

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРФЕРОНА- α НА АГРЕГАЦИЮ И СИСТЕМУ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ

А. В. Ягода, П. В. Корой¹

Агрегация тромбоцитов и содержание в них циклических нуклеотидов (ЦН) изучены у 44 больных хроническим вирусным гепатитом (ХВГ), вирусным циррозом печени (ЦП) и у 10 здоровых добровольцев до и через 6 ч после введения интерферона- α . У больных определено повышение содержания ЦН и снижение агрегации тромбоцитов (АТ) с полярными значениями при циррозе печени. При увеличении активности ХВГ и тяжести ЦП уровень ЦН в тромбоцитах возрастал, а их функциональная активность снижалась. После первого введения интерферона- α количество ЦН в тромбоцитах уменьшалось у больных ЦП, ХВГ с низкой АТ и возрастало при хроническом гепатите с исходно повышенной АТ. Выявлено нормализующее влияние интерферона- α на активность тромбоцитов у больных ХВГ и ЦП.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, циклические нуклеотиды, хронические вирусные заболевания печени, интерферон- α

ВВЕДЕНИЕ

В патогенезе хронических вирусных заболеваний печени важное значение придается изменениям в системе тромбоцитарно-сосудистого гемостаза [1]. Тромбоцитопения с преобладанием малых размеров клеток, обусловленная деструкцией тромбоцитов в селезенке и неадекватной продукцией тромбопоэтина, обнаруживается у 74 % больных циррозом печени (ЦП) [15, 17]. Ослабление адгезивно-агрегационных и угнетение ретрактивных свойств тромбоцитов у пациентов с хроническим вирусным гепатитом (ХВГ) могли быть обусловлены репликацией HBV в клетках костномозгового микроокружения или их присутствием в периферических тромбоцитах [5].

Есть основания полагать, что причинами дисфункции тромбоцитов являются приобретенные дефекты воспринимающих и трансформирующих сигналы механизмов. В качестве одного из них рассматривается система внутриклеточных посредников — циклических нуклеотидов (ЦН).

Функционирование тромбоцитов определяется соотношением в них уровней Ca^{2+} и цАМФ, которые являются вторичными мессенджерами при передаче сигнала от мембранных к внутриклеточным структурам, участвующим в процессах агрегации и дезагрегации [2]. Повышение уровня цАМФ в тромбоцитах вызывает переход Ca^{2+} из цитоплазмы в депо, ингибирование Ca^{2+} -зависимых ферментативных реакций и снижение

клеточной активности [16]. цГМФ, как полагают, выступает в качестве антагониста цАМФ [12, 14], либо агрегация тромбоцитов (АТ) активирует систему цГМФ, регуляторное действие которой осуществляется по принципу “отрицательной обратной связи” [8]. Подавляя высвобождение арахидоновой кислоты, цГМФ предупреждает образование тромбоксанов А₂ и В₂, стимулирующих накопление Ca^{2+} и активацию тромбоцитов [4, 13]. Сведения о состоянии системы ЦН тромбоцитов и их роли в регуляции агрегационной функции при заболеваниях печени практически отсутствуют.

Открытым остается вопрос о влиянии на состояние тромбоцитарных функций интерферонов (ИФН) как основных средств терапии хронических вирусных заболеваний печени. Интерфероны вызывали уменьшение уровня цАМФ в клетках-мишенях (полиморфноядерных лейкоцитах, мононуклеарах) больных ХВГ и определяли резистентность систем внутриклеточной трансмиссии в случаях цирроза печени [6, 7]. Публикации, посвященные влиянию ИФН на кровяные пластинки, ограничиваются констатацией факта тромбоцитопении, обусловленной угнетением пролиферации и дифференцировки мегакариоцитов [18, 19], образованием в процессе лечения цитотоксических антител [11], изменением экспрессии мРНК тромбопоэтина и секреции ростового фактора [18, 20].

