

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
УЗБЕКИСТАН**

**ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ**

**УДК 616.1.615.5-615.38-614.7**

**Норкулова Комила Миралишеровна**

**СОСТОЯНИЕ СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНОГО ЗВЕНА  
ГЕМОСТАЗА И ОКСИДА АЗОТА У БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ**

5A510103 - Гематология и трансфузиология

**Диссертация на соискание академической степени магистра**

**Научный руководитель:**

Доцент, к.м.н. Рустамова Х.М.

Ташкент – 2014

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список используемых сокращений.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Современные представления об эритремии.....	9
1.2. Патология системы гемостаза при эритремии.....	21
1.3. Состояния оксида азота при эритремии.....	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1. Методы исследования.....	38
2.2. Статистическая обработка результатов.....	42
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	44
ГЛАВА 3. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА И ОКСИДА АЗОТА У БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ.....	44
3.1. Клиническая характеристика больных эритремией .....	44
3.2. Состояние гемостаза у больных эритремией.....	50
3.3. Состояние оксида азота у больных эритремией.....	52
3.4. Оценка корреляционных связей между показателями оксида азота в сыворотке крови, гемостаза и тяжестью течения эритремии.....	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	
ВЫВОДЫ.....	55
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	56
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	57

## СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОС – антиоксидантная система

АФК – активные формы кислорода

ИП – истинная полицитемия

НАДФ – Н – никотинамидаденилдинуклеотидфосфат восстановленный

ККВ – каолин-кефалиновое время

ПТИ – протромбиновый индекс

ГАТ – гемализат – агрегационный тест

NO – оксид азота

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность выбранной темы.** Эритремия (истинная полицитемия, болезнь Вакеза) – это миелопролиферативное клональное заболевание крови, которое характеризуется пролиферацией и гиперплазией эритроидного ростка в связи с поражением клетки-предшественницы миелопоэза, что сопровождается увеличением массы эритроцитов, повышением гематокрита, количества лейкоцитов и тромбоцитов. Важнейшие проявления болезни – повышенная вязкость крови, функциональные нарушения тромбоцитов, тромбозы мелких сосудов (сладж-синдром), кровоизлияния в органы, вторичная гипертензия, дисциркулоэнцефалопатия и др. [Окороков А.Н., 2001].

Причина эритремии не выяснена. Патогенетическим фактором эритремии является гиперчувствительность стволовой кроветворной клетки к эритропоэтину и, возможно, другим гемопоэтическим факторам, что приводит далее к экспансивной пролиферации всех трех ростков кроветворения [Окороков А.Н., 2001].

Эритремия считается болезнью взрослых, но встречается так же у молодых и детей [F. Passamonti et al., 2003]: средний возраст больных колеблется от 60 до 79 лет [N.I. Berlin, 1975; V. Ania et al., 1994]. Молодые люди болеют реже, но болезнь у них протекает тяжелее: пациенты моложе 40 лет составляют лишь 5% [Вуд М., Бонн П., 2001]. Относительно частоты заболевания существует разное мнение. Так, было показано, что в США ежегодно регистрируется 4-5 новых случаев эритремии на 1 млн. населения [Modan B., 1965]. Шведские ученые дают частоту 2,8 случаев на 100000 населения в год [Kutti J., Ridell B., 2001]. В случае с Миннесотской популяцией (США) было показано, что каждый год регистрируется 1,9 случаев на 100000 населения и при этом мужчины болеют чаще, чем женщины (соотношение 1,5:1,0) [Ania B. et al., 1994]. Нужно отметить, что среди больных молодого и среднего возраста преобладают женщины. По структуре и среднегодовым

показателям заболеваемости эритремия занимает 4 место после хронического миелолейкоза. В среднем частота заболевания считается 0,6 случаев на 100000 населения [Назыров Ф.Г. и др., 2000]. Эритремия чаще всего развивается в возрасте 50-60 лет, болеют чаще мужчины.

Для клинической картины заболевания характерны: слабость, снижение массы тела, головные боли, жгучие боли в области пальцев рук и ног, снимаемые приемом ацетилсалициловой кислоты или дипиридамом, интенсивный кожный зуд, усиливающийся после приема душа и горячей ванны, боли в области сердца, боли в эпигастрии после еды и натошак, боли и тяжесть в левом подреберье, боли костях и суставах, при осмотре у больных с эритремией наблюдается вишнево-красная или багрово-цианотичная окраска кожи и видимы слизистых оболочек, гиперемия конъюнктивы и инъекция сосудов склер.

В диагностике заболевания важную роль играют лабораторные данные. Такие как, общий анализ крови: отмечается повышение уровня гемоглобина, гематокрита и количества эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, снижение СОЭ.

В биохимическом анализе крови отмечается повышение содержания в крови мочевой кислоты, лизоцима и транскобаламина.

В миелограмме отмечается гиперплазия всех трех ростков кроветворения с отчетливым преобладанием эритроидного и мегакариоцитарного ростков и значительным уменьшением количества жировой ткани.

Исследование гемостаза проводится в динамике у всех больных эритремией, в частности при клинических признаках нарушения микроциркуляции, тромбоэмболических осложнениях и геморрагическом синдроме, при подозрении на наличие ДВС-синдрома.

В последние годы доказана значительная роль эндотелиальных факторов в патогенезе и течении многих заболеваний. В то же время при эритремии роль

этих факторов, в частности оксида азота (NO) не изучена. В то же время нарушения гемостаза играют одну из ведущих ролей в течении заболевания.

Как известно, оксид азота вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов. Он представляет собой уникальный по природе и механизмам действия вторичной мессенджер в большинстве клеток организма. NO выполняет роль сигнальной молекулы в различных нейрональных функциях, участвует в пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток стенки сосудов, в контроле артериального давления, возникновении атеросклероза и гипертензий в сосудистой системе (Рахматуллина Ф.Ф., 2005).

Исследование состояния и механизмов нарушения регуляции кислородзависимых процессов позволяет выявить общие закономерности и уточнить патогенез различных заболеваний. Имеющиеся к настоящему времени данные позволяют считать, что, как в реакциях окислительного стресса, так и в механизмах антиоксидантной защиты принимает участие оксид азота.

Система оксида азота являются универсальными факторами регуляции стрессорных и адаптивных ответов организма. В настоящее время выдвинута гипотеза о том, что оксид азот участвует в регуляции стресс-реакции, ограничивая ее чрезмерную активацию, и ее повреждающие эффекты, как на центральном, так и на периферическом уровне. Эта гипотеза предполагает наличие наряду с известными стресс-лимитирующими системами (ГАМК-ергической, пептидергической, антиоксидантной и др.) и NO-ергической стресс-лимитирующей системы. Один из защитных эффектов оксида азота при стрессе связан с его способностью увеличивать активность антиоксидантных ферментов и экспрессию кодирующих их генов (Близнецова Г.Н., 2010).

Поэтому изучение окислительного и нитрозативного напряжения, а также локальных антиоксидантной и NO-ергической стресс-лимитирующих систем в норме, в процессе онтогенеза, при стрессе, адаптации и развитии

патологических состояний является весьма актуальным и перспективным. Учитывая большую функциональную нагрузку данных метаболических систем, можно предполагать, что регуляция межклеточных и системных взаимодействий, связанных с изменением продукции оксида азота и изменениями антиоксидантного статуса организма, окажется весьма эффективным способом предупреждения и лечения многих заболеваний.

Таким образом, всё выше изложенное подтверждает актуальность изучения роли и значения оксида азота при эритремии.

**Степень изученности проблемы.** Несмотря на весьма важную медицинскую и социальную значимость данной проблемы, к настоящему времени определение состояния сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза и состояния системы оксида азота у больных с эритремией изучены недостаточно. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что нет однозначного мнения о роли оксида азота у больных с эритремией.

**Цель исследования:** изучение состояния сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза и состояния системы оксида азота у больных с эритремией.

**Задачи исследования:**

1. Выявление ранних диагностических критериев и факторов риска тромбогенных осложнений при эритремии.

2. Исследование состояния гемостаза у больных с эритремией. Каолин-кефалиновое время, протромбиновое время, толерантность плазмы к гепарину, фибриноген плазмы, фибринолитическая активность, ретракция кровяного сгустка, адгезия (ретенция) тромбоцитов, гемолизат-агрегационный тест, гематокрит.

3. Изучение состояния системы оксида азота у больных с эритремией.

4. Корреляционный анализ полученных показателей систем гемостаза и оксида азота, изучение их взаимосвязи и взаимообусловленности.

**Методы исследования:** Клинико-лабораторные, общий анализ крови (подсчёт гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и СОЭ),

биохимические (общий белок, билирубин общий, прямой и не прямой билирубин, АЛТ, АСТ, остаточный азот, мочеви́на, креатинин, сывороточное железо), гемостазиологические (коалин-кефалиновое время, протромбиновое время, толерантность плазмы к гепарину, фибриноген плазмы, фибринолитическая активность, ретракция кровяного сгустка, адгезия (ретенция) тромбоцитов, гемолизат - агрегационный тест, гематокрит), изучение системы оксида азота (NO, eNOS, iNOS, ONOO<sup>-</sup>), УЗИ (органов брюшной полости).

**Научная новизна.** Впервые изучены видовые состояния системы оксида азота при эритремии, охарактеризована ее роль, значение и взаимосвязь а так же взаимообусловленность с сосудисто - тромбоцитарным звеном гемостаза.

**Объём исследования:** Исследование будет произведено с помощью архивного материала на оснований историй болезни больных эритремией, а так же будет исследована венозная кровь 18 больных эритремией находившиеся на стационарном лечении в клинике НИИ Гематологии и Переливания крови МЗ РУз, г. Ташкент.

**Ожидаемые результаты.** Будет выявлены новые патогенетические механизмы эритремии, что имеет важное теоретическое и практическое значение.

**Практическая значимость.** Проведенное исследование имеет важное теоретическое и практическое значение. Полученные результаты позволят составить более полное представление о физиологической роли оксида азота в регуляции сосудистой системы в норме и патологии.

## ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Современные представления об эритремии

Эритремия (истинная полицитемия, болезнь Вакеза, полицитемия красная, истинная) – это хронический лейкоз с поражением на уровне клетки-предшественницы миелопоэза, с характерной для опухоли неограниченной пролиферацией, сохранившей способность дифференцироваться по четырем росткам кроветворения, преимущественно по красному. [А.И. Воробьев, А.В. Демидова, Н.Д. Хорошко // Руководство по гематологии 2005 г. С-21]

Впервые заболевание было описано в 1892 г. Французским врачом Вакезом. Эритремия считается болезнью взрослых, но встречается и у молодых и детей [Руководство по гематологии / Под. ред. А.И. Воробьева. – М., 1985. – Т.1. – С. 252-262]: Средний возраст больных колеблется от 60 до 70-79 лет [Berlin N.I. Sem. Haemat. – 1975. – Vol. 12. – P. 339]. Молодые люди болеют реже, но болезнь у них протекает тяжелее: пациенты моложе 40 лет составляют лишь 5% [А.В. Демидова, руководство по гематологии / Под. ред. А.И. Воробьева. – М., 1985. – Т.1. – С. 252-262]. Относительно частоты заболевания существует разное мнение. Так, было показано, что в США ежегодно регистрируется 4-5 новых случаев эритремии на млн. населения [Chaiter V., Brenner B., Aghai E. et al. Leuk. Lymph. – 1992. – Vol. 7. – P. 251]. В случае с Миннесотской популяцией (США) было показано, что каждый год регистрируется 1,9 случаев на 100000 населения и при этом мужчины болеют чаще, чем женщины (соотношение 1,5:1,0). Частота встречаемости эритремии составляет 4% от всех опухолевых заболеваний крови. Нужно отметить, что среди больных молодого и среднего возраста преобладают женщины. По структуре и среднегодовым показателям заболеваемости эритремия занимает 4 место после хронического миелолейкоза. В среднем частота заболевания в мире от 0,6 до 1,6 случаев на 100000 населения [Siverstein M.N. Mayo Clin. Proc. – 1971. – Vol. 46 – P. 751].

К этиологическим факторам эритремии относятся ионизирующая радиация и химические мутагены различной природы, что подтверждается увеличением частоты заболеваний рабочих химических заводов, бензоколонок и жителей Японии после атомных бомбардировок в 1945 году [Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001.- 328 с].

Несмотря на более чем столетнюю (первые упоминания относятся к 1892г.) историю изучения этой патологии, до недавнего времени главной причиной ее возникновения считались хромосомные аномалии. Они выявлялись у 15-20% больных в момент диагностики, у 40% - в процессе лечения и более чем 80% - при развитии вторичного ОЛ [Kajiguchi T. Transformation of polycythemia vera to acute promyelocytic leukemia // Int. J. Hematology, - 2000. – Vol. 72. – P. 520-521.]. В начальной стадии болезни часто определяются трисомии 8 и 9 хромосом, делеция длинного плеча 20 (20q-) хромосомы, а при прогрессировании – делеции 13q-, 12q- и 1q [Kralovics R., Guan Y., Prchal J.T., Kralovics R., Гуань Ю., Prchal J.T. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. // Exp. Hematol., 2002. – Vol. 30. – P. 229-236.].

Как известно, дефекты хромосом - анеуплоидия, псевдоплоидия, структурные aberrации – имеют клональный характер и не обнаруживаются в лимфоцитах. У леченных цитостатиками больных они встречаются чаще. Больные с первоначально обнаруженными нарушениями кариотипа, не предрасположены к более злокачественному течению заболевания.

Изучение специфических генетических нарушений показало почти у 30% больных эритремией повреждения участков генома на 9 хромосоме, охватывающей большое число генов, в том числе JAK2 (9p24) регион [Kralovics R., Guan Y., Prchal J.T., Kralovics R., Гуань Ю., Prchal J.T. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. // Exp. Hematol., 2002. – Vol. 30. – P. 229-236.]. Однако все выявленные поломки

генома были неспецифическими и тем самым, указывали лишь на косвенное участие генетического механизма в патогенезе данного заболевания [Х.Я. Каримов, Н.Х. Шадиева, А.О. Абдуллаев. Клинико-диагностическое значение открытия мутации гена JAK 2V617F при истинной полицитемии/ Патология, №3 - 2009г - С-3-5].

Хотя морфологических ферментных и цитогенетических признаков поражения лимфатической системы при эритремии не имеется, функциональное состояние Т-лимфоцитов изменено: обнаружен сниженный ответ на известные митогены и повышение их спонтанной активности.[7]

Характерными патологоанатомическими признаками нелеченой эритремии являются переполнение всех органов и тканей кровью, тромбы и их последствия, а также изменения костного мозга, селезенки и печени различной выраженности.

