DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2021-25(3)-10

УДК: [612.115+616.151.5-036.887]:616.61-008.64-036.17-78

ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ГЕМОСТАЗУ ТА ЛЕТАЛЬНІСТЬ ВІД ТРОМБОТИЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ У ХВОРИХ ХХН ВД СТАДІЇ, ЯКІ ПЕРЕБУВАЛИ НА ЛІКУВАННІ МЕТОДОМ ПРОГРАМНОГО ГЕМОДІАЛІЗУ (П'ЯТИРІЧНЕ СПОСТЕРЕЖЕННЯ)

Сторожук О. Б.², Селезньова І. Б.¹, Сторожук Л. О.¹, Платонова Т. М.³, Сторожук Б. Г.², Довгалюк Т. В.¹

¹НДІ реабілітації осіб з інвалідністю Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (Хмельницьке шосе, 104, м. Вінниця, Україна, 21029),

²Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018),

³Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601)

Відповідальний за листування:
e-mail: reab@ukr.net

Статтю отримано 11 травня 2021 р.; прийнято до друку 21 червня 2021 р.

Анотація. Тромботичні ускладнення у хворих з хронічною хворобою нирок (ХХН) ВД стадії, які лікуються методом програмного гемодіалізу, є однією з причин високої летальності у даній категорії пацієнтів, при цьому основною патогенетичною ланкою виступають порушення у системі гемостазу, які характеризуються системною активацією згортання крові та призводять до розвитку тромбофілій. Мета - вивчити біохімічні молекулярні маркери гемостазу у хворих ХХН ВД стадії, які отримують лікування методом програмного гемодіалізу, та визначити їх довгостроковий вплив на розвиток тромботичних ускладнень та летальність. В дослідження включено 88 пацієнтів (52 чоловіки та 36 жінок) з ХХН ВД стадії, які проходили лікування методом програмного гемодіалізу, віком від 26 до 65 років. Період спостереження за хворими складав п'ять років. Біохімічне визначення рФ проводили методом бісайтового імуноферментного кількісного аналізу, визначення Д-димерів оцінювали імуноферментним методом з використанням специфічних моноклональних антитіл до епітопів Д-д, оцінку активності рС в плазмі крові проводили при його активації отрутою щитомордника звичайного з наступною спектрофотометрією при довжині хвилі 405 нм. Фібриноген у плазмі крові визначали за допомогою тромбінопо-дібного ферменту анцистру-Н спектрофотометричним методом за довжини хвилі 280 нм. Адекватність фібринолітичної активності плазми оцінювали за співвідношенням Д-д/рФ. Обробка матеріалів проведена з використанням методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу. Встановлено, що за п'ятирічний період від тромботичних ускладнень померло 13 пацієнтів (14,8%), 7 чоловіків і 6 жінок. Основними тромботичними ускладненнями виступали інфаркт міокарда (6), ішемічний інсульт (4), мезентеріальний тромбоз (2) та синдром десимінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ) (1) (дані патоморфологічного дослідження). У хворих загальної групи у порівнянні з контролем спостерігалось досто-вірне збільшення концентрації рФ, зниження рівня рС, практично дворазове зростання концентрації Фг зі зменшенням співвідношення Д-д/рФ при відсутній реакції Д-д. Тенденцію до зростання співвідношення Д-д/рФ у групі померлих від тромботичних ускладнень необхідно розцінювати, як появу мікротромбозів з утворенням дериватів фібрину на тлі незнач-ної активації фібринолізу. Проведена кореляційна оцінка взаємозв'язків рФ у загальній групі із Д-д, Фг, рС та співвідношення-ми Д-д/рФ виявила середню пряму залежність його із Д-димером ($r=0,39$) ($p<0,001$), відсутність кореляційних зв'язків із фібриногеном ($r=-0,12$), протеїном С ($r=-0,10$) ($p>0,1$). Крім того, Д-д виявляв високий позитивний кореляційний зв'язок зі співвідношенням Д-д/рФ ($r=0,87$) ($p<0,001$) та помірний негативний - із рС ($r=-0,21$) ($p<0,05$). Необхідно зазначити, що у хворих з тромботичними ускладненнями асоціативні зв'язки рФ з Д-д збільшуються ($r=0,51$) ($p<0,001$), як і негативні з рС ($r=-0,22$) ($p<0,05$). Депресивний стан антикоагулянтної ланки у поєднанні із активацією факторів згортання може бути однією із компонентів у прогнозуванні тромбофілій у даній категорії хворих.

