

# Особенности лектин-зависимой агрегации тромбоцитов у больных со смешанной формой хронического гломерулонефрита

Е.В. Чеснокова<sup>1</sup>, А.П. Ребров<sup>1</sup>, В.Ф. Киричук<sup>2</sup>

Саратовский государственный медицинский университет,

<sup>1</sup> кафедра госпитальной терапии лечебного факультета,

<sup>2</sup> кафедра нормальной физиологии, г. Саратов

## Features of lectin-dependent thrombocyte's aggregation in patients with mixed form of chronic glomerulonephritis

E.V. Chesnokova, A.P. Rebrov, V.F. Kirichuk

*Ключевые слова: гломерулонефрит, тромбоциты, лектины, агрегация.*

Обследованы 32 больных со смешанной формой хронического гломерулонефрита в период высокой активности нефрита и при достижении ремиссии на фоне проводимой активной терапии. Все пациенты были разделены на две группы в зависимости от наличия хронической почечной недостаточности (ХПН): у 19 – функция почек была не нарушена, у 13 – диагностирована I стадия ХПН. Для выявления особенностей структуры рецепторного аппарата тромбоцитов определяли агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными лектинами, при различной активности нефрита. В период высокой активности нефрита независимо от функции почек установлено значительное снижение скорости, степени и времени агрегации тромбоцитов при добавлении конканавалина А (Con A), что может свидетельствовать об уменьшении содержания маннозоспецифических углеводных остатков. При достижении ремиссии у больных без ХПН выявлено значительное повышение степени и скорости агрегации тромбоцитов, что, по-видимому, обусловлено восстановлением количества маннозоспецифических углеводных остатков. Определение степени и скорости агрегации тромбоцитов, индуцированной Con A, может служить маркером активности хронического гломерулонефрита.

32 patients with mixed form of chronic glomerulonephritis were examined during periods of high activity of nephritis and periods of remission achieved by active therapy. All patients were divided into 2 groups according to renal function: kidney function of 13 patients wasn't compromised; 19 patients had I stage of CRF diagnosed. To reveal structure peculiarities of thrombocyte's receptor thrombocyte aggregation induced by various types of lectins at different stages of nephritis was determined. At periods of high activity of nephritis irrespective of kidney function, a significant reduction of speed, degree and time of thrombocyte aggregation was determined while adding Con A. This may testify low content of mannospecific carbohydrate residues. When patients without CRF were brought into remission, the increase in speed and degree of thrombocyte aggregation was revealed, which seemingly was caused by the restoration of quantity of mannospecific carbohydrate residues. Determination of speed and degree of thrombocyte aggregation induced by Con A can serve as activity marker of chronic glomerulonephritis.

Гломерулонефрит (ГН) является заболеванием, на долю которого приходится наибольший процент инвалидизации молодого населения. Проблема прогрессирования нефрита привлекает пристальное внимание, поскольку развитие почечной недостаточности и ее терминальной стадии является особой медицинской и социальной проблемой. В настоящее время все большее внимание уделяется патогенезу ГН, определению маркеров активности нефрита, которые позволили бы выявлять признаки активности процесса при отсутствии клинических симптомов, оценивать эффективность проводимой терапии, планировать ее

длительность, а также были бы более доступны, чем пункционная нефробиопсия. Среди различных аспектов изучения патогенеза ГН особое внимание уделяется механизму воспаления, так как еще Е.М. Тареев отмечал, что «воспаление – есть первый более общий вопрос патологии, имеющий и прикладное и диагностическое значение – определение активности воспалительной реакции в почке» [9].

Одной из центральных клеток воспалительной реакции является тромбоцит. Активация тромбоцитов – обязательное условие участия клеток в развитии воспалительного процесса. Выявлено наличие активированных тромбоцитов в кровотоке и в клубочках