Так морфологически, селезенка переполнена кровью, может содержать участки инфарктов различной давности, агрегаты тромбоцитов и, нередко, начальные, умеренные или значительные признаки миелоидной метаплазии с локализацией в синусах. Фолликулярная структура её обычно сохранена.

А.В. Демидова и соавторы в своих исследованиях выявили, что состояние костного мозга при эритремии характеризуется гиперплазией трех или двух ростков кроветворения. Следует различать:

1. Классический вариант, который обозначается панмиелозом: тотальная гиперплазия трех ростков кроветворения с выраженным мегакариоцитозом и редукцией жировой костной ткани вплоть до ее полного отсутствия; мегакариоциты отличаются крупными размерами;
2. Гиперплазию эритроидного и гранулоцитарного ростков с небольшой степенью мегакариоцитоза;
3. Гиперплазию эритроидного и мегакариоцитарного ростков;
4. Пролиферацию одного эритроидного ростка.

Подобный четвертому типу характер изменений костного мозга встречается исключительно редко и в самом начале эритремии, а затем эволюционирует в обычный панмиелоз.

В срезах костного мозга часто обнаруживается увеличение количества эозинофилов. Костномозговые полости расширены, трабекулы истончены. Соответственно степени гиперплазии костного мозга гиперплазируются и ретикулиновые волокна, сохраняя правильное строение до периода эволюции эритремии в миелофиброз [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. Волковой М.А. – М.: Медицина. 2001. – 273 с].

Отмечено, что в печени, наряду с полнокроем, наблюдаются очаги фиброза, дисконкомплексация печеночных балок, иногда – миелоидная метаплазия с локализацией в синусоидах. В желчном пузыре часто выявляется очень густая желчь и пигментные камни. Некоторые авторы обнаруживают уратовые камни, пиелонефрит, сморщенные почки [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27].

В анемической стадии заболевания наблюдается выраженная миелоидная метаплазия селезенки и печени, а так же гепатоспленомегалия на фоне фиброзированного костного мозга. При этом миелоидная ткань может быть и гиперплазированной и редуцированной, сосуды костного мозга резко увеличены в количестве и морфологически изменены. В паренхиматозных органах выявляются дистрофические и склеротические изменения. Нередки проявления тромботического или геморрагического синдрома [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27].

Функциональная активность эритропоэза, по данным радиологических исследований с применением  $^{59}\text{Fe}$  и  $^{52}\text{Fe}$ , резко повышена: укорочен период

полувыведения ( $T_{1/2}$ ) радиоактивного железа, введенного в вену, усилена его утилизация костным мозгом и ускорен кругооборот [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27].

Исследование с помощью  $^{99m}\text{Tc}$  при эритремии выявляет нормальную топографию гемопоэза с его возможным распространением на проксимальные, а затем на дистальные отделы трубчатых костей, селезенку и печень. В дальнейшем постепенно уменьшается эритропоэз в плоских костях, а по мере развития миелофиброза и остеосклероза – и в трубчатых костях [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27].

Наблюдается ускорение захвата  $^{59}\text{Fe}$  без должного роста радиоактивности эритроцитов, что свидетельствует о гибели части эритроидных элементов на ядерных стадиях. «Селезеночные» эритроциты имеют маркеры эмбрионального эритропоэза [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27]. Продолжительность жизни эритроцитов при эритремии может быть нормальной и укороченной, причем по мере увеличения селезенки она укорачивается. Тромбоцитопоэз, исследованный с помощью  $^{51}\text{Cr}$ , усилен у всех больных, в среднем он превышает норму в 7,1 раза [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27]. Средняя продолжительность жизни тромбоцитов часто укорочена, имеется отрицательная связь между их выживаемостью и величиной селезенки [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27].

Многие авторы отмечают постепенное начало заболевания. Появляются и нарастают покраснение кожных покровов, слабость, тяжесть в голове, увеличение селезенки, артериальная гипертония, а у половины больных – мучительный кожный зуд после умывания, мытья, плавания (эритромелалгия –

острая жгучая боль и покраснение в кончиках пальцев, устраняемые ацетилсалициловой кислотой на 1-3 дня). Иногда первыми проявлениями заболевания становятся некрозы пальцев, тромбозы крупных артерий нижних и верхних конечностей, тромбофлебит, тромботический инсульт, инфаркт миокарда и легкого [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27].

В анамнезе у многих больных задолго до установления диагноза имеются указания на кровотечение после экстракции зубов, и «хорошие» (т.е. несколько повышенные) показатели красной крови, которым не придавали должного значения. Еще Wassermann, Gilbert (1966г.) разделили все симптомы заболевания на 3 стадии в связи со степенью гиперпродукции эритроцитов (плеторой), гранулоцитов, в том числе и базофилов, тромбоцитов, или клеточным гиперкатаболизмом, или миелоидной метаплазией селезенки [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Так, в I стадии, продолжительность которой составляет 5 лет и более, наблюдается умеренная плетора, селезенка не пальпируется. В крови на этой стадии преобладает умеренный эритроцитоз. В трепанате костного мозга – картина панмиелоза. Изредка на этой стадии картина трепаната нормальная. Возможны сосудистые и висцеральные осложнения [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27]. Выделение начальной (I) стадии эритремии условно. По существу это стадия с малосимптомными проявлениями, более свойственная пожилым больным. Следует дифференцировать эту стадию заболевания с вторичными эритроцитозами. Селезенка обычно не пальпируется, но скintiграфическое и ультразвуковое исследование нередко выявляет ее небольшое увеличение. Редко могут быть тромботические осложнения [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27].

IIА стадия процесса – эритремическая – является развернутой, она характеризуется миелоидной метаплазией селезенки. Продолжительность этой стадии составляет 10-15 лет и более. Субъективное состояние больных в это время чаще нарушено. Выражены плевора, спленомегалия и гепатомегалия. Чаще, чем в I стадии бывают тромбозы артериальных и венозных сосудов, геморрагические осложнения. В гемограмме выявляется эритроцитемия или эритроцитемия с тромбоцитозом или панмиелоз и нейтрофилез с палочкоядерным сдвигом, увеличением числа базофилов. В костном мозге наблюдается тотальная трехростковая гиперплазия с выраженным мегакариоцитозом, возможны ретикулиновый и очаговый, коллагеновый миелофиброз [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27].

IIБ стадия - эритремическая с миелоидной метаплазией селезенки. Плевора может быть выражена в большей или меньшей степени, наблюдаются спленомегалия и гепатомегалия. В крови в этой стадии отмечается панцитоз с лейкоцитозом выше  $15 \times 10^9/\text{л}$  и сдвигом лейкоцитарной формулы до миелоцитов, единичные эритрокариоциты, щелочная фосфатаза в гранулоцитах повышена. В костном мозге, как и в II А стадии – панмиелоз, но может преобладать гиперплазия гранулоцитарного ростка, возможен ретикулиновый и очаговый коллагеновый миелофиброз. В клинической картине нередко ведущими оказываются тромботические осложнения и уратовый диатез. В этой стадии могут наблюдаться истощение больного, рецидивирующие тромботические осложнения и кровоточивость [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27].

III стадия эритремии - анемическая. В ней обнаруживается картина хронического миелолейкоза с анемическим и тромбоцитопеническим синдромом или даже панцитопения. В костном мозге может быть выражен миелофиброз, миелопоэз в одних случаях сохранен, а в других – редуцирован.

В увеличенных селезенке и печени наблюдается миелоидная метаплазия. Исходом эритремии могут быть острый лейкоз, гипопластическая состояние кроветворения и трудно классифицируемые гематологические заболевания [А.И. Демидова, Н.Д. Хорошко// Руководство по гематологии. Под.ред. А.И. Воробьева. 2005г. С-21-27].

В развернутой стадии заболевания выявляются микроциркуляторные расстройства с клиникой эритромелалгии, переходящих нарушений церебрального и коронарного кровообращения и геморрагических отеков голеней, а также тромбозы венозных и артериальных сосудов и кровотечения. Уже в этой стадии могут быть нарушения гемостаза, которые выглядят как тромбофилия, выявляемая только лабораторно и не имеющая клинических проявлений. Вместе с тем нарушения гемостаза могут быть и более выраженными, вести к локальному внутрисосудистому свертыванию – ДВС – синдрому [Демидова А.И., Хорошко Н.Д., 2005].

Патогенез тромботических осложнений эритремии состоит в увеличении массы циркулирующих эритроцитов, замедлении тока крови и повышении ее вязкости. Так же способствует этому тромбоцитоз в крови нередко определяются циркулирующие агрегаты тромбоцитов, что бывает следствием нарушения их функциональных свойств [Демидова А.В., 2001].

Одной из уникальных особенностей эритремии является склонность к кровотечениям – спонтанным и особенно спровоцированным экстракцией зубов и любым другим, даже малым хирургическим вмешательством [Демидова А.И., Хорошко Н.Д., 2005]. Геморрагические осложнения эритремии полностью ликвидируются у больных, леченных кровопусканиями, когда нормализуются показатели гемоглобина, гематокрита [Демидова А.В., 2001]. С развитием эритремии (IIБ стадия), нередко наблюдается дефицит железа клинически проявляющийся слабостью, снижением сопротивляемости инфекциям, истончение ногтей [Демидова А.И., Хорошко Н.Д., 2005].

Следует отметить, что развитию анемической стадии предшествует определенная динамика клинико-гематологических данных, в частности, увеличение селезенки, постепенное уменьшение плеторического синдрома, появления лейкоэритробластической картины периферической крови. В костном мозге постепенно развивается миелофиброз, которому могут сопутствовать смена типа клеточной пролиферации, нарастание патологии сосудов костного мозга и неэффективность эритропоэза – исход эритремии во вторичный миелофиброз [Демидова А.В., 2001].

Анемия может быть железодефицитной, обусловленной кровотечениями и кровопусканиями, гемолитической, следствием неэффективного эритропоэза или сужения плацдарма эритропоэза при резко выраженном миелофиброзе. При исходе эритремии в острый лейкоз или в гипоплазию кроветворения наблюдается анемия, свойственная этим процессам [Демидова А.В., 2001]. Следует выделять гемодилюцию со снижением уровня гемоглобина, связанную с увеличением объема циркулирующей плазмы вследствие спленомегалии [Демидова А.И., Хорошко Н.Д., 2005].

Благодаря достижениям современной терапии продолжительность жизни больных приближается к популяционной, а медиана длительности болезни составляет от 11 до 15 лет. Основную угрозу для жизни больных в эритремической стадии представляют сосудистые осложнения, а в анемической – гематологические. Исследования показали, что удельный вес острого лейкоза, у больных, леченных цитостатиками увеличивается [Демидова А.И., Хорошко Н.Д., 2001]. Частота исхода эритремии в острый лейкоз составляет 1% у нелеченных и 11-15% у леченных цитостатиками. Чаще развиваются острый миелобластный, миеломонобластный формы лейкоза и эритромиелоз [Демидова А.И., Хорошко Н.Д., 2005].

Так как эритремия входит в группу эритроцитозов, то дифференциальный диагноз заболевания должен производиться на основании

следующей классификации. Различают следующие виды краснокровия (эритроцитозов). (Демидова А.В., 1985; Алексеев Н.А., 1998 с изм.)

- I. Эритремия
- II. Вторичные абсолютные эритроцитозы (вследствие повышенного образования эритропоэтинов).
  1. При генерализованной тканевой гипоксии (гипоксические, компенсаторные):
    - а) с артериальной гипоксией: «высотная» болезнь, хронические обструктивные заболевания легких, врожденные «синие» пороки сердца, артериовенозные соустья, ожирение – синдром Пиквика, карбоксигемоглобинемия (преимущественно вследствие курения табака);
    - б) без артериальной гипоксемии: гемоглобинопатии с повышенным сродством к кислороду, дефицит 2,3 – дифосфоглицерата в эритроцитах.
  2. При опухолях (паранеопластические, дисрегуляторные): гипернефроидный рак почек, гемангиобластома мозжечка, гепатома, миома матки, опухоли (или гиперплазия) коркового и мозгового слоев надпочечников, аденома и киста гипофиза, маскулинизирующие опухоли яичников.
  3. При локальной ишемии почек (дисрегуляторные): кисты почек (солитарные и множественные), гидронефроз, отторжение почечного трансплантата, стеноз почечных артерий.
  4. Кобальтовые (преимущественно экспериментальные).
- III. Вторичные относительные, гемоконцентрационные эритроцитозы: стресс-эритроцитоз, синдром Гайсбека, псевдополицитемия и др.
- IV. Первичный эритроцитоз. Под этим названием описан ряд семейных немиелопролиферативных заболеваний с неясным и неоднозначным патогенезом (Токарев Ю.Н. и др., 1981).

Эритремию диагностируют по определенным стандартизированным критериям. На сегодняшний день критерии диагностики эритремии по PVSG выглядят следующим образом: [Berlin N.I. Sem. Haemat., 1975].

Большие критерии :

A1 - увеличение массы эритроцитов (гематокрит  $\geq 0,6$  у мужчин и  $\geq 0,56$  у женщин);

A2 – отсутствие причин для вторичного эритроцитоза (нормальная сатурация более 92%, отсутствие повышения уровня эритропоэтина (ЭП));

A3 – пальпаторная спленомегалия;

A4 – обнаружение клональной генетической аномалии (исключая bcr-abl);

Малые критерии:

B1 – тромбоцитоз (более  $400 \cdot 10^9/\text{л}$ );

B2 – лейкоцитоз (более  $10 \cdot 10^9/\text{л}$ , или более  $12,5 \cdot 10^9/\text{л}$  у курящих);

B3 – спленомегалия при радиологическом исследовании;

B4 – эндогенные эритропоэтиннезависимые колонии или низкий уровень ЭП. Диагноз устанавливается если A1+A2, либо один критерий А и два из группы В.