Ключові слова: гемостаз, гемодіаліз, розчинний фібрин, Д-димер, протеїн С, фібриноген.

Вступ

Тромботичні ускладнення у хворих з хронічною хворобою нирок (ХХН) ВД стадії, які перебувають на лікуванні методом програмного гемодіалізу є однією із причин високої летальності у даній категорії пацієнтів. У патогенезі розвитку внутрішньосудинного тромбозу основною ланкою виступають порушення у системі гемостазу, які характеризуються системною активацією згортання крові та призводять до розвитку тромбофілій [9, 11]. Останнє спонукає до пошуку доступних біохімічних маркерів діагностики тромбофілічного синдрому для своєчасного запобігання процесу генералізованого тромбоутворення. До можливих біохімічних молекулярних маркерів гемостазу можна віднести одночасне визначення розчинного фібрину (рФ) (показник передтромбозу), Д-димеру

(Д-д) (показник післятромбозу та фібринолітичної активності), протеїну С (рС) (природний антикоагулянт), фібриногену (Фг) (один із головних білків системи згортання крові, що під дією тромбіну перетворюється у фібрин з утворенням волокон, які є основою згустку) [6].

Мета - вивчити біохімічні молекулярні маркери гемостазу у хворих ХХН ВД стадії, які отримують лікування методом програмного гемодіалізу та визначити їх довгостроковий вплив на розвиток тромботичних ускладнень та летальність.

Матеріали та методи

У дослідження включено 88 пацієнтів з ХХН ВД стадії, які проходили лікування методом програмного гемоді-

анлізу (після отриманої інформованої згоди). Вік хворих коливався від 26 до 65 років. Середній вік становив $46,7 \pm 1,05$ роки. Середній термін гемодіалізного стажу дорівнював $7,36 \pm 0,40$ роки. Серед досліджуваних хворих було 52 чоловіки та 36 жінок. Період спостереження за хворими становив п'ять років, протягом яких фіксувались усі летальні випадки від тромботичних ускладнень. Контрольну групу становили 23 практично здорових особи чоловічої та жіночої статі від 20 до 65 років, середній вік яких складав $45,8 \pm 2,1$ роки.

Кров у хворих набирали натще із вени у вакутайнер без застосування джгута перед проведенням сеансу гемодіалізу. Біохімічне визначення рФ проводилось методом бісайтового імуноферментного кількісного аналізу [3]. Визначення Д-димерів оцінювали імуноферментним методом з використанням специфічних моноклональних антитіл до епітопів Д-д [3]. Оцінка активності рС у плазмі крові проводилась при його активації отрутощитомордника звичайного з наступною спектрофотометрією при довжині хвилі 405 нм. Фібриноген у плазмі крові визначали за допомогою тромбіноподібного ферменту анцистрону-Н спектрофотометричним методом за довжини хвилі 280 нм [8]. Адекватність фібринолітичної активності плазми оцінювали за співвідношенням Д-д/рФ. Обробка матеріалів проведена з використанням методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу.

