

ХЕМОЛИТИЧНО-УРЕМИЧЕН СИНДРОМ – ПАТОГЕНЕЗА И ЛАБОРАТОРИЯ

Стоянка Танчева¹, Хилда Хабиб², Мария Петкова², Даниела Малчева³

¹Катедра по обща медицина и клинична лаборатория, Факултет „Медицина“,
Медицински университет – Варна

²Студент, УС „Клиничен лаборант“, Медицински колеж,
Медицински университет – Варна

³СМДЛ „Статус“ – Варна

HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME - PATHOGENESIS AND LABORATORY

Stoyanka Tancheva¹, Hilda Habib², Maria Petkova², Daniela Malcheva³

¹General Medicine and Clinical Laboratory, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna

²Student, TRS Medical Laboratory Assistant, Medical College, Medical University of Varna

³SMDL STATUS - Varna

РЕЗЮМЕ

Нашият интерес бе провокиран от пациент, който след чревно възпаление, придружено с остър диаричен синдром, рязко повишава нивата на урея, креатинин, пикочна киселина и калий в кръвта, индиректния билирубин и LDH. При автоматичния анализ на периферна кръвна картина (ПКК) се установи анемия с брой на тромбоцитите под $100 \times 10^9/L$, а морфологичният анализ на кръвна натривка, при оцветяване по Романовски-Гимза, показва наличие на шизоцитни форми от клетките на еритроцитния ред.

Материал и методи: Като материал използвахме пълна кръв, взета с антикоагулант ЕДТА, изследвана на автоматичен хематологичен брояч „Mindray“-BC-3000Plus и кръвна натривка, оцветена по Романовски-Гимза, както и кръв за биохимичен анализ, която изследвахме с биохимичен анализатор Roche-Cobas Integra 400Plus.

Резултати и обсъждане: Лабораторните резултати, говорещи за хемолитична анемия, тромбоцитопения и остра бъбречна недостатъчност (ARF), в съчетание с клиничната картина при пациента, ни насочиха към диагнозата хемолитичен уремичен (ХУС; HUS) синдром.

Изводи: При съчетание на посочените клиника и лабораторна находка винаги трябва да се мисли в диференциално-диагностичен план за

ABSTRACT

Introduction: Our interest was provoked by a patient who, after intestinal inflammation accompanied by acute diarrheal syndrome, had sharply elevated urea levels, creatinine, uric acid and potassium in the blood, indirect bilirubin and lactate dehydrogenase (LDH). Peripheral blood pacing (PKK) automated analysis revealed anemia with a platelet count of less than $100 \times 10^9 / L$ and a morphological analysis of blood smears on Romanowsky-Giemsa staining showed the presence of schizocytic forms of the cells of the erythrocyte line.

Materials and Methods: As a material, we used whole blood taken with an EDTA anticoagulant, tested on a Mindray-BC-3000Plus automatic hematological counter, and a blood smear stained by Romanowsky-Giemsa, as well as blood for biochemical analysis, which we studied with a biochemical analyzer Roche - Cobas Integra 400Plus.

Results and Discussion: Laboratory results of hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure (ARF), combined with the clinical picture of the patient, have led us to the diagnosis of hemolytic uremic syndrome (HUS).

Conclusion: When combined with the indicated clinic and laboratory findings, it is always necessary to think of a differential diagnostic plan for HUS. HUS

ХУС. HUS се характеризира с повтарящи се епизоди на остро заболяване, които водят до терминална бъбречна недостатъчност.