Цель исследования состояла в изучении у больных ХВГ и ЦП агрегационной функции тромбоцитов в совокупности с системой ЦН и определении особенностей влияния на эти процессы интерферона- α .

¹ Кафедра внутренних болезней № 1 (зав. — проф. А. В. Ягода) Ставропольской государственной медицинской академии, Ставрополь, 355017, ул. Мира, 310.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 44 больных хроническими вирусными заболеваниями печени (30 мужчин, 14 женщин) в возрасте 20 – 59 лет. Больных ХВГ В было 8, ХВГ С — 20 и ЦП — 16. 10 больных ЦП были отнесены к классу А, 6 — к классам В и С по Child-Pugh. Диагноз устанавливали на основании клинического, биохимического, вирусологического (включая ПЦР-анализ) и морфологического обследования больных. Контролем служили 10 здоровых добровольцев в возрасте 21 – 30 лет.

Венозную кровь брали утром, натощак, стабилизировали цитратом натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали для получения богатой тромбоцитами плазмы. АТ регистрировали на приборе “АТ 2110” фирмы SOLAR (Беларусь), в качестве индукторов использовали адреналин и коллаген в конечных концентрациях 5 мкМ/мл и 0,2 мкг/мл соответственно. Анализировали степень максимальной агрегации.

Для определения ЦН тромбоциты трижды отмывали от плазмы раствором Тирод-цитрат (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,36 мМ NaH₂PO₄, 0,1 % глюкоза, 30 мМ цитрата натрия, 1 мМ MgCl₂), суспендировали в растворе Тирод-Нерес (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,36 мМ NaH₂PO₄, 0,1 % глюкоза, 5 мМ Нерес, 2 мМ CaCl₂). Клетки стандартизировали, инкубировали в течение 15 мин при 37°C, выделяли ЦН путем разрушения тромбоцитов и определяли содержание цАМФ и цГМФ методом иммуноферментного анализа с помощью наборов фирмы “Биоиммуноген” (Россия). Производили перерасчет в пикомолях цАМФ или цГМФ на 2 · 10⁸ клеток (пМ/2 · 10⁸ кл.). Исследование АТ и показателей ЦН проводили до и через 6 ч после первой внутримышечной инъекции 3 млн ЕД препарата ИФН-α — реаферона (Россия) на “пике” его функциональной активности.

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Агрегационная способность тромбоцитов у больных ХВГ и ЦП характеризовалась снижением максимальной агрегации с наличием наиболее низких показателей в случаях цирроза печени. Содержание обоих

ЦН в тромбоцитах больных, наоборот, было повышено с предельно высокими значениями в группе пациентов с циррозом. При ЦП количество цАМФ и цГМФ в тромбоцитах было выше, а АТ — ниже, чем у больных ХВГ (табл. 1). Параметры агрегации и уровни цАМФ и цГМФ в тромбоцитах не различались в группах ХВГ В и ХВГ С.

У пациентов с ХВГ содержание ЦН в тромбоцитах возрастало, а функциональная их активность (максимальная степень агрегации, индуцированная адреналином и коллагеном) снижалась с увеличением активности процесса. Случаи ЦП сравнительно тяжелого течения (классы В и С по градации Child-Pugh) сопровождалась сравнительно более высоким, чем у больных циррозом класса А, количеством внутриклеточных цАМФ и цГМФ и низкими показателями АТ.

В случаях ХВГ с исходно сниженной максимальной АТ (табл. 2, числитель), наблюдались наиболее высокие, многократно превышающие норму показатели цАМФ и цГМФ. В группе больных ХВГ с нормальной АТ уровень обоих ЦН был аналогичен таковому в контроле, а у пациентов с повышенной АТ определялось минимальное содержание цАМФ и цГМФ в тромбоцитах.