Результати

Результатами дослідження встановлено, що за п'ятирічний період від тромботичних ускладнень померло 13 пацієнтів (14,8%), 7 чоловіків і 6 жінок. Основними тромботичними ускладненнями виступали інфаркт міокарда (6), ішемічний інсульт (4), мезентеріальний тромбоз (2) та синдром десимінованого внутрішньо судинного згортання (ДВЗ) (1) (дані патоморфологічного дослідження). Необхідно зазначити, що за віком та терміном гемодіалізного стажу померлі хворі від тромботичних ускладнень достовірно не відрізнялись від хворих загальної групи (табл. 1).

Натомість, у хворих загальної групи у порівнянні з контролем спостерігалось достовірне збільшення концентрації рФ, зниження рівня рС, практично дворазове зростання концентрації Фг зі зменшенням співвідношен-

ня Д-д/рФ при відсутній реакції Д-д. Наведені зміни показників гемостазу свідчать, що на тлі зростання факторів передтромбозу у хворих спостерігається пригнічення антикоагулянтних властивостей плазми та відсутня реакція фібринолітичної ланки гемостазу, на що вказує зменшення співвідношення Д-д/рФ. Тенденцію до зростання співвідношення Д-д/рФ у групі померлих від тромботичних ускладнень необхідно розцінювати як появу мікротромбозів з утворенням дериватів фібрину на тлі незначної активації фібринолізу. Враховуючи, що фібриноген єдиний білок, із якого утворюється фібрин, і характеризує загальний потенціал згортаючої системи гемостазу, його концентрації мають пряму відображати рівні розчинного фібрину й бути зіставними з ними. Останнє має підтвердження у досліджуваних хворих, про що свідчать загально високі концентрації фібриногену в загальній групі, які ще більше зростають у групі з тромботичними ускладненнями. Необхідно підкреслити, що високому потенційному ризику тромбоутворення зовсім не відповідають значення природного антикоагулянту - протейну С, концентрація якого має тенденцію до подальшого зниження у групі хворих з тромбозами, тобто можна констатувати відсутність адекватної пропорційної антикоагулянтної реакції у хворих, які лікуються гемодіалізом, на їхній прокоагулянтний стан, що відповідає і літературним даним [10].

Проведена кореляційна оцінка взаємозв'язків рФ у загальній групі із Д-д, Фг, рС та співвідношеннями Д-д/рФ виявила середню пряму залежність його із Д-димером ($r = 0,39$) ($p < 0,001$), відсутність кореляційних зв'язків із фібриногеном ($r = -0,12$), протейном С ($r = -0,10$) ($p > 0,1$). Крім того, Д-д виявляв високий позитивний кореляційний зв'язок зі співвідношенням Д-д/рФ ($r = 0,87$) ($p < 0,001$) та помірний негативний - із рС ($r = -0,21$) ($p < 0,05$). Необхідно зазначити, що у хворих з тромботичними ускладненнями асоціативні зв'язки рФ з Д-д збільшуються ($r = 0,51$) ($p < 0,001$), як і негативні з рС ($r = -0,22$) ($p < 0,05$). Відсутність же тісних зв'язків між показниками передтромбозу з показниками післятромбозу у загальній групі може вказувати на ще збережений потенціал антикоагулянтної системи згортання крові у хворих з ХХН ВД ст. Однак депресивний стан антикоагулянтної ланки у поєднанні із активацією факторів згортання може бути однією із компонент у прогнозуванні тромбофілій у даної категорії хворих.

Таблиця 1. Біохімічні показники гемостазу у хворих різних груп з ХХН ВД стадії.