Ключови думи: хемолитичен-уремичен синдром, тромбоцитопения, клетки на Панет, остра бъбречна недостатъчност

УВОД

Хемолитично-уремичният синдром (HUS) е клиничен синдром, характеризиращ се с триада на: неимунна микроангиопатична хемолитична анемия, тромбоцитопения и остра бъбречна недостатъчност (ARF). Интересът ни към това заболяване бе провокиран от пациент, който след чревно възпаление, придружено с остър диаричен синдром, рязко повиши нивата на урея, креатинин, пикочна киселина и калий в кръвта, индиректния билирубин и LDH. При автоматичния анализ на периферна кръвна картина (ПКК) се установи анемия с брой на тромбоцитите под $100 \times 10^9/L$, а морфологичният анализ на кръвна натривка, при оцветяване по Романовски-Гимза, показва наличие на шизоцитни форми от клетките на еритроцитния ред. Нашата цел и задачи бе да изработим лабораторна констелация, която бързо и надеждно да насочва клинициста към диагностиката на този рядък, но много опасен синдром.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Като материал използвахме пълна кръв, взета с антикоагулант ЕДТА, изследвана на автоматичен хематологичен брояч „Mindray”-BC-3000Plus, и кръвна натривка, оцветена по Романовски-Гимза, както и кръв за биохимичен анализ, която изследвахме с биохимичен анализатор Roche-Cobas Integra 400Plus.

РЕЗУЛТАТИ

Лабораторните резултати, говорещи за хемолитична анемия, тромбоцитопения и остра бъбречна недостатъчност (ARF), в съчетание с клиничната картина при пациента ни насочиха към диагнозата хемолитичен уремичен (ХУС; HUS) синдром.

ОБСЪЖДАНЕ

Хемолитично-уремичният синдром се класифицира като постинфекциозен, медиран от комплемента, който може да бъде наследствен и/

или автоимунен, или свързан с други съществуващи предразположения, като бременност, инфекция с човешки имунодефицитен вирус (HIV), трансплантация (костен мозък или органи), злокачествени заболявания, автоимунни заболявания, лекарства, злокачествена хипертония, както и други по-необичайни заболявания, някои от които са наследствени.

Keywords: hemolytic uremic syndrome, thrombocytopenia, Paneth cells, acute renal failure

или автоимунен, или свързан с други съществуващи предразположения, като бременност, инфекция с човешки имунодефицитен вирус (HIV), трансплантация (костен мозък или органи), злокачествени заболявания, автоимунни заболявания, лекарства, злокачествена хипертония, както и други по-необичайни заболявания, някои от които са наследствени.

Хемолитично-уремичният синдром може да бъде разделен на два първични типа:

- типична форма, асоциирана с ентерохеморагична *Escherichia coli* (EHEC)-0157:H7 щам инфекция;
- причинен от други фактори: салмонела, хеликобактер, ерсиния, вирусни инфекции, някои лекарствени продукти като митомицин, циклоспорин, такролимус, пеницилини, пневмококова инфекция, тежки случаи на сепсис, менингит, хепатоцелуларни увреждания, перитонит.

Класическият хемолитично-уремичен синдром се характеризира с експозиция на организма на вероцитотоксини (наречени още „шига токсини“ – *Shiga toxin*), които се произвеждат от *Escherichia coli* щам – 0157:H7, и адхезин интимин. Макар че щам O157:H7 се счита за клинично най-важен, е установено, че до 50% от инфекциите не принадлежат към този серологичен тип.

Почти всички случаи се предхождат от наличие на диария и/или чревно възпаление.

Процесът на заболяването се инициира и поддържа от взаимодействията между патогена или неговите фактори на вирулентност и клетките гостоприемници, както и реакцията на гостоприемника като цяло.

По време на EHEC свързаните HUS, промени, настъпващи в чревната бариера на лигавицата и в кръвообращението, както и върху ендотелните и други клетки от органите мишени, водят до клетъчно активиране и/или цитотоксичност и предизвикват протромботично състояние (хиперкоагулабилно състояние, известно още като тромбофилия, манифестиращо се клинично

с тромбоемболизъм, в резултат на възникнали аномалии в коагулационната система).

Щамовете, произвеждащи *Shiga toxin*, попадат в червата след поглъщане. Бактериите първоначално колонизират терминалния илеум, последвано от специфично свързване с ентероцити на дебелото черво, генерирайки прикрепяне и елиминиращо увреждане.