Наиболее доступна дифференциальная диагностика с помощью трепанобиопсии подвздошной кости, информативность которой – около 90%. Неопластическую пролиферацию важно отличать от реактивной, наблюдаемой при кровотечениях, сепсисе, раке некоторых локализаций, реноваскулярной гипертонии и др. Изредка изменений костного мозга при эритремии нет, и тогда диагноз эритремии можно поставить лишь в процессе длительного наблюдения при убедительной клинико-гематологической картине [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Больные, у которых причины полицитемии выяснить не удалось, следует отнести к группе больных с неклассифицируемой полицитемией. Цитостатическое лечение им не показано [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Лечение эритремии должно быть индивидуальным и зависит от стадии заболевания. В лечебные мероприятия обязательно входят : кровопускания и эритроцитаферез, химиотерапевтические средства и радиоактивный фосфор ;  $\alpha$ -интерферон; комбинация средств циторедуктивной терапии с кровопусканиями [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Так, с помощью кровопусканий достигается разгрузка сосудистого русла от избытка крови, что быстро дает симптоматический эффект. Повторные кровопускания способствуют развитию железодифицитного состояния. Но не влияют на лейкоцитоз и тромбоцитоз [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Задачей терапии кровопусканиями является нормализация показателя гематокрита(Ht) и количества гемоглобина (Hb) соответственно до 45% и 140-150 г/л. Именно при этих показателях нормализуется вязкость крови [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Отмечено рядом исследований, что кровопускания не устраняют кожный зуд, эритромелалгию, осложнения язвами желудка и двенадцатиперстной кишки, уратовый диатез. Они являются показанием к циторедуктивной терапии [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

По завершении лечения назначают контрольные анализы крови с частотой 1 раз в 4-6 нед по программе PVSG. При увеличении показателей Ht и Hb, с целью их нормализации снова осуществляют кровопускания. Если они удерживаются в норме, то больному назначают очередной осмотр через 2 мес, и так постоянно [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

С целью облегчения кровопусканий и профилактики тромботических осложнений, возникновению которых способствуют реактивное усиление тромбоцитопоза и выброс в кровь молодых, гиперфункциональных тромбоцитов, целесообразно назначить курс дезагрегантной терапии. Ее начинают накануне первого кровопускания и завершают через 2 нед после окончания лечения. Доза ацетилсалициловой кислоты составляет 0,2-0,3 г в день; в группе риска она может быть увеличена до 0,5 г в день. В дополнение к этому непосредственно перед кровопусканием следует ввести реополиглюкин в дозе 400 мл, через иглу Дюфо в кубитальную вену другой руки – 5000 ЕД гепарина [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Кровопускания могут быть заменены эритроцитаферезом: у больных забирают 1000 – 1400 мл эритроконцентрата, возвращают плазму и возмещают удаленный объем эритроцитов изотоническим раствором натрия хлорида и реополиглюкином. Эритроцитаферез хорошо переносится больными и вызывает нормализацию показателей крови на срок до 1-1,2 года [Ковалева Л.Г., Меликян А.Л., Пак Ин-Хо. Гематология и трансфузиология. – 1987.- Т. 32, №11, - С.10].

Общая оценка возможностей эксфузионной терапии дана в исследованиях PVSG. Так исчезают геморрагические осложнения, но сохраняется повышенный риск тромботических осложнений (29,2%), особенно в первые 3 года лечения, частота развития острого лейкоза составляет 1,5%, медиана выживаемости – самая высокая [ А.В. Демидова, Клиническая

онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

При их нарастании больных переводят на циторедуктивную терапию [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Химиотерапевтические препараты алкилирующего механизма действия – миелосан (бусульфан, милеран), циклофосфан и др., дают несомненный терапевтический эффект. Некоторые из них способны вызвать длительную ремиссию без поддерживающей терапии и нормализацию костного мозга, но в настоящее время применяются крайне ограниченно из-за их лейкозогенного действия [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Так, гидроксимочевина (гидреа, Hydrea, Hydroxyurea) впервые была применена американскими авторами после установления лейкозогенности хлорбутина и <sup>32</sup>P. Данный антиметаболит хорошо контролирует тромбоцитоз, лейкоцитоз, в меньшей степени – плетору, поэтому его прием приходится сочетать с кровопусканиями. Результаты лечения зависят от применяемых доз, стадии заболевания, а также индивидуальной чувствительности больных к данному препарату [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Новым направлением в лечении эритремии является терапия  $\alpha$ -интерфероном, которая находится все более широкое применение. Препарат подавляет патологическую миелопролеферацию, снижает продукцию тромбоцитов, лейкоцитов и в меньшей степени эритроцитов, не обладает лейкозогенным действием и является альтернативой химиотерапии [ А.В. Демидова, Клиническая онкогематология: руководство для врачей. / Под.ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. 2001. – С 272-287].

Исследователями выявлена, способность  $\alpha$ -интерферона контролировать кожный зуд, связанный с приемом водных процедур (поскольку другие виды циторедуктивной терапии, приведшей к исчезновению или уменьшению выраженности кожного зуда, составляла 1 – 12 мес) [Демидова А.И., Хорошко Н.Д., 2001].

На выбор метода лечения эритремии оказывает влияние возраст больных. По мнению американских авторов, в возрасте моложе 50 лет рекомендуется лечение кровопусканиями, в возрасте старше 70 лет – расширение показаний к любым видам цитостатической терапии, а в 50 – 70 лет – дифференцированный выбор терапии. При показаниях к цитостатической терапии предпочтение следует отдавать Hydrea. Конечно, эти рекомендации условны, тем более, что у больных молодого возраста заболевание протекает более тяжело, часто наблюдается панцитоз и имеется необходимость в цитостатической терапии. Следует учитывать, что, по мнению ряда авторов, кровопускания учащают исходы в миелофиброз и укорачивают время его развития [Демидова А.И., Хорошко Н.Д., 2001].

## **1.2. Патология системы гемостаза при эритремии**

Как известно, кровь - динамичная система. Силы, возникающие в результате взаимодействия текущей крови и сосудистой стенки, оказывают существенное регуляторное влияние на систему гемостаза и на всю систему кровообращения. Запуск процесса тромбообразования, скорость и характер образующегося тромба зависят от локальных гемодинамических условий. Взаимодействие клеток, плазматических белков и рецепторов системы гемостаза, экспрессия генов и метаболизм клеток, участвующих в гемостатических реакциях, модулируются локальными реологическими условиями, а те, в свою очередь, изменяются при образовании тромба [Долгов В.В., Свиринов П.В., 2005].

Исследование гемостаза целесообразно у всех больных полицитемией и абсолютно необходимо при клинических признаках нарушения

микроциркуляции, тромбоэмболических осложнениях и геморрагическом синдроме, при подозрении на наличие ДВС – синдрома. Рекомендуется определять агрегация тромбоцитов; время свертывания крови; протромбиновое и тромбиновое время; концентрацию в крови антитромбина III; антигепариновую активность плазмы и тромбоцитов; концентрацию продуктов деградации фибриногена; фибринолитическую активность (Окроков А.Н., 2003).

Нарушения в системе гемостаза при эритремии связаны с увеличением объема циркулирующих эритроцитов, повышением гематокрита, вязкости крови, тромбоцитоз, изменением тромбоцитарно-сосудистого и коагуляционного звеньев гемостаза [Ерофеева А.В., Танашян М.М., Кистенев Б.А., 2001].

По данным многочисленных авторов у больных эритремией в системе гемостаза разнонаправленные изменения, характеризующиеся удлинением времени рекальцификации плазмы, удлинением тромбинового времени, снижением протромбинового индекса, повышением толерантности плазмы к гепарину. Кроме того, обнаружены нормальные или несколько повышенные значения фибриногена с увеличением количества продуктов деградации фибриногена [Бессмельцев С.С., Федорова З.Д., Абдулкадыров К.М., 1989]. Наряду с повышением вязкости крови и гематокрита, способствующим замедлению тока крови в зонах микроциркуляции и сосудистым стазам, большое значение имеют нарушения тромбоцитарно-эритроцитарных взаимодействий [Архипов Б.Ф., Субач В.И., 1986; Белошевский В.А., 1982]. Тромбоциты больных эритремии часто находятся в состоянии активации, о чем свидетельствует увеличение содержания в плазме крови тромбоцитарного фактора 4,  $\beta$ -тромбоглобулина и тромбоксана [Суслина З.А., Танашян М.М., Гераскина Л.А., 2000]. Наиболее вероятной причиной этого является «болезнь хранения» с немотивированным высвобождением индукторов агрегации. Основными являются как количественные, так и качественные изменения

тромбоцитов. У больных эритремией наблюдается тотальная гиперагрегация тромбоцитов с повышенной их чувствительностью к индукторам агрегации [Ерофеева А.В., Танашян М.М., Кистенев Б.А., 2001]. Среди тромбоцитарных дефектов отмечены разнонаправленные изменения агрегации как под влиянием АДФ (вследствие нарушения реакции высвобождения), так и при стимуляции адреналином, коллагеном и тромбином.

Данная тромбоцитопатия наряду со склонностью тромбоцитов к спонтанной агрегации, множественными дефектами структуры мембраны тромбоцитов [Степченко М.А., 2007] находит объяснение в происхождении тромбоцитов из неопластического клона мегакариоцитов [Демидова А.В., 2001].

Отметим, что при эритремии наблюдается расхождение в результатах исследования функции тромбоцитов *in vivo* и *in vitro* [Гороховская З.Н., Авсецина О.П., Соболева В.В., Акатова Е.В., 2001]: при снижении степени агрегации тромбоцитов *in vitro* генерация тромбоксана  $A_2$  увеличивается [Гороховская Т.И., Халилов Э.М., Гороховская Г.Н., Фортинская Е.С., Соболева В.В., Кочетова М.М., Никитина Н.А., Мартынов А.И., 2003].

По мере увеличения продолжительности заболевания функциональная дефектность тромбоцитов возрастает. Очевидно, у части больных тромбоцитопатия носит приобретенный характер: при выходе из агрегатов тромбоциты теряют часть свойств [Демидова А.В., 2001].

По результатам данных А.Н. Окрокова наиболее часто обнаруживается нарушение агрегационной функции тромбоцитов. Нередко наблюдается дефицит плазменных факторов свертывающей системы крови, в частности фибриногена (чаще это относительный дефицит фибриногена в связи с интенсивным использованием его в ходе диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови) (Окроков А.Н., 2003).

Причиной геморрагического синдрома при эритремии проявляется спонтанной кровоточивостью десен, носовыми кровотечениями и экхимозами,

характерными для нарушений первичного, тромбоцитарно-сосудистого гемостаза. В то же время при оперативных вмешательствах, даже таких малых, как экстракция зуба, возникают массивные кровотечения, что возможно при нарушениях в системе свертывания крови и фибринолиза [Демидова А.В., 2001]. А причиной повышенного тромбообразования одни авторы считают увеличение количества тромбоцитов и их способности к агрегации, другие связывают повышение гемокоагуляционного потенциала с увеличением массы эритроцитов и высоким содержанием в них тромбопластических веществ [Ерофеева А.В., Танащян М.М., Кистенев Б.А., 2001].

В механизме гемостаза существенную роль играют эритроциты, как гемолизированные, так и интактные, обладающие соответственно фибринолитической и антифибринолитической активностью [Демидова А.В., 2001]. Эритроциты оказывают стимулирующее воздействие на агрегацию тромбоцитов, что доказывается при ее исследовании с помощью гемолизата собственных эритроцитов как индуктора агрегации [Жернов В.А., Зубаркина М.М., 2007]. Образование больших эритроцитарных агрегатов в виде многомерных фигур и необратимых конгломератов стимулирует усиление агрегации тромбоцитов. Согласно эритроцитарно - гемодинамической теории Борна, при активации эритроцитов из них выделяется АДФ, являющаяся, как известно, мощным индуктором агрегации тромбоцитов.

Роль эритроцитов в гемостазе обуславливается тем, что:

- они содержат и адсорбируют из плазмы вещества и соединения, а также белковые молекулы, влияющие на агрегацию клеток, свертывание крови и фибринолиз. Набор этих компонентов почти идентичен содержимому гранул тромбоцитов;
- от них зависят реологические свойства крови, особенно в зонах микроциркуляции. В местах сосудистых стазов эритроциты могут агрегировать. Они являются мощными индукторами агрегации тромбоцитов, причем этим свойством обладают как разрушенные, так и цельные

эритроциты. Эритроцитам свойственны также реакции высвобождения, аналогичные тромбоцитарным [Демидова А.В., 2001]. Однако гиперагрегация эритроцитов, низкая их деформируемость, высокая вязкость крови сопровождаются при эритремии гипокоагуляционными изменениями с наличием высокого уровня продуктов деградации фибриногена. Концентрация фибриногена в плазме может быть в норме, однако количество фибриногена, необходимое для укрепления массы форменных элементов в единице объема крови, снижено, что даже при оптимальной активности всех других факторов свертывания крови может вызвать кровотечение. Наблюдаются также и качественные дефекты фибриногена [Гороховская Г.Н., Завьялова А.И., Мартынов А.И., 2003].

Одним из факторов тромбогенности при эритремии является лейкоцитоз, особенно при повышении функциональной активности клеток. Лейкоциты также принимают активное участие в гемостазе, что зависит от многих факторов, в том числе от их способности взаимодействовать с тромбоцитами (феномен адгезии тромбоцитов к нейтрофильным лейкоцитам, розеткообразование) [Демидова А.В., 2001]. При этом возможно спонтанное появление смешанных лейкоцитарно - тромбоцитарных агрегатов, что играет значительную роль в формировании микроциркуляторных расстройств [Ерофеева А.В., Танащян М.М., Кистенев Б.А., 2001].

Достаточно характерным для эритремии признаком гемостатической дисрегуляции является одновременное наличие геморрагий и тромбозов. Склонность к тромбозам объясняется увеличением количества тромбоцитов, повышением их тромбопластиновой и антигепариновой функций, повышенной способностью к адгезии и агрегации, а также увеличением содержания эритроцитарных факторов свертывания крови [Ерофеева А.В., Танащян М.М., Кистенев Б.А., 2001]. Нарушение клеточной агрегации лежит основе патогенеза геморрагического отека. Этим термином можно обозначать

рожеподобную воспалительную гиперемию кожи нижней трети нижних конечностей [Демидова А.В., 2001].

Возникновение геморрагических проявлений, скорее всего, связано с относительной гипофибриногенемией, гипотромбинемией, нарушением функциональных свойств тромбоцитов, а также развитием ДВС – синдрома с коагулопатией потребления. При этом пусковыми механизмами могут быть гипоксия, замедление циркуляции кровотока, повреждение эндотелия сосудистой стенки, внутрисосудистый гемолиз, появление в кровотоке клеточно-тромбоцитарного, эритроцитарного и лейкоцитарного тромбопластина [Демидова А.В., 1985].

Подтверждением клеточно-агрегационного механизма развития геморрагического отека является быстрый клинический эффект приема ацетилсалициловой кислоты в суточной дозе 1 и 0,5 г, сопровождавшийся нормализацией уровня тромбоцитарного фактора 4. Это микроциркуляторное осложнение эритремии, которое всегда сопровождается мощной воспалительной реакцией, дающей повод предполагать рожистое воспаление. [Соколова М.А., Хорошко Н.Д., Дмитриева М.Г., Журавлев В.С., Сагдиева Н.Ш., Егорова М.О., Моисеева Н.С., Нарейко М.В., Гемджян Э.Г., Сахибов Я.Д., 2012].

Развитию тромбозов артериальных сосудов способствуют дополнительные факторы [Демидова А.В., 2001]:

- возраст старше 60 лет;
- тромбоз сосудов в анамнезе;
- артериальная гипертония (повышает риск церебрального инсульта и инфаркта миокарда);
- сопутствующий окклюзирующий атеросклероз любой локализации;
- эксфузии крови, если они совершаются без предшествующего введения реополиглюкина и приема ацетилсалициловой кислоты;

- тромбоцитаферез, проводимый без назначения антикоагулянтной и дезагрегантной терапии.

