чем у здоровых людей (ХМЛ — $0,49 \pm 0,01$, ИП — $0,55 \pm 0,01$, контроль — $0,57 \pm 0,01$, $p < 0,05$).

И как следствие снижения плотности и объема образовавшегося тромба, показатель общей гемостатической полноценности (Т) среди всей обследованной когорты резко угнетен (ХМЛ — $0,26 \pm 0,01$, ИП — $0,48 \pm 0,02$, контроль составил $1,12 \pm 0,02$).

Оценка полученных данных позволила сделать вывод: несмотря на нормальный или повышенный уровень тромбоцитов и относительно нормальные показатели скрининговых тестов вторичного гемостаза, сочетание гиперфибринолиза, снижения объема сгустка, его плотности и общего гемостатического показателя приводит к формированию функционально неполноценного сгустка (тромба), свидетельствует о геморрагическом риске.

Оценка тромбоцитарного гемостаза

Исследования агрегации тромбоцитов с основными скрининговыми индуктора-

ми (адреналином, АДФ и коллагеном) были выполнены у обследуемых как с тромбоцитозом, так и с нормальным уровнем тромбоцитов. При выполнении агрегометрии количество тромбоцитов было приведено к стандартному значению — 200–250 тыс/мкл (при тромбоцитозе для предотвращения спонтанной агрегации выполнено разведение).

При рассмотренных формах хронических миелопролиферативных заболеваний (ХМЛ и ИП) выявлены разнонаправленные изменения функции тромбоцитов: как снижение, вплоть до полного угнетения, так и (реже) усиление агрегационной активности пластинок при стимуляции адреналином и разными концентрациями АДФ. Мы полагаем, что невысокий процент выявляемости гиперагрегации тромбоцитов может быть следствием, как минимум, двух причин:

1) диссеминированной внутрисосудистой агрегации (ДВА-синдром); в результате *in vitro* исследуются уже неполноценные, «пустые» тромбоциты;

2) особенностью исследуемой выборки с более выраженным геморрагическим риском.

Таблица 3

Показатели агрегационной активности тромбоцитов в исследованных группах при хроническом миелолейкозе и истинной полицитемии, $\bar{X} \pm S_x$

Индуктор	Исследуемые группы		
	контроль, n = 30	ХМЛ, n = 50	ИП, n = 53
АДР $5,0 \times 10^{-6}$	$81,2 \pm 1,9$	$27,67 \pm 5,07$	$27,46 \pm 7,06$
АДФ $1,5 \times 10^{-6}$	$65,3 \pm 1,4$	$18,98 \pm 3,29$	$16,23 \pm 5,37$
АДФ $2,5 \times 10^{-6}$	$75,8 \pm 1,7$	$32,66 \pm 3,85$	$27,38 \pm 5,68$
АДФ $5,0 \times 10^{-6}$	$80,5 \pm 1,5$	$29,7 \pm 8,21$	$35,34 \pm 5,81$
КОЛ 2,0 мг/мл	$68,8 \pm 1,3$	$59,86 \pm 7,12$	$55,65 \pm 5,92$

В целом среди всех обследованных адреналин-агрегация была нарушена в $89 \pm 2,5\%$ случаев в виде угнетения ответа. При этом чаще встречались следующие дефекты агрегационного ответа (рис. 4):

I тип: полное угнетение ответа ($54 \pm 4\%$) при воздействии адреналином может быть следствием: дефицита адреналиновых рецепторов; дефекта поверхностной клеточной мембраны, в результате которого нарушается взаимодействие агониста с кле-