Колонизацията се улеснява от взаимодействието със сапрофитната чревна микрофлора, което позволява бактериално взаимодействие между щамовете чрез генетично кодирани медиатори (9). Същият механизъм позволява комуникация с хормон, произведен на катехоламините, като по този начин се повишава адхезията и вирулентността на ЕНЕС и освобождаването на шига-токсин в червата (14). Няма бактериемия по време на *Escherichia coli* инфекция, тъй като щамът е неинвазивен. Така токсинът, отделен в червата, трябва да се транслоцира чрез ентероцити или между клетките, за да получи достъп до циркулацията и по този начин да достигне целевите си органи (главно бъбреците и мозъка). Чревната колонизация от *Escherichia coli* генерира антияло-отговор. Пациентите развиват антитела към специфичния за серотипа липополизахарид – шига токсин (LPS) и чревни адхезини.

Начинът, по който токсинът се поема от червата *in vivo*, включва свързване на пентамерната В субединица на токсина с неговия рецептор, глоботриазозилцерамид (Gb3 или CD77), върху чревни епителни клетки или клетки на Панет (Paneth cells, ацидофилни ентероцити, които създават неблагоприятна за бактериите среда) и поглъщането му чрез макропиноцитоза или формирането на бактериални везикули на външната мембрана на клетката (10). Вътреклетъчно токсинът *Shiga* индуцира клетъчна смърт чрез свързване на неговата ензимно активна А субединица към рибозомална РНК и инхибиране на протеиновата синтеза на клетката.

Токсинът индуцира апоптоза на чревните клетки и по този механизъм задълбочава чревното възпаление (7), което може допълнително да стимулира бактериалното колонизиране и освобождаването на токсини (9). Левкоцитите, образуващи левкоцитен вал в зоната на възпалението, фагират патогенните бактерии или отделените от тях свободни токсини.

Активирани, част от тези левкоцити се връщат в кръвта, като носят в себе си *Shiga toxin*. Така шига-токсинът, преодолява чревната мукозна бариера и получава достъп до циркулацията.

Свободен токсин в кръвния поток се открива в минимални количества, но токсинът, интегриран в неутрофили, моноцити, тромбоцити и червени кръвни клетки (11), циркулира в кръвния поток. Повишеният брой на неутрофилите е свързан с по-лоша прогноза, вероятно поради повишената способност за прехвърляне на токсин, както и разрушителните свойства, свързани с протеази, освободени от активирани неутрофили. Шига токсинът, свързан с левкоцитите, може да бъде погълнат и от други клетки в кръвта. Повечето кръвни клетки са резистентни към цитотоксичните ефекти на Шига-токсина. Клетки, които нямат синтез на протеини, като тромбоцити и червени кръвни клетки, не биха били повлияни отрицателно от токсина, но дори левкоцитите изглеждат устойчиви на цитотоксичните ефекти. Всички клетки се активират от токсина и го разнасят в кръвта. Токсинът може да бъде освободен от кръвните клетки в микровезикули. Тези микровезикули, произхождащи от кръвните клетки на приемника и носещи съдържанието на родителската клетка, плюс шига-токсин, избягват имунния отговор на гостоприемника и се улавят едва от бъбречните гломерулни и перитубулни капилярни ендотелни клетки. В бъбречните клетки токсинът се освобождава и ензимно активната му субединица А се транспортира към рибозомалната РНК на клетката, като предизвиква клетъчната ѝ смърт. Доказано е, че микровезикулите, получени от тромбоцити, моноцити, неутрофили и червени кръвни клетки, са повишени в кръвни проби от пациенти с ЕНЕС-свързан HUS (1) и намаляват до нормални стойности след оздравяване. Микровезикулите притежават фосфатидилсерин и тъканен фактор, които стимулират тромбозата. Токсинът, освободен в кръвообращението или в микровезикулите, претърпява ендоцитоза в гломеруларните и перитубулни капилярни ендотелни клетки, като ги уврежда, предизвиквайки микроскопични съдови лезии. Комбинацията от активирани тромбоцити и увреден ендотел индуцира микротромбози. Червените кръвни клетки търпят механична хемолиза върху микротромбите, както и хемолиза, индуцирана от комплемента. Както е известно, комплементарното активиране на червените кръвни клетки индуцира тяхната хемолиза, а върху мембраната на активираните циркулиращи червени кръвни клетки интернализирали микровезикули се откриват С3 и С9 фракции на комплемента. Деструкцията на червени кръвни клетки, настъпваща по време на HUS, свързан с ЕНЕС, потвърждава, че присъствието на