№ з/п	Групи хворих	Показники гемостазу					Вік хворих	Стаж гемодіалізу
		рФ мкг/мл	Д-д нг/мл	рС %	Фг мг/мл	Д-д/рФ		
1	Контроль n = 23	$2,60 \pm 0,31$	$70,0 \pm 9,1$	$98,9 \pm 7,9$	$2,20 \pm 0,25$	$26,9 \pm 1,72$	$45,8 \pm 2,10$	-
2	Загальна група n = 75	$3,63 \pm 0,19$	$67,2 \pm 6,6$	$83,0 \pm 1,7$	$4,04 \pm 0,12$	$20,0 \pm 1,39$	$46,7 \pm 1,05$	$7,36 \pm 0,40$
3	Померлі n = 13	$4,26 \pm 0,23$	$122,0 \pm 20,3$	$74,8 \pm 6,5$	$4,87 \pm 0,37$	$23,3 \pm 3,31$	$51,7 \pm 3,10$	$7,23 \pm 1,80$
4	P	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,05$	$p_{1-2} > 0,1$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,02$	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,02$ $p_{2-3} > 0,05$	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,05$	$p_{1-2} < 0,002$ $p_{1-3} > 0,1$ $p_{2-3} > 0,1$	$p_{1-2} > 0,1$ $p_{1-3} > 0,1$ $p_{2-3} > 0,1$	- - $p_{2-3} > 0,1$

Обговорення

Як доводять результати досліджень, хворі, які лікуються програмним гемодіалізом, мають високі концентрації рФ, що свідчить про активацію системи згортання крові та можливу загрозу розвитку тромботичних подій [7]. Останнє пояснюється постійним травмуванням формених елементів крові під час проведення апаратного сеансу гемодіалізу, у результаті чого у кровообіг потрапляють тромбоцитарні фактори згортання, активізується плазмовий попередник тромбопластину, які стимулюють процеси активації згортання крові через внутрішню ланку системи гемостазу. Прогностична значущість рФ як молекулярного маркера тромбофілій має своє підтвердження у літературних даних, а визначення рФ включено до алгоритмів лабораторної діагностики тромбофілій та контролю ефективності фармакотерапії [1]. Так відомо, що у хворих на термінальну фазу ниркової недостатності відбувається активація маркерів гемостазу, а саме Д-д, рФ та Фг, які зустрічаються у 2/3 частини пацієнтів [5], а ризики розвитку тромбозів пов'язують з підвищенням рівня Фг, Д-димерів, протромбінових фрагментів, активацією комплексу тромбін-антитромбін [4] та рівнем концентрації рС, що має підтвердження у нашому дослідженні. Відомо, що одним із важливих компонентів гострої фази гіперкоагуляції є глікопротеїн - фібриноген [11], який у досліджуваних групах достовірно перевищував контрольні показники, забезпечуючи постійну фібриногенемію. Результати епідеміологічних досліджень свідчать про наявну залежність концентрації фібриногену у плазмі крові та розвитку інсульту та інфар-

кту [11]. Це пов'язано із притаманними йому здатністю експоненціально впливати на в'язкість крові, активувати процеси агрегації тромбоцитів та на інші білки системи згортання (фібрoneктин, колаген, тромбоспондин) [2]. На цьому тлі важлива роль належить антикоагулянтній системі, представленій природним антикоагулянтом - протейном С, який, окрім всього, у фізіологічних умовах бере участь і в регуляції системи фібринолізу.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. У хворих ХХН ВД стадії спостерігаються значні порушення у системі гемостазу, які характеризуються зростанням факторів передтромбозу (рФ, Фг), відсутністю реакцією факторів післятромбозу (Д-д) та депресією антикоагулянтної ланки (рС).

2. У хворих, які мали тромботичні ускладнення, що завершилися летально, зміни показників гемостазу були достовірно більш значимими. При цьому, виявляються вірогідні прямі помірні асоціативні зв'язки рФ і Д-д та слабкі негативні рФ і рС.

3. Комплексне визначення факторів передтромбозу (рФ, Фг), післятромбозу (Д-д) та антикоагуляції (рС) може слугувати довгостроковою прогностичною компонентою тромботичних ускладнень у хворих ХХН ВД стадії.

Отримані дані дають можливість визначати тромбогенну компоненту у хворих з ХХН ВД стадії і як результат - прогнозувати тромботичні ускладнення у даній категорії хворих.