**Адрес для переписки:** г. Саратов, ул. Б. Казачья, д. 2. Ребров Андрей Петрович

**Телефон:** (845-2) 51-49-60, факс (845-2) 51-49-60

**E-mail:** rebrov@sgu.ru

при различных типах ГН [6, 9]. Эти клетки содержат многие медиаторы воспаления, такие, как вазоактивные амины, простагландины, протеолитические ферменты, митогенный фактор, тромбоцитарный фактор роста и другие. Активация тромбоцитов в системном кровотоке происходит при прямом взаимодействии с иммунными комплексами (ИК) или под влиянием фактора активации тромбоцитов, который выделяется из базофилов, нейтрофилов, моноцитов после их активации ИК. В клубочках активация тромбоцитов происходит в результате прямого контакта тромбоцитов с коллагеном базальной мембраны клубочков (БМК), поврежденной иммунными механизмами [9]. При снижении выработки простагландина I<sub>2</sub>-клетками эндотелия повышается способность тромбоцитов к агрегации. Кроме того, ряд веществ (АДФ, ионы кальция, тромбоксан А<sub>2</sub>, гистамин, серотонин, катионные белки и другие), высвобождающихся из тромбоцитов в ходе их активации, способствует усилению агрегации самих тромбоцитов, а также повышает резистентность эфферентной артериолы клубочка, нейтрализует отрицательный заряд стенки капилляров клубочков, т. е. способствует прогрессированию ГН. В связи с этим агрегацию тромбоцитов можно рассматривать как маркер активности нефрита.

На мембране тромбоцитов имеются гликопротеиновые комплексы, которые выполняют функции рецепторов [8]. Безусловно, изменение функциональной активности клеток сопряжено с изменением структуры их рецепторов. Ключевая роль в агрегации принадлежит гликопротеиновым рецепторам (ГП) Пб/Ша [1, 12]. Тромбоциты имеют чрезвычайно большое количество ГП Пб/Ша (около 50 000), при этом в неактивных тромбоцитах рецепторы, связывающие адгезивные белки в процессе агрегации, скрыты. В активированном состоянии ГП Пб/Ша связывают фибриноген и другие лиганды, что вызывает агрегацию тромбоцитов [8].

В арсенале современных методов исследования важное место принадлежит иммуногистохимии с применением лектинов [11, 13]. Лектины представляют собой особый тип гистохимических реагентов, основным свойством которых является специфическое связывание с углеводными детерминантами тканевых и клеточных гликоконъюгатов без изменения химической структуры последних [3, 7, 10].

В литературе представлены результаты исследований, посвященных изучению роли тромбоцитов в патогенезе нефритов различного генеза [4, 6], однако среди них мало внимания уделяется углеводной специфичности рецепторов мембран тромбоцитов. В связи с этим представляет определенный интерес исследование структуры рецепторного аппарата тромбоцитов при активности процесса и на фоне терапии.

Цель работы – изучение особенностей лектин-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных со смешанной формой хронического гломерулонефрита в период обострения и ремиссии заболевания.

### Материалы и методы

Обследованы 32 больных со смешанной формой хронического гломерулонефрита, среди них 14 мужчин и 18 женщин, средний возраст которых составил 34,08 ± 8,06 года. Все пациенты были разделены на две группы: у

19 – функция почек была не нарушена, у 13 – диагностирована I стадия ХПН. В свою очередь, в каждой группе в соответствии с клинико-лабораторными показателями были выделены пациенты с активным нефритом (13 больных в первой и 11 больных во второй группе) и пациенты с клинико-лабораторной ремиссией заболевания (6 больных первой группы). Ремиссия у больных со смешанной формой хронического гломерулонефрита и ХПН была достигнута только у двух пациентов, поэтому в работе эта группа больных не рассматривается.

Критерием включения больных в исследование было наличие хронического активного ГН. У обследованных пациентов выявлены признаки активности ГН: протеинурия (6,6 ± 3,3 г/л), гипопропротеинемия (52,9 ± 5,2 г/л), гипоальбуминемия (26,6 ± 5,3 г/л), гиперхолестеринемия (7,3 ± 1,6 ммоль/л), отеки разной степени выраженности, стойкая систоло-диастолическая гипертензия. Критериями достижения ремиссии служили протеинурия менее 0,3 г/л, нормализация или приближение к нормальным значениям показателей общего белка, альбуминов, холестерина сыворотки крови, исчезновение отеков, стабилизация артериального давления на цифрах 120–130/80–90 мм рт. ст. В исследование не включали больных старше 45 лет с тяжелой сопутствующей патологией (ишемическая болезнь сердца, бронхиальная астма и др.), имеющих в момент исследования обострение хронических воспалительных процессов (холецистит, пиелонефрит и др.), а также больных с ХПН более чем I стадии. Всем больным проводили полное клиническое обследование, биохимическое исследование крови (мочевина, креатинин, общий белок, альбумины, холестерин, фибриноген, циркулирующие иммунные комплексы, С-реактивный белок), суточную протеинурию, пробу Реберга, УЗИ почек.