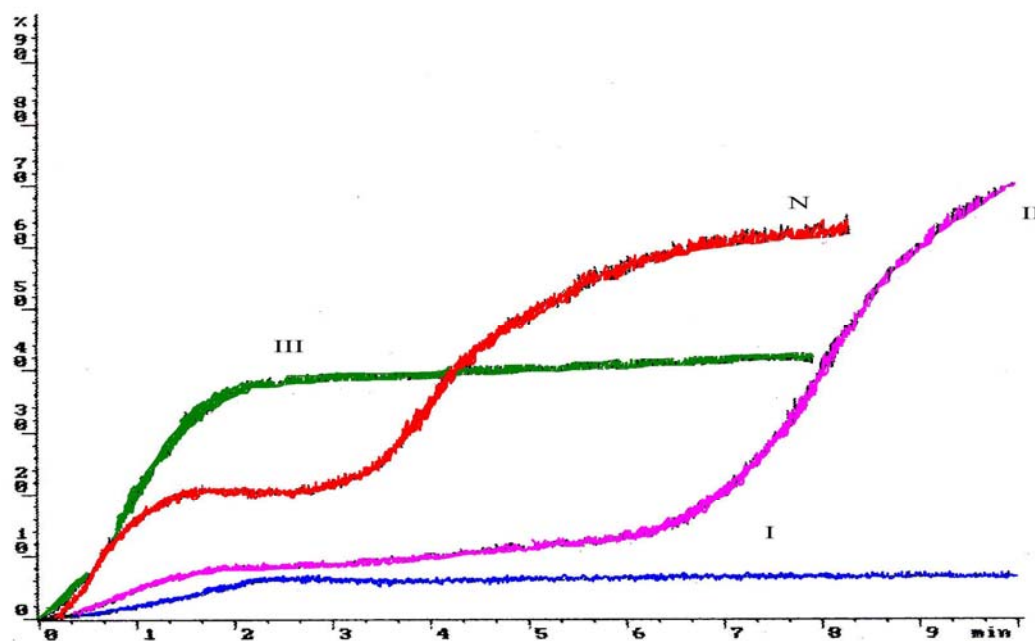
точным рецептором; снижения количества и/или качественного несовершенства плотных гранул, обеспечивающих реакцию высвобождения первого порядка.

II тип: первичная гипоагрегация с замедлением реакции высвобождения ($8 \pm 2\%$). Этот особый тип агрегации, по нашим наблюдениям, характерен именно для пациентов с ХМПЗ. Судя по литературе, действие адреналина на клетку не зависит от образования тромбосана A_2 и от реакции

высвобождения, а непосредственно связан с модуляцией тромбоцитарных мембран при взаимодействии с α -рецепторами. Через цепь сложных превращений это приводит к изменению проницаемости мембраны к Ca^{2+} (основному, наряду с фактором Виллебранда, плазменному кофактору адгезивно — агрегационной функции тромбоцитов). Таким образом, дефект клеточной мембраны вызывает угнетение первичного ответа и задержку трансдукции

сигнала к секреторным гранулам, то есть задержку реакции высвобождения.

III тип: ответ неполный, одноволновый, с угнетенной реакцией высвобождения ($22 \pm 3,3\%$). Угнетение реакции высвобождения второго порядка может быть следствием: повреждения тромбоцитов в периферическом сосудистом русле при их обратимой агрегации; первичного внутреннего пластиночного дефекта (дефицитом α -гранул).



N — нормальная контрольная кривая; I, II, III — типы агрегационных кривых

Рис. 4. Основные типы агрегационных кривых при хронических миелопролиферативных заболеваниях в ответ на адреналин $5,0 \times 10^{-6}$ М/л

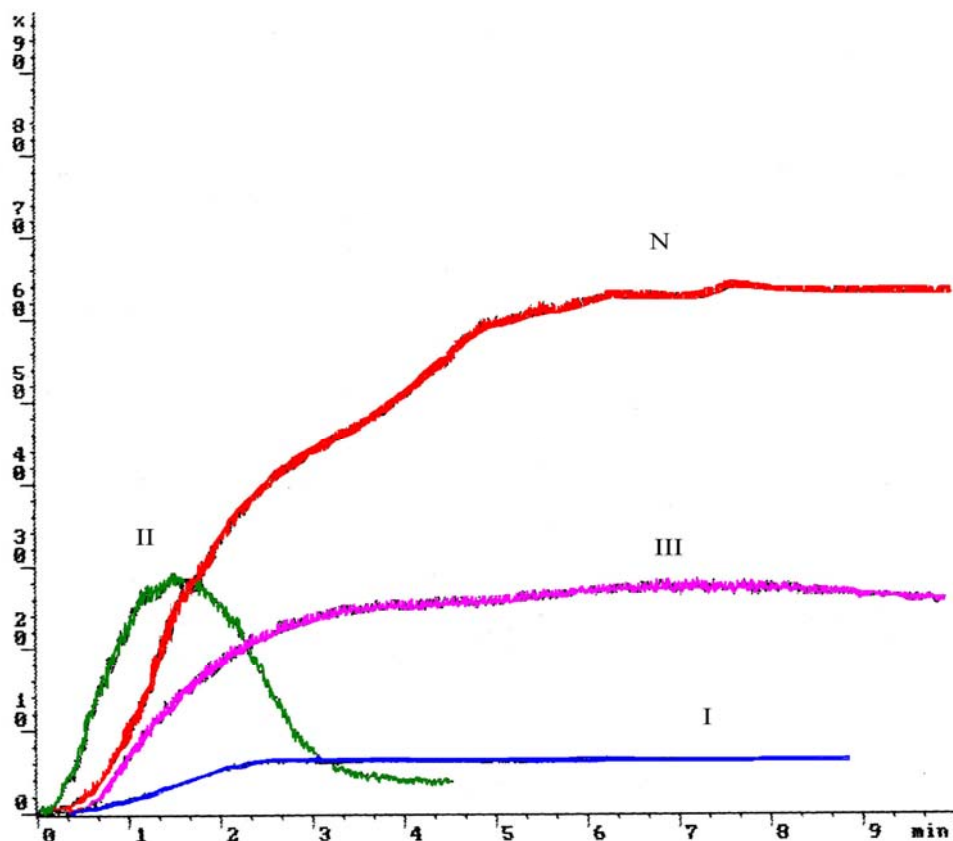
Учитывая тот факт, что степень агрегации тромбоцитов и выход продуктов реакции высвобождения зависят от концентрации ADP, этот агонист использовался нами в различных концентрациях: от минимальной — $0,5 \times 10^{-6}$ М/л; средней — $1,5$; высокой — $2,5$; и, наконец, максимальной — $5,0 \times 10^{-6}$ М/л. Эмпирически нами было выявлено, что средняя концентрация ADP $1,5 \times 10^{-6}$ М/л является наиболее информативной при оценке степени дисфункции тромбоцитов, т.к. обычно при этой концентрации кривая имеет две волны, с помощью которых можно оценивать и первичный, и вторичный ответы.