Спонтанные и спровоцированные оперативными вмешательствами кровотечения обусловлены нарушениями свертывания крови, фибринолиза и ретракции кровяного сгустка:

- замедлением превращения фибриногена в фибрин пропорционально увеличению показателя гематокрита (Ht). Наибольшие сдвиги определяются при Ht свыше 75%. Гипокоагуляционные сдвиги в конечном звене коагуляции обусловлены антикоагулянтным эффектом увеличенной массой циркулирующего эритроцита (МЦЭ). Подобное действие эритроцитов потенцирует относительная гипофибриногемия, свойственная эритремию;
- нарушением ретракции кровяного сгустка, зависящим от нескольких факторов, в том числе от функции тромбоцитов. Образующаяся в процессе свертывания фибрина тромбоцитарная сеть, рыхлая и крупнопетлистая, не в состоянии удерживать всю массу эритроцитов, попадающих в сгусток (феномен ускользания эритроцитов). Этому способствуют ригидность и плохая приспособляемость красных клеток к структуре сгустка при его сжатии.

Патогенез микроциркуляторной кровоточивости, клинически проявляющийся кровоточивостью десен, экхимозами на коже, носовыми кровотечениями, зависит преимущественно от снижения агрегации тромбоцитов [Демидова А.В., 2001].

Во многих гемостазиологических лабораториях нашей страны исследователи систематически совершают методологическую ошибку, изучая свертывание крови в образцах цельной крови. При этом результат всегда один: гипокоагуляция наблюдается даже в момент тромботических осложнений. Исследуемую кровь нужно разводить до нормального Ht. Малым объемом плазмы и антикоагулянтным эффектом эритроцитов в цельной крови, число

которых увеличено, объясняется неинформативность данного исследования [Демидова А.В., 2001].

Таким образом, при эритремии отмечается разнонаправленные сдвиги в системе гемостаза: признаки риска тромбообразования, коагулопатия потребления, дисфункция тромбоцитов. Что в клинике может проявиться виде ишемий различных органов и геморрагическим синдромом, т.е. диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови (ДВС синдромом).

### **1.3. Состояние оксида азота при эритремии.**

Мало кто мог себе представить, что небольшая и простая молекула высокотоксичного вещества – окиси азота (NO) – окажется «мастером на все руки» в биологических процессах. История изучения окиси азота, как биологической молекулы, началась в 1980 г. С открытия, сделанного Танненбаумом в Массачусетском технологическом институте. С того времени количество публикаций, посвященных NO, стало расти столь стремительно, что в 1994 г. Журнал «Science» назвал ее молекулой года. Исследования последних лет в области физиологии, патофизиологии, неврологии, биохимии, фармакологии, иммунологии показали, что эта молекула обладает широким спектром биорегуляторного действия. В 1998 г. R. Furchgott, L. Ignarro и F. Murad были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за цикл работ по изучению роли оксида азота "как сигнальной молекулы сердечно-сосудистой системы" [1].

Оксид азот – простейшее химическое соединение непрерывно продуцирующее ферментативным путем в органах и тканях, выполняя функцию одного из универсальных регуляторов физиологических и биохимических процессов в организме.

Молекула NO имеет неспаренный электрон, поэтому NO относится к свободнорадикальным веществам. Маловыраженная поляризация молекулы NO — одна из причин плохой растворимости NO в воде. В химические реакции с водой NO не вступает, и NO не является солеобразующим окислом. Кислород ( $O_2$ ) легко окисляет NO до солеобразующих окислов азота, в которых атомы азота имеют более высокие валентности и более высокие степени окисления. Гидратация солеобразующих окислов азота приводит к образованию азотистой ( $HNO_2$ ) и азотной ( $HNO_3$ ) кислот. Супероксид-анион ( $O_2^-$ ) окисляет NO до пероксинитрита ( $ONOO^-$ ) [42].

Возможность ионизации NO с образованием катиона-нитрозония ( $NO^+$ ) указывает на свойства NO как восстановителя. Спектр веществ, в отношении которых NO себя проявляет как восстановитель, невелик, но он обладает четко выраженными свойствами: высокой растворимостью в липидах и высокой способностью к диффузии. К ним относятся молекулярный кислород ( $O_2$ ), озон ( $O_3$ ), супероксид-анион ( $O_2^-$ ), молекулярный фтор ( $F_2$ ). Возможность ионизации NO с образованием аниона-нитроксила ( $NO^-$ ) указывает на свойства NO как окислителя. В отношении биоорганических соединений NO себя обычно проявляет как окислитель. Эти свободные радикалы – гидрофильны и легко подвергаются компартментализации в различных органеллах клетки. NO переходит в менее токсичные формы – нитрит ( $NO_2^-$ ) и нитрат ( $NO_3^-$ ) и очень токсичные – пероксинитрит ( $ONOO^-$ ) и полиокиси азота ( $NO_2$ ,  $N_2O_3$ ,  $N_2O_5$ ).

Один из атомов азота R-цепи аминокислоты L-аргинин — доказанный источник атома азота для молекулы NO, синтезируемой клетками млекопитающих и человека:  $L\text{-аргинин} + O_2 \rightarrow L\text{-цитруллин} + NO$ . Катализатор этой реакции — синтаза NO (NO-синтаза, или NOS, код фермента 1.14.13.39) [43, 44]. Ресинтез L-аргинина из L-цитруллина катализируется аргинин-сукцинатсинтазой и аргининсукцинатлиазой [45, 46]. К переносчикам L-аргинина относятся CAT-1 и CAT-2 — ферменты-транспортеры катионных аминокислот [43, 46]. Как и другие аминокислоты, L-аргинин участвует в

синтезе белка. Неполимеризованный L-аргинин стимулирует инкрецию гормонов: инсулина, соматотропина, пролактина, глюкагона.

Внутриклеточный синтез NO из L-аргинина при участии NOS протекает в присутствии тетрагидробиоптерина ( $\text{BH}_4$  или  $\text{H}_4\text{B}$ ) [2, 4-6 оксид азота и атеросклероз кардиология], никотинамиддинуклеотидфосфата (НАДФН), флавинадениндинуклеотида (ФАД), флавинмононуклеотида (ФМН) и протопорфирина IX [43, 44].

Конечные продукты обмена NO в организме млекопитающих и человека — анионы  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$ . Почками выводится более 90%  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$ , которые образуются из синтезируемого организмом NO [51]. Соли нитритов и нитратов хорошо растворимы в воде, не депонируются в клетках. Анионы  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  могут накапливаться в асцитической [52] и/или плевральной жидкости [53]. Если поступление  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  в организм с водой и пищей считать неизменным, если в серозных полостях не скапливается жидкость, то колебания мочевой экскреции  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  адекватно отражают изменения скорости биосинтеза NO.

Ингибиторам NOS относится – N-нитро-L-аргинин-метил-эфир (L-NAME) и N-монометил-L-аргинин (L-NMMA).

В свободном состоянии NO – короткоживущая молекула, период полужизни ее составляет 6-30 сек., после чего она быстро метаболизируется: газообразная – окисляется до  $\text{NO}_2$  и более высоких окисей азота; растворенная – с переходом в нитриты и нитраты.

К настоящему времени известны 3 изоформы NOS: 1) нейрональная, или нервальная (NOS-1, nNOS, NOS<sub>n</sub>); 2) индуцибельная (NOS-2, iNOS, NOS<sub>i</sub>); 3) эндотелиальная (NOS-3, eNOS, NOS<sub>e</sub>).

Нейрональная и эндотелиальная изоформы являются конститутивными или ингредиентными и обеспечивают синтез NO в нормальных условиях. Они кальцийзависимы.

Индукцибельная изоформа не зависят от уровня кальция в крови. В нормальных условиях они неактивны. Их синтез усиливается в ответ на действия определенных, часто патогенных стимулов.

Активность конститутивной NO-синтетазы, содержащейся в эндотелиальных, нервных клетках, тромбоцитах и некоторых других тканях, в условия физиологического покоя клетки постоянна и весьма низка. Однако, под влиянием ацетилхолина, брадикинина, серотонина, тромбина, АДФ, глутамата, стимулирующих вход кальция в клетку, ее кальцийзависимая активность заметно повышается, что приводит к синтезу небольшого количества (пикамоль) и выделению на короткое (несколько минут) время окиси азота, выполняющей через цГМФ в клетках-мишенях субрегуляторные («сигнальные») функции.

Активность индуцируемой, кальцийзависимой NO-синтетазы повышается на уровне гена.

Под влиянием иммуногенных и противовоспалительных стимулов (эндотоксины, бактериальные липополисахариды, гамма-интерферон, интерлейкин-1, некротизирующий опухолевый фактор - TNFB) происходит экспрессия гена, ответственного за синтез индуцируемой NO-синтетазы. Стимуляция ядра клетки для этих целей включает несколько (малоизученных) регуляторных звеньев в цепи соответствующих внутриклеточных реакций, оканчивающихся образованием стимулирующих ядро факторов. При этом соответствующие клетки (макрофаги, нейтрофилы, моноциты, клетки Купфера, гепатоциты, фибробласты) продуцируют и выделяют на протяжении многих часов (иногда дней) окись азота в тысячу раз больше, чем под влиянием ингридиентной NO-синтетазы. Окись азота в данном случае оказывает мощное повреждающее, губительное действие на проникающие в организм микробные и другие инородные клетки, осуществляя таким образом защитную функцию организма.

Существует 3 группы мишеней для NO:

- железосодержащие белки. Связывание NO с ними играет роль в цитотоксическом действии макрофагов, расслаблении мышц, синтезе АТФ и нервной передаче;
- белки, содержащие SH-группы. Взаимодействуя с ними, NO регулирует активность ферментов;
- кислородные радикалы. В результате связывания NO с кислородом образуются токсичные пероксинитриты.

Итак, небольшое количество NO, образуемое ингредиентной NO-синтетазой, действует как биологический регулятор – стимулирует цитозоловую гуаниловую циклазу и аккумулирует цГМФ, а индуцируемая NO – синтаза образует огромное количество NO, которая в реакции со свободными радикалами (перекисными) образует пероксинитрат (ONOO<sup>-</sup>). Он сокращает все биомолекулы на своем пути, разлагаясь до гидроксильного радикала и активированной двуокиси азота.

Было показано, что нормальные эндотелиальные клетки продуцируют особый «релаксирующий сосуда фактор» (ЭДРФ), в 1987 г. Установлено что это и есть NO. В дальнейшем было установлено, что уровень артериального давления поддерживается активностью системы L-аргинин- NO (активация снижает артериальное давление, а ингибирование - повышает). В практической медицине NO уже давно применяется как средство купирования приступов стенокардии и гипертонических кризов. R. Palmer и соавт. В 1987 г. первыми выяснили, что нитроглицерин и нитропруссид натрия являются донорами NO и что их клинический эффект обусловлен ее вазодилататорным действием.

Оксид азота присутствует во внутренней среде организма и влияет не только на сердечнососудистую систему, но и подавляет рост и размножение микроорганизмов многих видов [2—4]. В присутствии NO угнетаются синтез белка в клетках [5] и митоз клеток [6], подавляется пролиферация атипических клеток [4, 7, 8 Chlighilia R., Peter M.E., Rocha M. et al., 1998]. Среди неадренергических и нехолинергических синапсов имеются синапсы,

названные нитрегергическими, их медиатором является NO. Нитрегергические нервно-мышечные синапсы известны как стимуляторы миорелаксации [9]. NO содействует расслаблению гладких мышц трахеи [10], бронхов [11], кровеносных сосудов [12, Kaufmann PA RinoldiO Gnechni-Ruscione T et al 2004], способствуя гипотонии в большом и малом [13—15] круге кровообращения. NO — антикоагулянт, снижающий адгезию тромбоцитов [16, Горшунова Н.К., 2012] и лейкоцитов к сосудистому эндотелию, что не означает отсутствия способности лейкоцитов к адгезии к другим (не к эндотелиальным) клеткам [17].

Необходимо отметить, что при некоторых физиологических и патофизиологических состояниях возможно неферментативное образование NO. Так, при ишемии или наличии достаточных количеств восстанавливающих эквивалентов нитриты могут напрямую подвергаться восстановлению до образования NO [97].

Расслабление гладкомышечных элементов сосудов под действием нитроглицерина и его лекарственных аналогов объясняют высвобождением NO в процессе метаболизма этих лекарственных средств [18, 101 оксид азота и атеросклероз].

Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ). ангиотензин II (АТ II) вызывает существенное повышение уровня реактивные формы кислорода (РФК), в том числе супероксид-аниона, которые тормозят синтез и разрушают NO, вызывая его дефицит в эндотелиальных клетка (ЭК).

Было установлено, что симвастатин оказывает противовоспалительное действие [55], препятствует понижению уровня NO и активности eNOS, вызываемому повышенным содержанием липопротеинов низкой плотности (ЛНП) при атеросклерозе [56]. Последние уменьшают продукцию NO частично путем усиления взаимодействия между кавеолином-1 в поверхностной мембране ЭК и eNOS. Показано, что аторвастатин тормозит экспрессию кавеолина в ЭК и разрывает связь его с eNOS, увеличивая тем

самым продукцию NO [57—59]. Статины, кроме того, понижают активность НАДФН-оксидаз [60], сдвигая баланс между NO и супероксид-анионом в сторону первого, улучшая функции эндотелия.

С точки зрения микроциркуляции, помимо чисто сосудистых эффектов, особо следует отметить регуляцию системой L-аргинин – NO агрегации тромбоцитов и прилипание тромбоцитов и нейтрофилов к сосудистой стенке, взаимодействие с другими, регулируемыми эти процессы и тромбообразование в целом, факторами. В отличие от простациклина – мощного агрегационного фактора, продуцируемого сосудистым эндотелием – NO оказывает такой же эффект, синтезируясь для этого не только в эндотелиальных клетках, но и в самих тромбоцитах: сдерживает проагрегационное действие тромбоксана  $A_2$ , осуществляя, тем самым, саморегуляцию тромбоцитами собственной функциональной активности.

С точки зрения профилактики и лечения болезней сердца и сосудов особый интерес в этом плане представляет ацетилсалициловая кислота (АСК). Дело в том, что она, как известно, широко применяется в настоящее время не только как жаропонижающее и противовоспалительное средство, но и в целях профилактики ИБС (в частности тромбоза коронарных сосудов). Последнее основано на торможении АСК активности циклооксигеназы и образования тромбоцитами тромбоксана  $A_2$  – мощного сосудосуживающего и протромбогенного вещества. Сложность, однако, состоит в том, что одновременно тормозится образование этим же ферментом сосудорасширяющего и антитромбогенного простаглицина в эндотелиальных клетках (ЭК) сосудов.