В качестве контроля обследовали 40 практически здоровых добровольцев, средний возраст которых составил 30,2 ± 1,5 года. Все пациенты и здоровые добровольцы давали письменное согласие на участие в исследовании.

Обследование больных проводили в первые сутки поступления в стационар до лечения и при достижении ремиссии. Продолжительность наблюдения за больными составила от 6 до 12 месяцев. Все пациенты получали традиционную терапию (глюкокортикостероиды перорально и в виде пульс-терапии, циклофосфан или эндоксан в/в, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ), гастропротекторы). Пациенты, у которых была достигнута стадия клинико-лабораторной ремиссии, постоянно принимали преднизолон 20 мг/сут по альтернирующей схеме (у части пациентов системные глюкокортикостероиды были полностью отменены), гастропротекторы, иАПФ.

Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) для исследования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов получали из крови, используя в качестве антикоагулянта 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Кровь центрифугировали при 200 г в течение 7 минут при комнатной температуре, отбирали ОТП, а оставшуюся кровь центрифугировали 15 минут при 1500 г для получения свободной от тромбоцитов плазмы. Эту плазму использовали для разведения ОТП до стандартной концентрации тромбоцитов – 2,5 ×

Таблица 1

## Показатели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных хроническим гломерулонефритом (М ± m)

Показатель	ГН, ХПН 0 (n = 19)		ГН, ХПН I (n = 11)	Конт- роль (n = 40)
	Обостре- ние (n = 13)	Ремиссия (n = 6)	Обостре- ние (n = 11)	
Максимальная степень агрегации, %	38,8 ± 5,8 <sup>а</sup>	26,3 ± 1,6*	26,2 ± 2,2	24,3 ± 1,4
Время достижения максимальной степени агрегации, с	291,6 ± 7,68 <sup>с</sup>	100,1 ± 4,2*** <sup>в</sup>	91,3 ± 3,4	85,9 ± 2,1
Максимальная скорость агрегации, усл. ед.	26,92 ± 3,4 <sup>в</sup>	13,9 ± 1,8***	17,2 ± 6,2	14,3 ± 1,3
Время достижения максимальной скорости агрегации, с	54 ± 4,5	62,3 ± 1,9 <sup>с</sup>	54,6 ± 4,8	52,6 ± 1,7

Примечание. Достоверность различий до и после лечения: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Достоверность различий между группами больных и здоровых лиц: <sup>а</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>в</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>с</sup>  $p < 0,001$ .

Таблица 2

## Показатели агрегации тромбоцитов, индуцированной РНА-Р у больных хроническим гломерулонефритом (М ± m)

Показатель	ГН, ХПН 0 (n = 19)		ГН, ХПН I (n = 11)	Конт- роль (n = 40)
	Обостре- ние (n = 13)	Ремиссия (n = 6)	Обостре- ние (n = 11)	
Максимальная степень агрегации, %	42,7 ± 3,9 <sup>в</sup>	42,4 ± 3,2 <sup>с</sup>	33,8 ± 5,1	31,4 ± 1,6
Время достижения максимальной степени агрегации, с	293,7 ± 4,0	290 ± 4,2	283,7 ± 5,7	270 ± 18,2
Максимальная скорость агрегации, усл. ед.	27,3 ± 3,0 <sup>в</sup>	29,4 ± 2,6 <sup>с</sup>	24,4 ± 3,5	18,34 ± 1,1
Время достижения максимальной скорости агрегации, с	65,7 ± 7,6	57,2 ± 4,2	62 ± 5,2	59,3 ± 3,8

Примечание. Достоверность различий между группами больных и здоровых лиц: <sup>в</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>с</sup>  $p < 0,001$ .

10<sup>8</sup>/мл (Габбасов З.А. и др., 1989). Суспензию отмытых тромбоцитов получали по методу Н. Patscheke (1981) [14]. Кровь собирали в кислую цитрат-декстрозу (65 мМ лимонной кислоты, 85 мМ цитрата натрия, 2% D-глюкозы; соотношение кровь–антикоагулянт 6:1) и центрифугировали 10 минут при 180 g. Тромбоциты трижды отмывали от плазмы раствором Тироде-цитрат (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,36 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% глюкоза, 30 мМ цитрата натрия, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 6,5), а затем суспендировали в растворе Тироде-HEPES (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,36 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% глюкоза, 0,1% БСА, 5 мМ HEPES, pH 7,35).