Результаты проведенных агрегационных исследований с ADP $1,5 \times 10^{-6}$ М/л — индуктором показывают нарушения в $92 \pm$

$2,2\%$ случаев всех обследованных лиц с ХМПЗ, также в виде угнетения (рис. 5).

I тип: полное угнетение агрегатограммы ($35 \pm 3,9\%$) при воздействии ADP (также, как и с адреналином) может быть следствием нарушения взаимодействия индуктора с клеточными гликопротеидами как на начальном этапе связывания с рецепторами, так и на любой другой стадии сложной цепи прохождения сигнала внутрь клетки.

II тип: ответ неполный, обратимый ($43 \pm 4\%$). Так как $1,5 \times 10^{-6}$ М/л ADP — агрегация должна носить двухфазный характер, то обратимость агрегационной кривой показывает на то, что образующиеся агрегаты рыхлые, непрочные, легко разрушаются и недостаточно фиксируются.



N — нормальная контрольная кривая, I, II, III — типы агрегационных кривых

Рис. 5. Основные типы агрегационных кривых при хронических миелопролиферативных заболеваниях в ответ на ADP $1,5 \times 10^{-6}$ М/л

Похоже, что на этом этапе останавливается дальнейшая активация тромбоцитов вследствие одного или сочетания нескольких дефектов, рассмотренных выше. В итоге — нестабильные клеточные агрегаты распадаются.

III тип: ответ неполный, угнетение второй волны ($14 \pm 2,8\%$). По механизму схож с III типом адреналин-агрегации. Возможно, еще одной причиной этого нарушения может быть дефект «каскадного механизма» активации тромбоцитов.

Коллаген-агрегация была сохранена во всех рассмотренных нозологиях. Коллаген — один из мощнейших внешних факторов активации тромбоцитов. Этот агонист отражает синтез тромбоксана A_2 и тромбоцитарную секрецию, что дает право предположить о сохранении реакции высвобождения при ХМЛ и ИП.

Таким образом, обнаруженные нами дефекты в тромбоцитарном гемостазе чаще всего проявляются в виде разной степени угнетения ответа. Необходимо отметить, что нами не было выявлено связи между степенью нарушения клеточного гемостаза и количеством участвующих в нем тромбоцитов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Клиническая онкогематология / под ред. Волковой М.А. — М., 2001.
2. Руководство по гематологии / В 3 т. / Под ред. А. И. Воробьева. — М., 2002. — Т. 1.
3. Иванов, Е. П. Руководство по гемостазиологии / Е. П. Иванов. — Мн.: Беларусь, 1991.
4. Цвирко, Д. Г. Дисфункция фибринолиза как компонент системной реакции гемостаза при лейкозах: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Мн., 1990. — 26 с.
5. Degos, L. Malignant Haematology / L. Degos, D. Linch, B. Lowenberg. — London, 1999.

Поступила 3.11.2006