Известно, однако, что даже в небольших дозах АСК может нарушать целостность слизистой оболочки желудка, вызывая эрозии и кровотечение. Риск таких осложнений обуславливает необходимость назначения АСК больным во время или сразу после приема пищи, но это не всегда оказывается достаточным.

Появилась группа NO выделяющих аспиринов (нитроаспирин), обладающих широким спектром антиатерогенных и других эффектов, помимо тех, которые свойственны только АСК. Они являются стабильными соединениями и могут высвобождать NO только после ферментативного гидролиза. Они же оказались более эффективными, чем АСК, в качестве противовоспалительного и антитромбогенного средства.

Большое внимание уделяется изучению функции NO в нервной системе. NO играет важную роль в синаптической передаче нервного импульса. Его функции связаны с одним из возбуждающих нейромедиаторов-аминокислотой глутаматом. Из пресинаптического нейрона в момент возбуждения выделяется глутамат, который быстро достигает мембраны постсинаптического нейрона и там связывается со специфическим рецептором. Это способствует проникновению  $Ca^{2+}$  в клетку, который активирует NO. NO быстро выделяется из нейронов и стимулирует в соседних клетках образование цГМФ, который участвует в дифференцировке, регенерации нейронов, выделении нейротрансмиттеров и формировании долговременной памяти. Итак, можно сказать, что NO служит медиатором действия возбуждающих аминокислот и является посредником между глутаматом и образованием вторичных мессенджеров, ответственных за различные клеточные ответы нейронов.

С. Curran соавт. Первыми доказали, что гепатоциты синтезируют NO; она легко преодолевает мембрану родительской клетки, межклеточное пространство, проходит через мембраны прилежащих клеток и оказывает на них цитостатическое и цитотоксическое действие. Окись азота может разрушать молекулу ДНК или ингибировать ее синтез, инактивируя нуклеотидредуктазу –энзим, определяющий скорость синтеза.

Следует помнить о генотоксических свойствах NO: о способности NO повреждать химическую структуру ДНК [37] и РНК [38]. Высказываются предположения об участии NO не только в защите от атипических клеток, но и в канцерогенезе [39, 40].

Некоторые цитостатики, способные генерировать оксид азот *in vivo*, уже нашли свое применение в клинике: например, Iomustin- производное N-нитрозомочевина для лечения рака легких, рака желудка и толстой кишки, опухолей мозга и множественной миеломы или Gydrea (N- гидроксимочевина) для лечения хронического миелолейкоза и эритремии [Петухов В.И., 2005].

Вместе с тем, оксид азота как натуральный адаптоген не может, очевидно, не защищать клетку от всего, что несет с собой угрозу ее жизнеспособности, в том числе от сигналов, запускающих самоубийственную программу. В норме эта протекторная функция NO обеспечивается главным образом eNOS и nNOS, в то время как в лейкозных клетках, например, при В-клеточном лимфолейкозе (66), волосатоклеточном лейкозе (32), остром Т-лимфобластном лейкозе (60), антиапоптозный эффект связан с активацией iNOS. Клини.герон.№10,2005

Антимикробные свойства NO хорошо изучено на модели культуры макрофагов, инфицированных различными возбудителями. Макрофаги содержат и NO-синтазу, и их бактерицидность тесным образом связана с синтезируемой NO. Синтез NO и фагоцитоз осуществляются только активированными макрофагами. Механизм активации макрофагов постоянно функционирует у здоровых и является первой ступенью в антимикробном ответе макроорганизма на инфекцию. Иммунные механизмы с включением Т-лимфоцитов активируются позднее.

Умеренно повышенные концентрации NO и его метаболиты (нитриты, нитраты, пероксинитрит и др.), которые получили название «реактивные интермедиаты азота» (РИА) оказывают на микобактерии туберкулеза бактериостатическое действие, а высокие – бактерицидное. Помимо токсического воздействия на микобактерии туберкулеза, NO и РИА стимулируют апоптоз макрофагов, являющихся средой для персистирующих в организме микобактерий туберкулеза.

Однако избыточному синтезу NO отводят важную роль в патогенезе артериальной гипотонии при инфекционно-токсическом шоке [19].

В здоровом организме печень представляет собой фильтр, который не пропускает микроорганизмов из просвета желудочно-кишечного тракта в системный кровоток. При хронических гепатитах и циррозах печени эффективность этого фильтра снижается вследствие развития портокавальных анастомозов, и бактерии, минуя печень, поступают в системный кровоток, что вызывает эндотоксемию.

Под влиянием эндотоксинов активируется и NO-синтетаза, которая начинает синтезировать NO, повышающую дилатационный тонус сосудов. Влиянием последнего фактора P.Vallansa и S.Moncada объясняют склонность больных циррозом печени к гипотензии.

NO можно рассматривать как сигнальную молекулу пищеварительной системы, так как NO стимулирует расслабление гладких мышц пищевода [23], желудка [24], тонкой кишки [25], толстой кишки [26], желчного пузыря [27], сфинктера печеночно-поджелудочной ампулы (Одди) [28]. В физиологических условиях эндогенный NO — один из медиаторов внешней секреции поджелудочной железы [29]. Присутствующий в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки NO — один из медиаторов дуоденальной секреции бикарбонатов в ответ на кислотное раздражение ее слизистой оболочки [30]. NO относится к медиаторам неспецифической защиты слизистой оболочки желудка (наподобие простагландинов) от химических и механических воздействий, повреждающих слизистую оболочку, например от этилового спирта и желчи [31], кислотного воздействия [32], водно-иммерсионного воздействия [33] и др. Изготавливаются содержащие NO пероральные лекарственные формы преднизолона [34], аспирина [35] и индометацина [36]. Высвобождение NO во время растворения в желудке перечисленных лекарственных форм снижает повреждающее действие ulcerогенных лекарственных веществ на слизистую оболочку.

Большой интерес система L-аргинин – NO представляет с точки зрения физиологии почек. NO постоянно синтезируется в эндотелиальных, гладкомышечных клетках почечных сосудов, мезангиальных и эпителиальных канальцевых клетках. Окись азота играет важную роль в регуляции почечного кровотока, экскреторной функции почек, тубулоглобулярного баланса. Сдвиги в активности этой системы участвуют в механизмах протеинурии, мезангиальной пролиферации, лейкоцитарной инфильтрации, в патогенезе почечной гипертензии, обструктивных нефропатий с нарушением пассажа мочи.

При патологических состояниях, воспалении, дефиците кислорода, протекающих на фоне гипоксии/ишемии, роль NO-синтазного механизма может снижаться. При этом активируется более мощная нитритредуктазная система образования NO. Нитритредуктазная система отражает реактивность i-NOS, которая индуцируется во всех клетках в ответ на экспрессию провоспалительных цитокинов ( $\gamma$  – интерферона, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8). Следует подчеркнуть, что e-NOS, i-NOS, NO могут находиться как на мембранах, так и в цитозоле, межклеточном пространстве. Конститутивная e-NOS в межклеточном пространстве снижает свою функцию. Вместе с тем, i-NOS в норме определяется в незначительном количестве и экспрессируется в цитозоль и внеклеточное пространство при экстремальных патологических состояниях. Таким образом, изменение соотношения e-NOS/i-NOS служит важным маркером состояния NO-синтазного механизма и оценки регуляции NO в тканях. Для оценки e-NOS мы использовали методику определения НД. Аналогичным образом изменяется активность HP, которая отражает активность i-NOS соответственно. Уровень NO определяли по сумме метаболитов нитритов ( $\text{NO}_2^-$ ) и нитратов ( $\text{NO}_3^-$ ) с помощью реактива Грисса.

Большой интерес вызвали данные о роли системы L-аргинин – NO в респираторном тракте. В легких представлены все три типа NO-синтаз. NO продуцируется конститутивными NO-синтазами эндотелия легочных

сосудов, нейронов неадренергической, нехолинергической ингибирующей нервной системой, эпителиальными клетками, а также индуцибельными NO синтетазами эпителия дыхательных путей. NO участвует в таких процессах, как регуляция тонуса и структуры легочных сосудов (NO-медиатор, через который эндотелий передает миоцитам команду о расширении сосудов при действии ацетилхолина, гистамина), бронходилатация (у человека выражена слабо, преимущественно в крупных бронхах), цилиарный транспорт, воспаления и иммунная защита.

В связи с этим актуально исследование состояния NO и системы гемостаза у больных эритремией, их взаимосвязей.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Характеристика обследованных клинического материала и метода

Клиническая часть работы выполнена на базе ТМА и НИИ Гематологии и Переливания крови МЗ РУз, г. Ташкент. Общая характеристика и основные этапы исследования представлены в таблице 2.

Под наблюдением находилось 38 человек с диагнозом эритремия, в возрасте от 60 до 79 лет (средний возраст 69,5 лет), из них 20 (52,6%) мужчин и 18 (47,4%) женщин. Наибольшая заболеваемость наблюдалась среди мужчин в возрасте от 60 до 79 лет.

Контрольную группу составили 10 практически здоровых лиц аналогичного возраста и пола.

Таблица 1

Характеристика обследованных больных эритремией по возрасту и по половому составу

Возраст (лет)	Мужчины	Женщины	Всего
60-69	12	10	22
70-79	8	8	16
Итого:	20	18	38

Диагноз эритремии выставлен на основании анализа данных клинических обследованных результатов лабораторных показателей (PVSG год)

#### 2.2. Методы исследования

Все пациенты проходили тщательное клиническое и лабораторно-инструментальное обследование. Определялись показатели периферической крови, биохимические, гемостазиологические и оксида азота, проводились ультразвуковое обследования, а также различные дополнительные

исследования по показаниям. Исследования проводились НИИГ и ПК в лаборатории гемостазиологии.

Состояние системы гемостаза оценивалось по следующим тестам:

- Сосудисто-тромбоцитарное звено гемостаза: количество тромбоцитов в камере Горяева; гемализат-агрегационный тест по З.С. Баркагану
- Коагуляционный гемостаз оценивался с применением базисных коагуляционных тестов (наборы "Технология-Стандарт", г. Барнаул):
- каолин-кефалиновое время по Larrieu, Wieland (1957);
- протромбиновый индекс (ПТИ) по методу А.Л. Qwick (1935) в модификации В.Н. Туголукова (1974);
- тромбиновое время (ТВ) по Э. Сирмаи (1957);
- фибриноген по методу Рутберг;
- ретракции кровяного сгустка по методу М.А. Котовщиковой и Б.И. Кузника (1962) в модификации Е.П. Иванова (1983);
- суммарная фибринолитическая активность крови, по методу Kowarzik;

Методики проведения всех тестов унифицированы, изложены в соответствующих руководствах [11,28,50,59] и в инструкциях к наборам, и здесь мы их не приводим.

Определение коагуляционных тестов проводили по мануальному методу исследования.

Забор крови для исследования проводились в утреннее время, между 89 часами, после ночного голодания. В предшествующие забору дни больные не получали лекарств, влияющих на гемостаз (антикоагулянты, дезагреганты, препараты изменяющие реологические свойства крови). Кровь из локтевой вены брали по стандартной методике в мерные пластиковые центрифужные пробирки, смешивали с 3,8% цитратом натрия (9:1) и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 минут для получения плазмы богатой тромбоцитами (PRP) и при 3000 об/мин в течение 10 минут для получения

бестромбоцитарной плазмы (PPP). Исследования проводили в период от 30 до 120 минут от момента взятия крови.

Соотношение крови и цитрата как 9:1 применялось только при нормальном гематокритном показателе, расчет необходимой дозы цитрата для стабилизации крови в зависимости от показателя гематокрита, проводился по формуле и номограмме, предложенный G.I.C. Ingram, M. Hills (1976).

### **Характеристика проведенных биохимических исследований**

В последние годы в литературе широко обсуждается вопрос о значении свободнорадикальных молекул NO как в патогенезе эритремии, так и в качестве тестов для диагностики, мониторинга течения заболевания и оценки эффективности лечения.

Многочисленные исследования показали, что определение NO в эритроцитах является чувствительным тестом для оценки активности воспалительного процесса и тяжести эритремии.

В настоящее время большинство исследователей полагают, что цитотоксическое (цитостатическое) действие NO обусловлено его способностью продуцировать в реакции с супероксидным радикалом ( $O_2^-$ ) пероксинитрит ( $ONOO^-$ ). Этот анион относительно стабилен в щелочной среде, но при физиологических значениях pH он, присоединяя протон, распадается в доли секунды, образуя соединение, способное оказывать как и другие протонированные продукты, мощное окислительное действие на различные внутриклеточные мишени. Это и определяет цитотоксический эффект  $ONOO^-$ , вызывающего гибель клеток по механизму апоптоза и некроза. Образование этого аниона является связующим звеном между NO и системой генерации активных форм кислорода.

Патологическая регуляция, приводящая к гиперпродукции NO

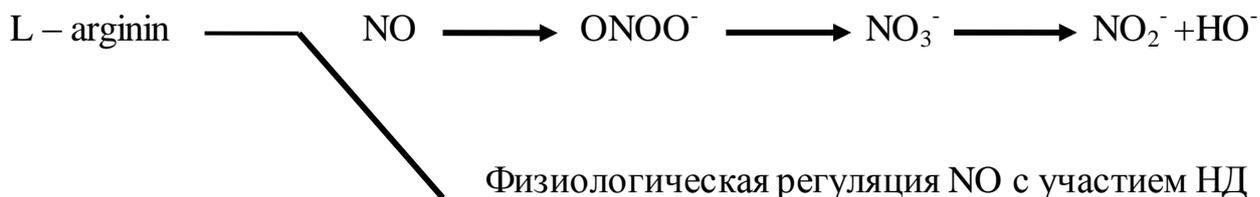


Рис. 2.1. Синтез и окислительные биопревращения оксида азота.

Исследуемые биохимические показатели в гемолизатах эритроцитов определяли у 18 больных. Эритроциты выделяли общепринятым методом. Кровь собирали в гепаринизированные пробирки из кубитальной вены утром натощак. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием при 600 об/мин в течение 5 минут. Затем их дважды отмывали охлажденным до 4<sup>0</sup>С 0,85% раствором NaCl с последующим центрифугированием при 2000 об/мин в течение 15 минут. В полученных образцах «упакованных» клеток определяли показатели, характеризующие состояние NO-эргической системы эритроцитов.

NO-продуцирующую функцию крови и дыхательных путей оценивали по результатам определения в эритроцитах стабильных метаболитов аэробного окисления NO – NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup> с использованием реактива Грисса.