После первой инъекции ИФН (табл. 2, знаменатель) АТ у здоровых (в случае адреналиновой и коллагеновой агрегации) практически не изменилась, а у пациентов с ЦП достоверно возросла. Количество ЦН на высоте действия интерферона статистически значимо уменьшилось в контроле и у больных ЦП (цАМФ на 51 и 40 % и цГМФ на 70 и 60 %, соответственно). При хроническом вирусном гепатите характер ответа АТ и ЦН на введение интерферона определялся исходным состоянием клеточной агрегации. Так, у пациентов с исходно низкой АТ уровень ее через 6 ч после первого внутримышечного введения ИФН возрастал, достигая значений нормы. В этой же группе больных наблюдались наиболее высокие исходные показатели цАМФ и цГМФ, которые под влиянием ИФН снижались (достоверно только в отношении цГМФ). У пациентов с нормальной агрегационной способностью тромбоцитов (и нормальным уровнем ЦН) ИФН не изменял эти показатели. В группе больных с изначально повышенной АТ через 6 ч после инъекции произошло ее умень-

Таблица 1. Агрегация и циклические нуклеотиды тромбоцитов при хронических вирусных заболеваниях печени ($\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$)

Показатель	Группы обследованных		
	здоровые (n = 10)	больные	
		ХВГ (n = 28)	ЦП (n = 16)
Максимальная агрегация, % (адреналин)	68,7 ± 3,33	46,85 ± 3,65***	33,9 ± 4,42***(*)
Максимальная агрегация, % (коллаген)	69,84 ± 3,61	49,03 ± 4,31***	36,3 ± 4,17***(*)
цАМФ (пМ/2 · 10 ⁸ кл.)	75,49 ± 11,10	122,21 ± 12,79**	175,11 ± 14,02***(*)
цГМФ (пМ/2 · 10 ⁸ кл.)	9,73 ± 2,21	19,67 ± 2,54**	45,77 ± 9,03***(*)

Примечание. Различия статистически значимы: * — $p < 0,05$ между группами больных ХВГ и ЦП, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ по сравнению со здоровыми.

шение (нормализация). При этом сниженные до введения ИФН- α количества цАМФ в тромбоцитах нормализовались, а цГМФ — превысили соответствующие значения у здоровых. Не выявлено различий во влиянии ИФН на параметры агрегации и уровень ЦН в тромбоцитах у больных ХВГ В и ХВГ С.

Таким образом, при хронических вирусных заболеваниях печени имеется снижение агрегационной способности тромбоцитов, максимально выраженное у пациентов с ЦП, особенно тяжелым и прогностически менее благоприятным, а также в случаях ХВГ высокой активности. Одним из механизмов вирус-индуцированной дисфункции кровяных пластинок могут выступать нарушения в системе внутриклеточных посредников в виде повышения содержания цАМФ и цГМФ в тромбоцитах. Это, в свою очередь, способно вызвать снижение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и ингибирование ферментативных реакций, запускающих процесс активации тромбоцитов [10]. Иллюстрацией служит тот факт, что наиболее высокие показатели ЦН наблюдаются у больных ЦП с отчетливо выраженной декомпенсацией, у которых максимально проявляется дефект функционирования кровяных пластинок.

Эффект снижения количества цАМФ и цГМФ в тромбоцитах здоровых людей после введения ИФН- α характеризует один из механизмов проагрегационного влияния — через ферментные системы регуляции внутриклеточного уровня ЦН. При этом компоненты регуляторного цикла АТ у здоровых отличаются значительным “запасом устойчивости”, что обуславливает сохранение нормальных показателей агрегации на “пике” действия ИФН- α .