Shiga toxin-a допринася за хемолитичния процес. Микровезикулите прехвърлят токсините между клетките, както и през съдовата базална мембрана към тубуларния епител, като по този начин засягат целия нефрон. Неинхибираното активиране на комплемента върху ендотелиума в комбинация с активираните тромбоцити на гостоприемника индуцират клетъчно увреждане и протромботично състояние с фрагментация на червените кръвни клетки. Фрагментацията на червените кръвни клетки е основна характеристика на хемолитичния процес при HUS. В кръвни натривки на болни с HUS се наблюдават шистоцити. Фрагментацията се дължи на механично разграждане на червените кръвни клетки в капиллярите, частично запушени от микротромби (15), както и на окислителното им увреждане, доказано с промени, открити в метаболизма на глутатиона.

Ниският брой на тромбоцитите в HUS е резултат на отлагане на агрегати в микротромби по увредената микросъдова стена. Активирането на тромбоцитите се дължи на увреждане на ендотелиалните клетки и промени в субендотелното пространство, предизвикано от токсини, при което тромбоцитите взаимодействат с фибриноген, колаген и фактор на von Willebrand и така образуват агрегати (3). В допълнение, тромбоцитите се активират директно от Shiga-токсина (8) и от цитокини, освободени от активирани моноцити, левкоцити или ендотелни клетки (4). Тромбоцитите, получени от пациенти с HUS, са дегрануирани и с повишен отговор на агрегация. Shiga-токсинът активира тромбоцитите и едновременно води до освобождаване от тях на микровезикули, което стимулира бактериалната вирулентност. Тромбоцитите играят роля във възпалителния процес чрез взаимодействие и образуване на комплекси с левкоцити и чрез освобождаване на провъзпалителни цитокини (5). Те играят най-важна роля в образуването на микроангиопатични лезии по време на HUS. Тромботичните патологии, които се проявяват по време на свързания с ЕНЕС HUS, са вторични. При увреждане на ендотелните клетки, повишеното тромбоцитно активиране на субендотелиума, генерирането на тромбин, освобождаването на тъканни фактори, експресирани от тромбоцитно-левкоцитните комплекси, повишените нива на микровезикулите, освободени от моноцити и тромбоцити в кръвообращението, и намалената фибринолиза формират т.н. протромботично състояние. Тези

находки могат да бъдат възпроизведени *in vitro* чрез стимулиране на ендотелни клетки с шига-токсин (6) и изследване на цяла кръв.

Патогенетичните механизми, водещи до остра бъбречна недостатъчност по време на ЕНЕС-асоцииран HUS, са свързани с протромботично съдово увреждане, предизвикващо образуването на оклудиращи микротромби, засягащи гломерулни (ендотелни, подоцити и мезангиум) клетки, както и остра токсично-индуцирана тубулна некроза. В допълнение, има активиране и приток на неутрофили и на тромбоцити в микротромбите, съответстващи на тежестта на бъбречната недостатъчност (2). По този начин множество клетъчни типове могат да освобождават мощни възпалителни медиатори и ензими. Освен това, цитокините, хемокините, разтворимите адхезионни молекули, растежните фактори, цитокиновите рецептори и протеините с реактивен отговор, както и активността на комплементната система (11), са повишени в ЕНЕС-асоциирани пациенти с HUS (7), което може да индуцира хемотаксис и цитолиза и допълнително да допринесе за прогресията на бъбречното увреждане.