Агрегацию тромбоцитов определяли по изменению светорассеяния с помощью лазерного анализатора агрегации BIOLA (BIOLA Ltd, Россия) [2]. В качестве индуктора агрегации в ОТП использовали АДФ в конечной концентрации 2,5 мкМ. В суспензии отмытых тромбоцитов в качестве индукторов агрегации использовали фитогемагглютинин-Р (РНА-Р), лектин зародыша пшеницы (WGA), конканавалин А (Con A) в конечной концентрации 32 мкг/мл. Агрегацию изучали в суспензии отмытых тромбоцитов в концентрации 4 × 10<sup>8</sup>/мл при 37 °С при перемешивании со скоростью 800 об/мин.

Статистическую обработку полученного материала проводили с помощью программы Microsoft Excel 2002. Рассчитывали среднюю величину (М) для каждого значения и ошибку соответствующей средней величины (m). Достоверность значений определяли по t-критерию Стьюдента, значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В процессе лечения у 6 пациентов наблюдалось снижение активности нефрита: исчезали отеки, стабилизировался уровень артериального давления на цифрах 120–130/80–90 мм рт. ст., снижался уровень протеинурии, нормализовались острофазовые показатели, уровень общего белка, альбуминов, холестерина крови.

Показатели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных с активным ГН при развитии ремиссии и у лиц контрольной группы представлены в табл. 1. У больных ГН с сохраненной функцией почек в период обострения заболевания максимальная степень ( $p < 0,05$ ), время ( $p < 0,001$ ) и скорость агрегации ( $p < 0,01$ ) тромбоцитов были достоверно выше по сравнению с этими же показателями в группе контроля. На фоне проводимой терапии при достижении ремиссии происходило существенное снижение степени ( $p < 0,05$ ), времени и скорости ( $p < 0,001$ ) агрегации тромбоцитов.

Не выявлено значимых различий показателей агрегации, индуцированной АДФ, в группе больных с ХПН и у лиц группы контроля.

В табл. 2 представлены данные РНА-Р-индуцированной агрегации тромбоцитов в обеих группах. У больных с активным ГН с сохраненной функцией почек РНА-Р сильнее увеличивал степень и скорость ( $p < 0,01$ ) агрегации тромбоцитов, чем в группе контроля. В группе больных ГН без ХПН степень, скорость и время агрегации тромбоцитов при активности процесса и в фазе ремиссии практически не различались, т. е. у пациентов с сохраненной функцией почек степень и скорость агрегации остаются повышенными даже после

снижения активности нефрита. В связи с тем, что агрегация тромбоцитов, индуцированная РНА-Р, у больных была выше, можно предположить изменение характера гликозилирования рецепторов тромбоцитов в группе больных ГН без ХПН, так как РНА-Р взаимодействует с очень многими гликопротеинами [10]. У больных с

ХПН исследуемые показатели агрегации существенно не отличались от таковых у лиц группы контроля, что может свидетельствовать об отсутствии изменений качественного состава рецепторов тромбоцитов.

Для изучения характера изменения гликозилирования мембран тромбоцитов исследовали эффекты лектинов растительного происхождения, взаимодей-

ствующих с конкретными углеводными остатками.

Показатели WGA-индуцированной агрегации тромбоцитов представлены в табл. 3. Отличия степени, скорости и времени агрегации тромбоцитов у больных исследуемых групп по сравнению с показателями лиц контрольной группы оказались статистически недостоверными ( $p > 0,05$ ). При этом степень, скорость, время агрегации тромбоцитов не зависят от активности нефрита, т. е. эти показатели до и после лечения оставались в пределах нормы.

Наиболее вероятно, что WGA одинаково связывается с рецепторами поверхности тромбоцитов как у больных хроническим гломерулонефритом в стадии обострения или ремиссии, так и у здоровых лиц. Учитывая специфическое связывание WGA с N-ацетил-D-глюкозаминном и N-ацетил-нейраминовой (сиаловой) кислотой [10], можно предположить отсутствие изменений этих углеводных остатков на мембране тромбоцита у больных с ГН.