**Уровень NO** определяли по сумме метаболитов нитратов и нитритов (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) по методике, описанной П.П. Голиковым и соавт. К 0,1 мл суспензии микросом добавляли 0,05 мл 5% NH<sub>4</sub>CL и 1,5 мл реактива Гриса (1% сульфаниламида, 0,1% нафтилэтанолamina, 2,5% фосфорной кислоты) инкубировали 10 мин. При комнатной температуре. Величину абсорбции измеряли при длине волны 546 нм на спектрофотометре СР-46 (Россия). В качестве стандарта использовали нитрит натрия (NaNO<sub>2</sub>). Расчет производили по формуле:

$$A = k \cdot E \text{ (нмоль/л)}$$

где: *k* - расчетный коэффициент, равный 40, *E* - показатель экстинкции пробы.

**Нитратредуктазную активность (НР)** определяли по А.С. Комарину, Р.К. Азимову (2005). Для этого к 0,1 мл суспензии эритроцитов добавляли 5·10<sup>7</sup>

<sup>2</sup> фосфатного буфера рН 6,5 содержащего 0,1 мл дитионита ( $4,6 \cdot 10^{-3}$  М в  $95 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{NaHCO}_3$ ), 0,1 мл 50 мМ NADPH, 0,1 мл  $\text{NaNO}_3$  ( $1 \cdot 10^{-1}$  М). Полученную смесь инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  на водяной бане в течение 30 мин. После инкубации пробы интенсивно встряхивали до полного обесцвечивания и доводили объем до 2,0 мл дистиллированной водой. Затем добавляли реактивы на нитриты, в том числе реактив Гриса. Активность НР рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{E_o - E_{исх}}{t \cdot V \cdot m} \cdot k \text{ (нмоль/мин/л)},$$

где:  $E_o$  – экстинкция опыта, определяемое после инкубации,  $E_{исх}$  – исходное количество нитритов (нмоль/л), определяемое до инкубации,  $t$  – время инкубации (30 мин),  $V$  – объем пробы (0,5 мл),  $m$  – содержание белка (мг/мл), определяемого по О.Н. Lowry et al. (1951),  $k$  – калибровочный коэффициент, равный 40.

**Активность НАДФН-диафоразы** определяли по V.T. Норе, S. R. S. Vinsent (1989).

Для этого к 0,1 мл образца (сыворотка), охлажденного до  $4^\circ\text{C}$ , добавляли 0,1 мл 0,1% раствора глутарового альдегида и инкубировали в течение 2 ч в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4. В этих условиях из класса диафораз сохраняла свою активность только НАДФН-диафораза. К 0,2 мл смеси добавляли 3 мл 0,1 М фосфатный буфер, содержащий 0,3% тритона X-100 «Serva». 0,5 мМ нитросинего тетразолия (НСТ) «Sigma», 1 мМ никотинамиддинуклеотидфосфата восстановленного (НАДФ<sub>2</sub>) «Sigma». Полученный состав инкубировали 10 минут при  $37^\circ\text{C}$  в водяной бане. Затем добавляли по 0,5 мл 15% трихлоруксусной кислоты (ТХУК) и повторно центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. образцы идентифицировали на спектрофотометре СФ-46 (Россия) при длине волны 565

нм. Активность фермента (А) выражали в нмоль/мин/мг белка, проводя расчеты с использованием формулы:

$$A = \frac{\Delta E}{k \cdot V \cdot t}$$

Где А – активность фермента,  $\Delta E$  - разность экстинкции между контролем (без белка) и опытным образцом,  $k$  – калибровочный коэффициент, равный  $6,52 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $V$  – объем образца (0,1 мл),  $t$  – время инкубации (10 мин).

**Уровень пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ )** определяли по окислению гидроксиламином ( $\text{NH}_2\text{O}^-$ ) и образовавшемуся пероксинитриту в реакции

$$\text{ONOO}^- + \text{NH}_2\text{O}^- \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO} + \text{H}_2\text{O}.$$

Реакцию запускали добавлением к 0,2 мл суспензии эритроцитов 0,2 мл 1,5% водного раствора гидроксиламина. В холостую пробу вносили 0,2 мл  $\text{H}_2\text{O}$ . Реакцию останавливали через 10 мин, добавлением 1,0 мл 4% раствора молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли на СФ-46 при длине волны 410 нм против контрольной пробы. Активность фермента выражали в нмоль/л и рассчитывали по формуле:

$$A = (E_{\text{хол}} - E_{\text{оп}}) \cdot V \cdot t \cdot k,$$

где А-содержание пероксинитрита (нмоль/л),  $E_{\text{хол}}$  и  $E_{\text{оп}}$  – экстинкция холостой и опытной проб,  $V$  - объем вносимой пробы (0,2 мл суспензии эритроцитов),  $t$  – время инкубации (600 с),  $k$  – коэффициент молярной экстинкции гидроксиламина, равный  $22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 2.3. Статистическая обработка результатов

Полученные данные подвергли статистической обработке, применяя пакет прикладных программ STATISTIKA (data analysis software system), version 6. – StatSoft, Inc. (2001), с вычислением среднеарифметической (M),

среднего квадратичного отклонения (сигма), стандартной ошибки (m), относительных величин (частота%), статистическая значимость полученных измерений при сравнении средних величин определялось по критерию (t) Стьюдента. За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности  $P < 0,05$ . При этом учитывались существующие указания по статистической обработке данных клинических и лабораторных исследований.

Обработка результатов исследования проводилась с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6 for Windows» и «Exel XP» с использованием t-критерия Стьюдента, линейного корреляционного анализа.

## ГЛАВА 3. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА И ОКСИДА АЗОТА У БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ

### 3.1. Клиническая характеристика больных эритремией.

Под наблюдением находились 18 больных эритремией, у которых определяли показатели общего анализа крови, сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза и оксида азота венозной крови. Все пациенты состояли на «Д» учете НИИГ и ПК МЗ РУз с диагнозом эритремия, в активный период заболевания.

Клинические проявления эритремии многообразны, и как правило, складывается из гипервискозного, гиперпластического, тромбофелического, гипертензионного, стенокардического синдромов. В момент осмотра больные жаловались в основном на головные боли, общую слабость, повышение АД, кожный зуд, онемения конечностей и тяжесть в правом и левом подреберье, артралгию, боли в эпигастральной области и сердце. Данные объективного осмотра больных представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1

#### Клиническая характеристика обследованных больных

Симптомы	Количество n=18 (100%)
Головные боли	15 (83,3%)
Общая слабость	16 (88,8%)
Повышение АД	17 (94,4%)
Кожный зуд	14 (77,7%)
Онемение конечностей	17 (94,4%)
Тяжесть в правом подреберье	2 (11,1%)
Тяжесть в левом подреберье	10 (55,5%)
Артралгия	5 (27,7%)
Боли в эпигастральной области	4 (22,2%)

Как видно из представленной таблицы, основная масса пациентов жаловалась на симптомы связанные с нарушением кровообращения т.е. гипервискозный и гипертензионный синдром.

Гиперпластический синдром, который связан в основном с гепатоспленомегалией встречался у половины пациентов.

На основании физикального и лабораторного обследования больных, мы определили стадию заболевания эритремии по стандартизированной классификации PVSG (1975 г.)

Нам было интересно определить встречаемость диагностических критерий у больных (таблица 3.2.)

Таблица 3.2.

Диагностические критерии эритремии по PVSG у обследованных

Большие критерии:	II А n=11 (100%)	II Б n= 6 (100%)	III n= 2 (100%)
Увеличение массы эритроцитов	+ (11)	+ (5)	- (0)
Отсутствие причин для вторичного эритроцитоза	+ (7)	+ (5)	+ (2)
Пальпаторная спленомегалия	+(2)	+ (5)	+ (2)
Малые критерии:			
Тромбоцитоз (более $400 \cdot 10^9/\text{л}$ )	+ (4)	+ (4)	- (0)
Лейкоцитоз (более $10 \cdot 10^9/\text{л}$ , или более $12,5 \cdot 10^9/\text{л}$ у курящих)	+ (6)	+ (4)	+ (1)

Так, у больных во II А стадии заболевания диагноз был верифицирован в основном по большим критериям.

Больные во II Б стадии в 100% случаях имели 3 больших критерия и 75 % случае 2 малых критерия.

В анемической стадии заболевания больные имели в 100% случае 2 больших критерия PVSG.

Таблица 3.3.

Факторы риска развитию тромбозов артериальных сосудов

Факторы риска	II А стадия	II Б стадия	III стадия
Возраст старше 60 лет	10 (100%)	6 (100%)	2 (100%)
Тромбозов сосудов в анамнезе	4 (40%)	2 (33,3%)	1 (50% )
Артериальная гипертония (повышает риск церебрального инсульта и инфаркта миокарда)	8 (80%)	4 (66,6%)	2 (100%)
Сопутствующий окклюзирующий атеросклероз любой локализации	2 (20%)	2 (33,3%)	-
Экспузии крови, если они совершаются без предшествующего введения реополиглокина и приема ацетилсалициловой кислоты	3 (30%)	2 (33,3%)	-
Тромбоцитферез, проводимый без назначения антикоагулянтной и дезагрегантной терапии.	2 (20%)	2 (33,3%)	-

По общей принятой классификации больные эритремии делятся на 4 стадии []. В нашем обследовании мы не выявили больных в первой стадии заболевания, так как она прошла не заметно для пациентов.

Во II А стадии больные (n=10) жаловались в основном на головные боли (%), общую слабость, повышение АД, кожный зуд, онемение конечностей. Объективно у них было выявлено повышение АД (систолическое 140-180 мм.рт.ст., диастолическое 90-140 мм.рт.ст.).

Больные во II Б стадии больные (n=6) предъявляли жалобы на ощущение тяжести в правом и левом подреберье, повышение АД (систолическое 140-220 мм.рт.ст., диастолическое 90-180 мм.рт.ст.), кожный зуд, боли в эпигастрии, артралгию, боли в области сердца.

Анемическая или III стадия (n=2) эритремии у больных отмечалась жалобами на головокружение, общую слабость, бледность кожных покровов, подагрическую полиартралгию, болью в области сердца и эпигастрии.

Самым доступным и часто используемым при скрининге заболевания является общий анализ крови. Анализ гемограммы у больных эритремой показал существенные изменения со стороны гемопоза так, у больных во II А стадии отмечалось повышение показателей гемоглобина до  $184,2 \pm 3,7$  г/л (контроль  $126,6 \pm 1,5$ ), эритроцитов до  $6,7 \pm 0,3 \cdot 10^{12}$ /л (контроль  $4,3 \pm 0,08$ ); тромбоцитов до  $609 \pm 46,8 \cdot 10^9$ /л (контроль  $222,6 \pm 15,7$ ) и лейкоцитов до  $8,5 \pm 0,4 \cdot 10^9$ /л (контроль  $4,8 \pm 0,2$ ) в этой группе пациентов по сравнению с контролем, это свидетельствует об интенсивности гипервискозного синдрома и повышенному тромбогенному риску. (табл.3.4).

Во II Б стадии у больных отмечалось повышение показателей гемоглобина до  $201,0 \pm 2,6$  г/л (контроль  $126,6 \pm 1,5$ ), эритроцитов до  $7,4 \pm 0,2 \cdot 10^{12}$ /л (контроль  $4,3 \pm 0,08$ ), тромбоцитов до  $906,7 \pm 40,5 \cdot 10^9$ /л (контроль  $222,6 \pm 15,7$ ) и лейкоцитов до  $18,5 \pm 2,5 \cdot 10^9$ /л (контроль  $4,8 \pm 0,2$ ) в этой группе пациентов по сравнению с контролем.

При анемической или III стадии эритремии у больных отмечается уменьшение показателей гемоглобина до  $101,0 \pm 1,0$  г/л (контроль  $126,6 \pm 1,5$ ), тромбоцитов до  $375 \pm 5,0 \cdot 10^9$ /л (контроль  $222,6 \pm 15,7$ ). Следует отметить, что

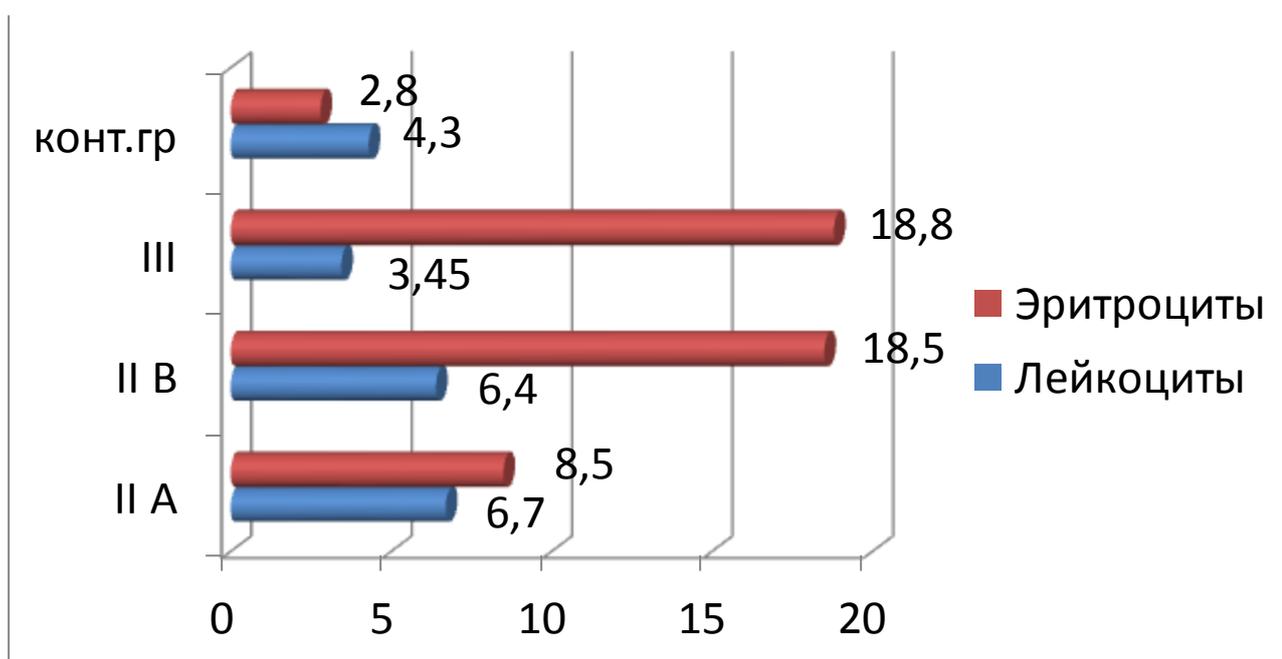
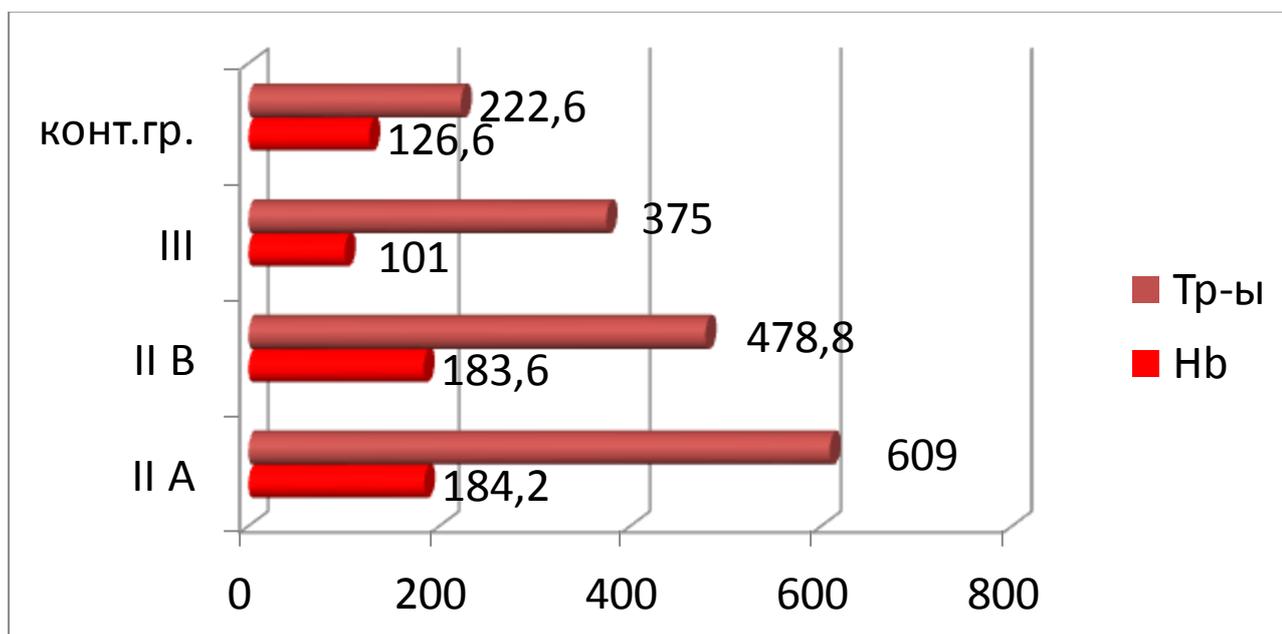
количество лейкоцитов при этой стадии заболевания в нашем исследовании держалось на высоком уровне  $18,8 \pm 4,2 \cdot 10^9/\text{л}$ .