Список посилань - References

- [1] Komisarenko, S. V., Lugovsky, E. V., Kolesnikova, I. M., Singer, M. Y., Grishchenko, P. G., Ganova, L. O., ... & Tereshchenko, M. I. (2012). Тест-система імуноферментна для кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові людини [Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative determination of soluble fibrin in human plasma]. Patent № 69283, Ukrayina, МРК А61К 39/44. Державне патентне відомство України - State Patent Office of Ukraine.
- [2] Korolova, D., Chernyshenko, V., Platonova, T., Chernyshenko, T., & Lugovskoy, E. V. (2016). Detection of Prothrombin 1 in Human Blood Plasma. *Intern Blood Res Reviews*, 5(2), 2321-9. DOI:10.9734/IBRR/2016/24683
- [3] Lugovskaya, E. V., Komisarenko, S. V., Platonova, T. M., Rublenko, A. M., Fishchenko, V. O., & Kolesnikov, I. M. (2013). Визначення вмісту розчинного фібрину та Д-димеру для прогнозування тромботичних ускладнень за ендотелезуючого кульшового суглоба [Determination of soluble fibrin and D-dimer content for prediction of thrombotic complications by hip arthroplasty]. *Лаб. діагностика - Laboratory diagnostics*, 2(64), 3-8.
- [4] Melnik, A. A. (2016). Система гемостазу і її регуляція при порушенні функціональної способности почек [The hemostatic system and its regulation in violation of the functional ability of the kidneys]. *Новости медицины и фармации в Украине - News of medicine and pharmacy in Ukraine*, 9(583), 24-31.
- [5] Nunns, G. R., Moore, E. E., Chapman, M. P., Moore, H. B., Stettler, G. R., Peltz, E., ... & Sauaia, A. (2017). The hypercoagulability paradox of chronic kidney disease: The role of fibrinogen. *Am J Surg.*, 214(6), 1215-1218. doi: 10.1016/j.amjsurg.2017.08.039
- [6] Platonova, T. N., Zaichko, N. V., Chernyshenko, T. M., Gornitskaya, O. V., & Grischuk, V. I. (2010). Оценка информативности и прогностической значимости традиционных скрининговых и дополнительных лабораторных тестов для диагностики тромбофилии [Evaluation of the informativeness and predictive value of traditional screening and additional laboratory tests for the diagnosis of thrombophilia]. *Лаб. діагностика - Laboratory diagnostics*, 4(54), 3-10.
- [7] Popova, J. A., Yadrihinskaya, V. N., Krylova, M. I., Sleptsova, S. S., & Borisova, N. V. (2016). Comparison of clinical and laboratory parameters in patients with end-stage renal failure in the outcome of chronic glomerulonephritis and patients with end-stage renal failure in the outcome of other diseases. *Wlad Lek.*, 69(6), 739-741.
- [8] Sokolovskaya, A. S., Platonova, T. M., Grinenko, T. V., Chernyshenko, T. M., & Ivashchenko, T. I. (2002). Порівняльна характеристика методів визначення вмісту фібриногену в плазмі крові [Comparative characteristics of methods for determining the content of fibrinogen in blood plasma]. *Експерим та клін фізіол і біохімія - Experimental and clinical physiology and biochemistry*, 3, 82-86.
- [9] Solymoss, S. (2018). Postthrombotic syndrome: simple prevention. *Blood*, 132(21), 2216-2217. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-877076>
- [10] Storozhuk, O.B., Seleznyova, I.B., Storozhuk, L.O., Storozhuk, B.G., Dovgalyuk, T.V., & Danilenko, Yu. A. (2018). Коагуляцій-

ний та фібринолітичний потенціал плазми крові у хворих з ХХН ВД стадії, які лікуються програмним гемодіалізом, як маркери тромботичного ризику [Coagulation and fibrinolytic potential of blood plasma in patients with stage CKD VD treated with programmed hemodialysis as markers of thrombotic risk]. *Вісник Вінницького національного медичного університету - Reports of Vinnytsia National*

Medical University, 3(22), 494-497.