Введение ИФН- α больным ХВГ с исходно сниженной АТ и больным ЦП (с аналогичными показателями агрегации) вызывало идентичную реакцию в виде снижения содержания цАМФ и цГМФ (при сохранении их повышенного уровня) и существенного роста (нормализации) АТ. У больных ХВГ с высокой АТ (и, соответственно, исходно низкими значениями цАМФ и

цГМФ) интерферон приводил к парадоксальному увеличению ЦН в тромбоцитах либо за счет активации цикла, либо ингибирования фосфодиэстераз. Результатом этого феномена явилось снижение максимальной АТ, стимулированной адреналином и коллагеном. Тромбоциты больных ХВГ с нормальной агрегационной способностью практически не отреагировали на ИФН- α динамикой ЦН и АТ. Характер ответов ЦН на ИФН- α в двух последних группах больных ХВГ в полной мере соответствует представлениям о вирус-индуцированных дефектах чувствительности ферментных систем регуляции цАМФ и цГМФ клеток больных с патологией печени — в том числе к действию фармакологических препаратов [9].

Следует отметить, что у больных с вирусной патологией печени определяется поляризация показателей АТ, с одной стороны, и ЦН, с другой (повышение АТ — снижение ЦН, ингибирование агрегации — увеличение цАМФ и цГМФ), особенно выраженная при высокоактивном ХВГ и декомпенсированном ЦП. При действии ИФН- α на тромбоциты также выявлена однонаправленность динамики обоих ЦН, что практически не наблюдается в других клеточных популяциях, в частности, мононуклеарах и полиморфноядерных лейкоцитах [3, 6].

ВЫВОДЫ

1. У больных хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени установлено нарушение агрегационной способности тромбоцитов, одной из причин которого могут быть изменения содержания цАМФ и цГМФ.
2. Выявлены разнонаправленные сдвиги циклических нуклеотидов и агрегации тромбоцитов с отчетливой поляризацией показателей при нарастании активности хронического вирусного гепатита и функциональной декомпенсации печени.
3. Интерферон- α оказывает нормализующее влияние на активность тромбоцитов больных посредством

Таблица 2. Влияние интерферона- α на показатели цАМФ, цГМФ и агрегацию тромбоцитов ($\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$)

Показатель	Группы обследованных				
	здоровые	больные			ЦП (класс А)
		ХВГ			
		с высокой АТ	с нормальной АТ	с низкой АТ	
Максимальная агрегация, % (адреналин)	$68,7 \pm 3,33$	$83,51 \pm 4,31$	$62,44 \pm 1,99$	$30,12 \pm 5,46$	$36,29 \pm 5,22$
	$65,0 \pm 2,53$	$60,01 \pm 3,25^*$	$62,58 \pm 4,53$	$60,14 \pm 5,7^*$	$56,96 \pm 7,81^*$
Максимальная агрегация, % (коллаген)	$69,84 \pm 3,61$	$96,85 \pm 4,77$	$64,01 \pm 2,63$	$26,57 \pm 3,71$	$40,37 \pm 3,72$
	$67,01 \pm 2,33$	$64,9 \pm 5,6^*$	$61,62 \pm 5,63$	$68,27 \pm 9,4^*$	$56,02 \pm 5,87^*$
цАМФ (пМ/2 · 10 ⁸ кл.)	$75,49 \pm 11,1$	$22,98 \pm 11,32$	$77,31 \pm 10,12$	$311,67 \pm 15,01$	$166,13 \pm 10,53$
	$37,33 \pm 13,12^*$	$90,18 \pm 12,47^*$	$71,12 \pm 9,85$	$263,98 \pm 18,29$	$100,0 \pm 20,76^*$
цГМФ (пМ/2 · 10 ⁸ кл.)	$9,73 \pm 2,21$	$2,90 \pm 1,72$	$10,22 \pm 2,11$	$109,1 \pm 7,14$	$38,26 \pm 6,71$
	$2,91 \pm 2,12^*$	$20,83 \pm 3,44^*$	$9,71 \pm 1,46$	$50,85 \pm 9,45^*$	$15,32 \pm 6,98^*$

Примечание. В числителе — показатели до введения ИФН- α , в знаменателе — после введения; * $p < 0,05$ до и после введения ИФН- α .