В табл. 4 представлены данные о индуцированной Con A агрегации тромбоцитов. У больных ГН отмечено снижение степени и скорости ( $p < 0,001$ ) агрегации тромбоцитов в период обострения заболевания независимо от функции почек у всех обследованных больных. Однако на фоне лечения выявлено повышение степени ( $p < 0,01$ ) и нормализация скорости агрегации тромбоцитов ( $p < 0,01$ ) по сравнению с исходными показателями в группе пациентов без ХПН. Учитывая, что Con A связывается с содержащими маннозу разветвленными N-гликанами [10], а ГП IIIa содержат в основном маннозные остатки, можно предположить значительное снижение содержания маннозоспецифичных углеводных остатков как на поверхности мембран тромбоцитов в целом, так и в составе ГП IIIa либо их блокирование какими-либо соединениями.

Обращает на себя внимание тот факт, что у пациентов с коротким анамнезом заболевания (до 6 мес.) и хорошим эффектом от проводимой терапии (в нашем исследовании таких больных было 6) степень и скорость агрегации тромбоцитов при индукции Con A повышаются значительно быстрее, чем у пациентов с длительным и часто рецидивирующим течением ГН. У единичных больных с непрерывно-рецидивирующим течением ГН показатели агрегации остаются исходно сниженными, несмотря на клинико-лабораторную ремиссию заболевания.

Показатели агрегации тромбоцитов у больных с ГН в период высокой активности нефрита, независимо от функции почек, не отличались при добавлении всех четырех индукторов агрегации.

### Заключение

Полученные результаты свидетельствуют об изменении структуры рецепторного аппарата тромбоцитов, в частности характера гликозилирования рецепторов мембран тромбоцитов у больных ГН. Установлено значительное снижение содержания маннозоспецифичных углеводных остатков в период высокой активности нефрита независимо от функции почек. Об этом свидетельствует снижение скорости, степени и времени агрегации тромбоцитов при добавлении Con A. Количество маннозоспецифичных углеводных

Таблица 3

#### Показатели агрегации тромбоцитов, индуцированной WGA, у больных хроническим гломерулонефритом ( $M \pm m$ )

Показатель	ГН, ХПН 0 (n = 19)		ГН, ХПН I (n = 11)	Контр- роль (n = 40)
	Об обостре- ние (n = 13)	Ремиссия (n = 6)	Об обостре- ние (n = 11)	
Максимальная степень агрегации, %	17,4 ± 8,6	13,2 ± 4,2	13,8 ± 4,2	12,1 ± 1,7
Время достижения максимальной степени агрегации, с	294,7 ± 4,2	294 ± 5,1	290 ± 5,6	282 ± 10,1
Максимальная скорость агрегации, усл. ед.	9,2 ± 2,9	10,8 ± 1,7	10,4 ± 1,7	11,6 ± 0,9
Время достижения максимальной скорости агрегации, с	54,5 ± 9,8	46 ± 2,8	43,3 ± 1,6	45 ± 3,2

Примечание. Достоверно значимых различий не было.

Таблица 4

#### Показатели агрегации тромбоцитов, индуцированной Con A, у больных хроническим гломерулонефритом ( $M \pm m$ )

Показатель	ГН, ХПН 0 (n = 19)		ГН, ХПН I (n = 11)	Контр- роль (n = 40)
	Об обостре- ние (n = 13)	Ремиссия (n = 6)	Об обостре- ние (n = 9)	
Максимальная степень агрегации, %	0,7 ± 0,3 <sup>c</sup>	4,1 ± 1,06 <sup>c**</sup>	0,4 ± 0,09 <sup>c</sup>	9,1 ± 0,07
Время достижения максимальной степени агрегации, с	42,5 ± 10,4	44,3 ± 5,4	32,8 ± 1,4	50,2 ± 9,8
Максимальная скорость агрегации, усл. ед.	0,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	2,9 ± 0,6 <sup>c**</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	2,44 ± 0,07
Время достижения максимальной скорости агрегации, с	30,5 ± 2,4 <sup>A</sup>	28,8 ± 2,4 <sup>A</sup>	28,6 ± 4,0 <sup>A</sup>	91,8 ± 26,64

Примечание. Достоверность различий до и после лечения: \*\*  $p < 0,01$ .

Достоверность различий между группами больных и здоровых лиц: <sup>A</sup> -  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> -  $p < 0,001$ .