[11] Volkov, G. L., Platonova, T. N., Savchuk, A. M., Gornitskaya, O. V., Chernyshenko, T. M., & Krasnobryzha, E. M. (2005). *Современные представления о системе гемостаза [Modern ideas about the hemostasis system]*. Киев: Наукова думка - Kiev: Naukova Dumka.

SOME INDICATORS OF HEMOSTASIS AND MORTALITY FROM THROMBOTIC COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH CKD STAGE VD WHO WERE TREATED BY PROGRAMMED HEMODIALYSIS (FIVE-YEAR FOLLOW-UP)

Storozhuk O. B., Seleznyova I. B., Storozhuk L. O., Platonova T. M., Storozhuk B. G., Dovgalyuk T. V.

Annotation. *Thrombotic complications in patients with stage VD chronic kidney disease (CKD), treated by program hemodialysis is one of the causes of high mortality in this category of patients; its major pathogenetic component proved to be hemostatic system disturbances characterized by systemic activation of blood clotting process leading to the development of thrombophilia. Objective - to study the biochemical molecular markers of hemostasis in patients with stage VD CKD, treated by program hemodialysis, and to determine their long-term effect on the development of thrombotic complications and mortality. The study included 88 patients (52 males and 36 females) aged 26 to 65 years with stage VD CKD, treated by program hemodialysis. The patients were followed up for five years. Soluble fibrin (sF) level was determined by two-site enzyme-linked immune-sorbent quantitative assay; D-dimer - by enzyme immunoassay using specific monoclonal antibodies to D-dimer epitopes; protein C (pC) activity in blood plasma was estimated by its activation with copperhead snake venom followed by spectrophotometry with wavelength 405 nm. Blood plasma fibrinogen was determined using thrombin-like enzyme Antsistrin-H by spectrophotometry with wavelength 280 nm. Blood plasma fibrinolytic activity was evaluated by the relationship between D-dimer and soluble fibrin. Processing of materials was carried out using the methods of variation statistics and correlation analysis. During five years of follow up there were 13 deaths (14.8%), 7 among males and 6 among females, caused by thrombotic complications. The main thrombotic complications were myocardial infarction (6), ischemic stroke (4), mesenteric thrombosis (2) and disseminated intravascular coagulation syndrome (DIC) (1) (according to pathomorphological data). The patients of general group were found to have significantly increased sF level, decreased pC as compared to the control group, as well as twofold increase of fibrinogen concentration along with decreased D-dimer/sF ratio and no response of D-dimer to increased soluble fibrin level. The tendency of D-dimer/sF ratio to increase in those who died because of thrombotic complications could be indicative of microthrombosis with formation of fibrin derivatives along with mild activation of fibrinolysis. Correlation relationships between soluble fibrin and D-dimer, fibrinogen and protein C in general group were assessed, and the following data were obtained: medium direct relationship between soluble fibrin and D-dimer ($r = 0.56$) ($p < 0.001$), and absence of correlation with fibrinogen ($r = -0.12$) and protein C ($r = -0.10$) ($p > 0.1$). Besides, strong positive correlation was demonstrated between D-dimer and soluble fibrin ($r = 0.87$) ($p < 0.001$), and moderately negative one between D-dimer and protein C ($r = -0.21$) ($p < 0.05$). It should be noted that in patients with thrombotic complications, positive correlations between soluble fibrin and D-dimer become stronger ($r = 0.51$) ($p < 0.001$), as well as negative ones between soluble fibrin and protein C ($r = -0.22$) ($p < 0.05$). Depressive state of anticoagulant component along with activation of coagulation factors are supposed to be one of the indicators predicting thrombophilia in this category of patients.*

Keywords: *hemostasis, hemodialysis, soluble fibrin, D-dimer, protein C, fibrinogen.*