Таблица 3.4.

## Показатели общего анализа крови у больных эритремией

Показатели	Контрольная группа (n=10)	IIА стадия (n=11)	IIБ стадия (n=5)	III стадия (n=2)
Гемоглобин г/л	126,6±1,5	184,2±3,7*	201,0±2,6**	101,0±1,0**
Эритроцит	4,3±0,08	6,7±0,3*	7,4±0,2**	3,45±0,4
Цветной показатель	0,9±0,02	0,9±0,02	0,8±0,04	0,8±0,02
Тромбоциты, $\cdot 10^9$ г/л	222,6±15,7	609,0±49,8**	906,7±40,5**	375±5,0**
Лейкоцит	4,8±0,2	8,5±0,4**	18,5±2,5**	18,8±4,2
СОЭ	4,5±0,4	2,1±0,1	1,4±0,2	2,5±0,5

\* Достоверность различий с контролем ( $p < 0,001$ ).



На основании показателей гемограммы у больных эритремией выявлено следующие критерии стадии заболевания. Во II A и II B стадии заболевания критериями эритремии являются увеличение уровня гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов. Критерий III стадии эритремии

явилось уменьшение уровня гемоглобина с достоверном увеличением тромбоцитов до  $375 \pm 5,0$  (контроль  $222,6 \pm 15,7$ ).

### 3.2. Состояние гемостаза у больных эритремией.

Всем больным, включенным в исследование, и представителям контрольной группе проводилась оценка основных параметров сосудисто – тромбоцитарного звена гемостаза. Коагулограмма изучалась при поступлении больных в клинику. При этом рассматривались особенности коагулограммы в зависимости от стадии эритремии.

При исследовании показателей сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза были выявлены следующие изменения (табл.3.5). Во II А стадии заболевания каолин-кефалиновое время была удлинено на 10% ( $44,9 \pm 3,4$  сек). В III стадии эритремии ККВ было не достоверно укорочено ( $37,5 \pm 2,5$  сек). Протромбиновый индекс (ПТИ) во всех стадиях заболевания был не изменен. Показатель толерантности плазмы к гепарину во II А стадии заболевания был достоверно удлинено до  $715,4 \pm 26,0$  сек ( $p < 0,001$ ), а в других стадиях этот показатель оставался в референтном значении. Количество фибриногена у больных эритремией II А стадии было увеличено до  $4,7 \pm 0,3$  ( $p < 0,001$ ), что указывает о сосудисто-воспалительном процессе. Показатели фибринолитической активности плазмы были не достоверно увеличены по отношению к контролю (II А стадия –  $205,9 \pm 11,9$ ; II Б стадия  $208,0 \pm 23,3$ ; III стадия  $220,0 \pm 20,0$ ). Адгезивная функция тромбоцитов были в пределах нормативных значениях. Гемализат агрегационный тест в  $10^{-2}$  разведении был достоверно укорочен во II А и II Б стадии соответственно ( $12,8 \pm 0,26$  сек,  $p < 0,001$ ;  $13,4 \pm 0,74$  сек,  $p < 0,05$ ). ГАТ  $10^{-6}$  был укорочен на 50% во II А и II Б стадии ( $21,1 \pm 1,59$ ,  $p < 0,001$ ;  $21,4 \pm 1,8$ ,  $p < 0,001$ ). Показатели ретракции кровяного сгустка были в пределах нормы во всех стадиях заболевания. Показатели гематокрита были достоверно увеличены во II А и II Б стадиях соответственно ( $54,9 \pm 1,3$ ,  $p < 0,05$ ;  $57,6 \pm 4,8$ ,  $p < 0,05$ ). То есть синдром

гипервязкости доминировал в этих стадиях и соответственно влиял на клинические жалобы пациентов.

Таблица 3.5.

Показатели сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза у больных эритремией

Показатели	Контрольная группа n=10	IIА стадия n=11	IIБ стадия n=5	III стадия n=2
Каолин-кефалиновое время, сек	42,1±0,5	44,9±3,4	49,4±5,7	37,5±2,5
Протромбиновый индекс, сек	81,3±1,57	84,8±2,8	81,2±3,1	86,5±1,5
Толерантность плазмы к гепарину, сек	524,5±10,8	715,4±26,0**	576±46,8	497,5±2,5
Фибриноген плазмы, г/л	3,19±0,14	4,7±0,3**	4,1±0,8	4,1±0,05
Фибринолитическая активность, %	179,5±12,1	205,9±11,9	208,0±23,3	220,0±20,0
Адгезия тромбоцитов	27,3±1,6	29,5±1,5	30±2,3	26±4,0
Гемолизат-агрегационный тест 10 <sup>-2</sup>	15,8±0,38	12,8±0,26**	13,4±0,74*	14,5±2,5
Гемолизат-агрегационный тест 10 <sup>-6</sup>	32,4±0,47	21,1±1,59**	21,4±1,8**	24±9,0
Ретракция кровяного	0,3±0,2	0,3±0,02	0,32±0,03	0,33±0,02

сгустка, %				
Гематокрит	37,6±1,6	54,9±1,3*	57,6±4,8*	35,0±3,0

\*Достоверность различий с контролем ( $p < 0,05$ );

\*\*Достоверность различий с контролем ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, при эритремии наблюдаются умеренные изменения в системе гемостаза в сторону гиперкоагуляции, о чем свидетельствует повышение уровня фибриногена, укорочение гемолизат агрегационного теста, ККВ, снижение фибринолитической активности и ПТИ, без изменения ККВ, фибринолитической активности. Одновременно наблюдается активация сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза с гиперагрегацией тромбоцитов.

### 3.3. Состояние оксида азота у больных эритремией.

В последние годы в медицине NO-синтазному пути отводится важная роль как маркеру состояния эндотелиальной функции мембранных структур и связанных с ней физиологических процессов в тканях [ ].

При исследовании показателей оксида азота были выявлены следующие изменения (табл.3.6.). Так, уровень NO во всех трех стадиях заболевания был снижен более на чем в два раза по сравнению с контролем (соответственно  $9,6 \pm 0,6$ ;  $10,29 \pm 1,15$ ;  $10,8 \pm 1,4$ ;  $p < 0,05$ ). Так как при патологических состояниях, такие как эритремия и др. имеет место дефицит кислорода протекающий на фоне ишемии (при нарушении микроциркуляции).

Таблица 3.6.

Показатели системы оксида азота у больных эритремией.

Показатели	Контрольная группа	IIА стадия (n=11)	IIБ стадия (n=5)	III стадия (n=2)
------------	--------------------	-------------------	------------------	------------------

	(n=10)			
NO, нмоль O <sub>2</sub> /мин/мл	22,34±0,8	9,6±0,6**	10,26±1,15**	10,8±1,4*
eNOS, нмоль/мин/мг	14,08±0,8	8,1±0,3**	8,38±0,5**	9,6±0,2**
iNOS, нмоль/мин/мг	0,09±0,009	0,81±0,02**	0,88±0,02**	0,81±0,005**
ONOO <sup>-</sup> нмоль/мин/л	0,08±0,005	0,27±0,02**	0,33±0,04**	0,25±0,029*

\*Достоверность различий с контролем (p<0,05);

\*\*Достоверность различий с контролем (p<0,001).

Данные полученные в ходе исследования уровня конститутивной e-NOS была снижена на 40-30% во всех стадиях эритремии (соответственно 8,1±0,3; 8,38±0,5 и 9,6±0,2; p<0,05).

Реактивность i-NOS, которая отражает нитритредуктазную систему у больных эритремией была в десять раз увеличена, что говорит об активации этой системы. Известно что i-NOS в норме определяется в незначительном количестве и экспрессируется в цитозоль и внеклеточное пространство при экстремальных патологических состояниях имевшим место у наших больных.

Уровень ONOO<sup>-</sup> был достоверно выше у всех больных эритремией чем в контрольной группе (соответственно 0,27±0,02; 0,33±0,04; 0,25±0,029; p<0,05).

Таким образом, проведенное исследование выявило достоверный дисбаланс системы оксида азота и напряженности нитритредуктазной системы NO.

Таким образом, проведенное исследование выявило в у больных эритремией NO-синтазная активность была повышена, что выразилось в

увеличении концентрации i-NOS/e-NOS в плазме крови и цитозоле тромбоцитов.

### **3.4. Оценка корреляционных связей между показателями оксида азота в сыворотке крови, гемостаза и тяжестью течения эритремии.**

Так, мы выявили внутрикоагуляционные связи при эритремии: показатель толерантности плазмы к гепарину и уровень фибринолитической активности имеют явную положительную связь между собой  $r=0,65$ . А показатель фибриногена плазмы и ретракция кровяного сгустка связаны между собой отрицательной сильной корреляционной связью ( $r= -0,64$ ). Каолин-кефалиновое время и уровень адгезии и агрегации тромбоцитов в  $10^{-2}$  разведении связаны между собой средней положительной корреляционной связью.

Рассматривая взаимосвязь гемостаза и системы NO мы выявили следующие значения. Так, NO слабо связан каолин-кефалиновым временем ( $r= 0,39$ ). Протромбиновый индекс и e-NOS взаимосвязаны сильной положительной связью.

Фибриноген плазмы, а так же фибринолитическая активность были отрицательно взаимосвязаны с e-NOS (соответственно  $r= -0,66$  и  $r=0,63$ ). Протромбиновый индекс был положительно взаимосвязан так же с i-NOS  $ONOO^-$  ( $r= 0,60$  и  $r= 0,50$ ).

ГАТ 10-2 разведении был отрицательно связан с  $ONOO^-$  ( $r= -0,66$ ).

Учитывая вышеизложенное можно утверждать, что при эритремии бывает различная взаимосвязь между показателями системы гемостаза и оксида азота. Так же, это взаимообусловлено с тяжестью заболевания.

## **ВЫВОДЫ:**

1. На основании диагностических критерие по PVSG выявлены ранние диагностики эритремии.
2. II А и II Б стадии эритремии наиболее опасна сфере риска развития тромбозов.
3. Исследования состояния системы гемостаза у больных эритремией выявлена выраженная активация сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, проявляющаяся в повышении агрегационной, адгезивной, ретракционной функции тромбоцитов.
4. Установлены дисбаланс системы оксида азота с понижением NO, eNOS и увеличением уровней iNOS и ONOO<sup>-</sup> во всех стадиях эритремии.
5. Установлены прямые корреляционные взаимосвязи между системой NO и некоторыми показателями гемостаза, которые чисто взаимосвязаны с тяжестью эритремии.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Выявленные факторы риска развития тромбозов при эритремии позволят профилактику осложнений заболевания.
2. Для ранней диагностики эритремии в первичном звене здравоохранения рекомендовано направить больных с повышенном уровня гемоглобина, эритроцита, лейкоцита, тромбоцита и СОЭ до 1-2 мм/ч в специализированное учреждения.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абанькин, В.П. Свободнорадикальное окисление и его роль в биологических процессах / В.П.Абанькин. - Пермь, 1986. - С. 3-22.
2. Абрамова, Ж.И. Человек и противокислительные вещества / Ж.И. Абрамова Г.И. Оксенгендлер. - Л.: Наука, 1985. - 228 с.
3. Агишева, К.Н. Перекисное окисление липидов и состояние антиоксидантной системы у больных системной красной волчанкой / К.Н. Агишева, И.Г. Салихов // Клиническая медицина. - 1990. - №6. - С. 99-101.
4. Ажипа, Я.И. Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса/Я.И. Ажипа. - М.: Наука, 1983. -98 с.
5. Айдарханов, Б.Б. Молекулярные аспекты механизма антиоксидантной активности витамина Е: особенности действия а и у - токоферолов / Б.Б. Айдарханов, Э.А. Локшина, Е.Г. Липская // Вопросы медицинской химии. - 1989. - №3. - С. 2-9.
6. Анмут, С.Я. Нарушения в системе гемостаза и контролируемая антитромботическая терапия при геморрагическом васкулите у детей: Автореф. дис... канд. мед. наук. - Свердловск, 1988. - 18 с.
7. Антиген фактора Виллебранда при системных васкулитах / А.А. Баранов, Н.П. Шилкина, Е.Л. Насонов [и др.] // Терапевтический архив. - 1993. - №5.- С.15-19.
8. Арчаков, А.И. Оксигеназы биологических систем / А.И. Арчаков. - М.: Наука, 1983.-53 с.
9. Ахмедов, Д.Р. Клинико-патогенетическое значение нарушений антиоксидантной системы, иммунного статуса и их коррекция у больных брюшным тифом и хроническим брюшным тифом: Автореф. дис... д-ра мед. наук. - М., 1994. - 43 с.
10. Баркаган, З.С. Геморрагические заболевания и синдромы / З.С. Баркаган. - М.: Медицина, 1988. - 528 с.