модуляции внутриклеточного содержания циклических нуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Г. Митерев, П. М. Альперин, И. В. Кубанцева и др., *Клин. мед.*, № 5, 117 – 120 (1985).
2. К. О. Муранов, Н. Б. Полянский, А. А. Шведов и др., *Бюл. экспер. биол.*, № 7, 5 – 7 (1986).
3. Р. А. Реквава, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Ставрополь (1993).
4. И. С. Северина, *Биохимия*, № 3, 325 – 339, (1994).
5. Н. А. Серов, Э. В. Коновалова, П. Ю. Пинигина, *Рос. ж. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол.*, № 3, 85 – 86, (2000).
6. Т. Ю. Филимонова, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Ставрополь, (1998).
7. Ш. М. Хубиев, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Ставрополь, (2000).
8. Ю. Ю. Чирков, Н. Н. Белушкина, И. А. Тыщук, И. С. Северина, *Бюл. экспер. биол.*, № 2, 152 – 154 (1991).
9. А. В. Ягода, Р. А. Реквава, *Проблемы гастроэнтерологии*, 3 – 4 (5), 47 – 54 (1991).
10. J. C. Bandi, E. Poci, and J. C. Garsia-Padan, *J. Hepatol.*, 27 (5), 824 – 829 (1997).
11. P. Colombatto, F. Oliveri, G. Leandro, et al., *Ital. J. Gastroenterol.-Hepatol.*, 29 (5), 441 – 447 (1997).
12. T. Davies, M. Ml. Davidson, M. D. Mc Clenaghan, et al., *Thromb. Res.*, 9, 387 – 405 (1976).
13. R. Gerzer, B. Karrenbrock, W. Siess, and J. M. Heim, *Thromb. Res.*, 52, 11 – 21 (1988).
14. D. B. Glass, J. M. Gerrard, D. Townsend, et al., *J. Cyclic. Nucl. Res.*, 3, 37 – 44 (1977).
15. T. Ishikawa, T. Ichida, Y. Matura, et al., *J. Gastroenterol.-Hepatol.*, 13 (9), 907 – 913 (1998).
16. M. A. Packham, *Thromb. Haemostas.*, 50, 610 – 619 (1983).
17. M. Peck-Radosavljevic, J. Zacherl, Y. G. Meng, et al., *J. Hepatol.*, 27 (1), 127 – 131 (1997).
18. M. Peck-Radosavljevic, M. Wichlas, J. Pidlich, et al., *Hepatology*, 28 (5), 1424 – 1429 (1998).
19. M. Sata, Y. Yano, Y. Yoshiyama, et al., *J. Gastroenterol.*, 32 (2), 206 – 210 (1997).
20. F. Toccacili, S. Rosati, M. Scuderi, et al., *Hepato-Gastroenterology*, 45 (23), 1748 – 1752 (1998).

Поступила 18.07.01

EFFECT OF INTERFERON- α ON THE THROMBOCYTE AGGREGATION AND CYCLIC NUCLEOTIDE SYSTEM OF PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS

A. V. Yagoda and P. V. Koroï

Department of Internal Disorders, State Medical Academy, ul. Mira 310, Stavropol, 355017 Russia

Platelet aggregation (PA) and the content of cyclic nucleotides (CN) was studied in a group of 44 patients with chronic viral hepatitis (CVH) and liver cirrhosis (LC) in comparison to 10 healthy volunteers. The analyses were performed before and 6 h after interferon- α (IFN- α) administration. The CN content was increased in CVH cases and was maximum in LC patients, while the platelet aggregation was reduced in CVH patients and was minimum in the LC group. The CN level increased and the functional activity of platelets decreased, depending on the degree of disorder. After the first introduction of IFN- α , the CN content in thrombocytes decreased in LC and low-PA CVH patients, but increased in high-PA CVH cases. IFN- α produced a normalizing effect on the platelet functioning in the patients with CVH and LC.