11. Баркаган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. - М., 2001. - 285 с.
12. Баркаган, Л.З. Нарушения гемостаза у детей / Л.З. Баркаган. - М.: Медицина, 1993.- 176 с.
13. Баркаган, Л.З. Патогенез и коррекция нарушений гемостаза при геморрагическом васкулите Шенлейна-Геноха / Л.З. Баркаган, Б.Ф. Архипов // Терапевтический архив. - 1980. - №9. - С. 59-62.
14. Барковская, И.А. Лайм-боррелиоз как причина геморрагического васкулита с летальным исходом / И.А. Барковская, К.А. Братковская, Г.Р. Гемке, И. Мазьянис // Республиканская центральная железнодорожная клиническая больница, 1944-1994: Сб. науч.-практич. работ. - Рига, 1994. - С. 63-67.
15. Бондарь, Т.Н. Восстановление органических гидроперекисей глутатионпероксидазой и глутатион-Б-трансферазой: влияние структуры субстрата / Т.Н. Бондарь, В.З. Ланкин, В.Л. Антоновский // Доклады АН СССР. - 1989. - Т. 304, №1. - С. 217-220.
16. Борисова, Е.В. Клинико-патогенетические аспекты геморрагического васкулита у детей: Дис... канд. мед. наук. - Кемерово, 1999. - 123 с.
17. Борисова, Е.В. Некоторые патогенетические аспекты геморрагического васкулита / Е.В. Борисова // Педиатрия. - 1997. - №4. - С. 106-110.
18. Бородин, Е.А. Структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов у больных инфекционно-аллергической бронхиальной астмой / Е.А. Бородин // Вопросы медицинской химии. - 1989. - №5. - С.109-114.
19. Бурлакова, Е.Б. Биоантиоксиданты: новые идеи и повторение пройденного / Е.Б. Бурлакова // Биоантиоксидант. - Тюмень, 1997. - С. 34.
20. Бурлакова, Е.Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты / Е.Б. Бурлакова, Н.Г. Храпова // Успехи химии. - 1985. - Т. 54, №9.-С. 1540-1558.

21. Визир, А.Д. Состояние свободнорадикального окисления у больных гипертонической болезнью / А.Д. Визир, Н.Ф. Башкина, И.Ф. Беленичев // Терапевтический архив. - 1995. - Т. 67, №12. - С. 45-47.
22. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. - М.: Наука, 1972. - 252 с.
23. Владимиров, Ю.А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко. - М.: Высшая школа, 1989.-С. 170-179.
24. Владимиров, Ю.А. Электрический парамагнитный резонанс и хемилюминесценция - прямые методы исследования свободных радикалов и реакций, в которых они участвуют / Ю.А. Владимиров // Эфферентная терапия. - 1999. - №4. - С. 18 -27.
25. Влияние а-токоферола на супероксиддисмутазную и глутатионпероксидазную активность цитозоля и митохондрий печени мышей / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Д.Р. Ракита [и др.]// Биохимия. - 1983. - №9. - С. 1555-1558.
26. Волощенко, Ю.В. Церулоплазмин: получение, свойства, применение / Ю.В. Волощенко // Актуальные вопросы биотехнологии. - М., 1987. - С. 56-58.
27. Выговская, Я.И. Циркулирующие иммунные комплексы и иммунная система при геморрагическом васкулите / Я.И. Выговская, В. Е. Логинский, Л.С. Захарчук // Терапевтический архив. - 1990. - №7. — С. 111-114.
28. Гемостаз: Учеб. пособие для врачей / Под ред. Н.Н. Петрищева, Л.П. Папаяна. - СПб., 1999. - 115с.
29. Говорова, Н.Ю. Влияние низкомолекулярных соединений на хемилюминесценцию люминола, обусловленную действием продуктов миелопероксидазного катализа и экзогенного гипохлорита / Н.Ю. Говорова, Б.П. Шариков, С.Н. Лызлова// Биохимия. - 1988. - №12. - С. 2025-2032.

30. Голод, Е.А. Перекисное окисление липидов в почечной ткани больных нефролитиазом и хроническим пиелонефритом / Е.А. Голод, А.Ф. Даренков, В.И. Кирнатовский // Урология и нефрология. - 1995. - №5. - С. 8-10.
31. Гринштейн, Ю.И. Васкулиты / Ю.И. Гринштейн. - Красноярск: ИПК "Платина", 2001. - 224 с.
32. Диканбаева, С.А. Оценка гемокоагуляции при нефрите Шенлейн - Геноха у детей / С.А. Диканбаева, Ш.Б. Муртазина // Тромбозы и геморрагии, ДВС-синдром. Проблемы лечения: Тез. докл. III Всерос. конф. - М., 1997. - С. 50-51.
33. Донченко, Г.В. Особенности проявления дозозависимого эффекта витамина Е на процессы перекисного окисления липидов, окислительное фосфорилирование и биосинтетические процессы / Г.В. Донченко, И.В. Кузьменко // Биооксиданты: Тез. докл. IV конф. - М., 1993. - Т. 1. - С. 29.
34. Журавлев, А.И. Спонтанная биохемиллюминесценция животных тканей / А.И. Журавлев // Биохемиллюминесценция. - М.: Наука, 1983. - С. 3-29.
35. Журавлева, А.И. Развитие идей Е.Б. Тарусова о роли цепных процессов в биологии / А.И. Журавлева // Биоокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. - М.: Наука, 1982. - С. 3-37.
36. Abnormally large von Willebrand factor multimers in Henoch-Schonlein purpura / A. Casonato, E. Pontara, A. Bertomoro [et al.] // Am. J. Hematol. - 1995. - Vol. 51. - №1. - P. 7-11.
37. Acenocoumarol-induced Henoch-Schonlein purpura / J. Borrás-Blasco, E. Girona, A. Navarro-Ruis [et al.] // Ann. Pharmacother. - 2004. - Vol. 38. - №2. - P. 261-264.
38. Alceri, R. C. Phagocytic leucocyte oxygenation activities and chemiluminescence / R. C. Alceri // Methods Enzymol. - 1986. - Vol. 133. - P. 449.
39. Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis / H.L. Rittner, V. Hafner, P.A. Klimiuk [et al.] // J. Clin. Invest. - 1999. - Vol. 103. - №7. - P. 1007-1013.

40. Algoet, C. Renal biopsy 2-9 years after Henoch-Schonlein purpura /  
 a. Algoet, W. Proesmans // Paediatr. Nephrol. - 2003. - Vol. 18. - №5. - P. 471-473.
41. Al-Narbi, N.N. Henoch-Schonlein nephritis complicated with pulmonary hemorrhage but treated successfully / N.N. Al-Narbi // Paediatr. Nephrol. - 2002. - Vol. 17. - №9. - P. 762-764.
42. Ameal Guirado, A.I. Purpura Schonlein-Henoch en adultos: estudio de 9 casos. / A.I. Ameal Guirado, J. Montes Santiago // Espanola de Medicina Interna. - 2004 - Vol. 21. - P. 79-80.
43. Bast, A. Oxidants and antioxidants: state of the art / A. Bast, G.R.M. Haenen, C.J.A. Doelman // Am. J. Med. - 1991. - Vol. 91. - Suppl. 3C. - P. 2S-3S.
44. Begin, M. E. Fatty acids, lipid peroxidation and diseases / M. E. Begin // Proc. Nutr. Soc. - 1990. - Vol. 49. - №2. - P. 261-267.
45. Beyer, R.E. The analysis of role of coenzyma Q in free radical generation and as an antioxidant / R.E. Beyer // Biochem. Cell Biol. - 1992. - Vol. 70. - P. 390-403.
46. Birmingham vasculitis activity score (BVAS) in systemic necrotising vasculitis / R.A. Lugmani, P.A. Bacon, R.J. Moots [et al.] // Q. J. Med. - 1994. - Vol. 87. - P. 671-678.
47. Blann, A. Von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease / A. Blann // Br. J. Biomed. Sci. - 1993. - Vol. 50. - P. 125-134.
48. Brox, J. H. The effect of polyunsaturated fatty acids on endothelial cells and their production of prostacyclin, thromboxane and platelet inhibitory activity / J.H. Brox, A. Nordoy // Thromb. Haemost. - 1983. - Vol. 50. - №4. - P. 762-767.
49. Burton, G. M. Vitamin E - antioxidant activity, biochemistry and bioavailability / G. M. Burton, M.G. Traber // Rev. Nutr. - 1990. - Vol. 10. - P. 357-382.
50. Cadenas, E. Biological chemiluminescence / E. Cadenas // Photochem. Photobiol. - 1984. - Vol. 40. - №6. - P. 823-830.

51. Carmody, R.J. Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis in vitro / R.J. Carmody, A.J. McGowan, T.G. Cotter // *Exp. Cell. Res.* - 1999. - Vol. 248. - №2. - P. 520 - 530.
52. Cerebral hemorrhage in Henoch-Schonlein syndrome / A. Chiaretti, E. Caresta, M. Piastra [et al.] // *Childs Nevr. Syst.* - 2002. - Vol. 18. - №8. - P. 365-367.
53. Choong, C.K. Intra-abdominal manifestations of Henoch-Schonlein purpura / C.K. Choong, S.W. Beasley // *J. Paediatr Child Health.* - 1998. - Vol. 34. - №5. - P. 405-409.
54. Chui, D. Lipid peroxidation in human Red cell / D. Chui, F. Kuypers, B. Libin // *Seminar Haematol.* - 1989. - Vol. 26. - №4. - P. 157-276.
55. Clinicopathological study of Henoch-Schonlein purpura nephritis with special reference to C3c deposits / K. Kumada, J. Suzuki, K. Kume [et al.] // *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* - 1996. - Vol. 38. - №6. - P. 259-268.
56. Complement 4 locus II gene deletion and DQA1\*0301 gene: genetic risk factors for IgA nephropathy and Henoch-Schonlein nephritis / D.K. Jin, T. Kohsaka, J.W. Koo [et al.] // *Nephron.* - 1996. - Vol. 73. - №3. - P. 390395.
57. Complement activation in Henoch-Schonlein purpura / G.C. Smith, J.E. Davidson, D.A. Hughes [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* - 1997. - Vol. 11. - №4. - P. 477-480.
58. Control of motility, exocytosis, and the respiratory burst in human neutrophils / M. Baggiolini, P. Kernen, D.A. Deranleau, B. Dewald // *Biochem. Sol. Trans.* - 1991. - Vol. 19. - P. 55-59.
59. Coppo, R. Clinical features of Henoch-Schonlein purpura / R. Coppo, A. Amore, B. Gianoglio // *Ann. Med. Interne.* - 1999. - Vol. 150. - №2. - P. 143-150.
60. Crescent formation in children with Henoch-Schonlein purpura nephritis: a pathological and immunohistochemical study / K. Kinoue, M. Hattori, S. Horita [et al.] // *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* - 1996. - Vol. 38. - №8. - P. 364371.

61. Crescentic glomerulonephritis and cerebral vasculitis in the course of Henoch-Schonlein purpura / Z. Korzets, E. Magen, J. Tetro [et al.] // Harefuah. - 2002. - Vol. 141. - №11. - P. 960-963, 1010.
62. Cross, A.R. Enzymic mechanisms of superoxide production / A.R. Cross, O.T.J. Jones // Biochem. Biophys. Acta. - 1991. - Vol. 1057. - P. 281-298.
63. Cytometric analysis of lymphocyte phenotype in cord and newborn blood / M. Banasik, K. Zeman, A.K. Malinows [et al.] // Pol. Merkuriusz. Lek. - 1997. - Vol. 3.-№17.-P. 236-240.
64. Davin, J.C. Diagnosis of Henoch-Schonlein purpura nephritis: an update / J.C. Davin, J.J. Weening // Eur. J. Pediatr. - 2001. - Vol. 160. - №12. - P. 689-695.
65. Davin, J.C. Diagnosis of Henoch-Schonlein purpura: renal or skin biopsy? / J.C. Davin, J.J. Weening // Pediatr. Nephrol. - 2003. - Vol. 18. - №12. - P. 1201-1203.
66. Drug-related Henoch-Schonlein Purpura / A. Escudero, E. Lucas, J.B. Vidal [et al.] // Allergol. Immunopathol. Madr. - 1996. - Vol. 24. - №1. - P. 22-24.
67. Early treatment with oral immunosuppressants in severe proteinuric purpura nephritis / H. Tanaka, K. Suzuki, T. Nakahata // Pediatr. Nephrol. - 2003. - Vol. 18.-№4.-P. 347-350.
68. Effect of vitamin E treatment on oxidative damage occurring in Henoch-Schonlein purpura / O. Erdogan, A. Oner, A. Audin [et al.] // Acta Paediatr. - 2003. - Vol. 92. - №5. - P. 546-550.
69. Effective therapy for severe Henoch-Schonlein purpura nephritis with prednisone and azathioprine: A clinical and histopathologic study [In Process Citation] / B.J. Foster, C. Bernard, K.N. Drummond, A.K. Sharma // J. Pediatr. - 2000. - Vol. 136. - №3. - P. 370-375.
70. Elevated levels of anti-Helicobacter pylori antibodies in Henoch-Schonlein purpura / J. Novak, Z. Szekanecz, J. Sebesi // Autoimmunity. - 2003. - Vol. 36.-№5.-P. 307-311.

71. Encephalopathy complicating Henoch-Schonlein purpura: reversible MRI changes / A.R. Woolfenden, J. Hukin, K.J. Poskitt, M.B. Connolly // *Pediatr. Neurol.* - 1998. - Vol. 19. - №1. - P. 74-77.
72. Erythrocyte antioxidant system in chronic hypoxaemia / G. Gerli, R. Moudiat, M.I. Sandri [et al.] // *Eur. J. Respir. Dis.* - 1986. - Vol. 69. (Suppl. 146). - P. 161-166.
73. Erythrocyte superoxide dismutase activity and plasma malondialdehyde levels in children with Henoch Schonlein purpura / G. Demircin, A. Oner, Y. Unver [et al.] / *Acta Paediatr.* - 1998. - Vol. 87. - №8. - P. 848-852.
74. Experimental study on microthrombi and myocardial injuries / Z.Y. Zhen, Y.C. Guo, Z.G. Zyang [et al.] // *Microvasc. Res.* - 1996. - Vol. 51. - №1. - P. 99-107.