Бъбречната трансплантация е състояние на активиране на комплемента, което може да бъде предизвикано от исхемично реперфузионно увреждане, имунен инсулт и инфекциозни усложнения (16). При пациенти, които имат дефекти в регулацията на комплементарната активация, се образуват отлагания върху васкуларния ендотелиум на присадката и това предразполага към рецидив на заболяването в присадката и индуцира отхвърляне на трансплантата.

HUS се характеризира с повтарящи се епизоди на остро заболяване, които водят до терминална бъбречна недостатъчност. Заболяването може да се повтори и след трансплантацията.

Класическият хемолитично-уремичен синдром е водеща причина за острата бъбречна недостатъчност при новородени и малки деца.

Лечението на HUS с антибиотици е противопоказно, тъй като това може да активира освобождаването на шига-токсини, понеже при унищожаването на микроорганизмите се отделя голямо количество токсини и това води до клинично обостряне с потенциално влошаване на развитието на HUS. При лечението на инфекции, причинени от тези серотипове, се използва основно рехидратираща терапия на организма.

При HUS могат да се появят и извънбъбречни прояви, които са отчасти вторични за съдовото увреждане, предизвикано от активиране на ком-

плементата (12). Те включват дигитална гангрена, церебрална или периферна стеноза на съдовете, офталмологично и неврологично засягане, както и белодробни и панкреасни усложнения (13).

ИЗВОДИ

Диагнозата на хемолитично уремичния синдром е основно клинична, но трябва да бъде доказана чрез лабораторни тестове.

HUS се дефинира като едновременна поява на хемолиза, тромбоцитопения и остра бъбречна недостатъчност.

Лабораторните изследвания, необходими за поставяне на диагноза HUS, включват хематологични, биохимични и микробиологични анализи за откриване на хемолитична анемия, тромбоцитопения, бъбречна недостатъчност и ЕНЕС инфекция:

- ВПКК – често се установява тежкостепенна хемолитична анемия;
- Еритроцитната морфология показва микроангиопатична хемолитична анемия с шистоцити;
- Лактатдеhidрогеназата и ретикулоцитите са увеличени във връзка с наличната хемолитична анемия;
- Увеличават се нивата на индиректния билирубин;
- Тромбоцити – търсим наличие на тромбоцитопения;
- Плазмените урея, креатини и пикочната киселина са повишени;
- Серумните електролити показват хипонатремия, хиперкалемия и увеличение на фосфатите;
- В АКР има данни за метаболитна ацидоза;
- Анализ на урината: протеинурия, пиурия, хемоглобинурия и микроскопска хематурия (еритроцитурия);
- Анализ на изпражненията за наличие на E. coli щам O157:H7 – положителен само първата седмица след диарийния синдром;
- Директен антиглобулинов тест (тест на Coombs) – положителен;
- Хаптоглобулинов тест – за доказване на хемолиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arvidsson I, Ståhl AL, Hedström MM et al. Shiga toxin-induced complement-mediated hemolysis and release of complement-coated red blood cell-derived microvesicles in hemolytic uremic syndrome. *J Immunol* 2015; 194: 2309–18
2. Fernandez GC, Gomez SA, Ramos MV et al. The functional state of neutrophils correlates with the severity of renal dysfunction in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 2007; 61: 123–8.
3. Ghosh SA, Polanowska-Grabowska RK, Fujii J, Obrig T, Gear AR. Shiga toxin binds to activated platelets. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 499–506.
4. Guessous F, Marcinkiewicz M, Polanowska-Grabowska R et al. Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide induce human microvascular endothelial cells to release chemokines and factors that stimulate platelet function. *Infect Immun* 2005; 73: 8306–16.
5. Gear AR, Camerini D. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation* 2003; 10: 335–50
6. Grabowski EF, Kushak RI, Liu B, Ingelfinger JR. Shiga toxin downregulates tissue factor pathway inhibitor, modulating an increase in the expression of functional tissue factor on endothelium. *Thromb Res* 2013; 131: 521–8
7. Karpman D, Ståhl AL. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and the host response. *Microbiol Spectr* 2014; 2,
8. Kendall MM, Sperandio V. What a dinner party! Mechanisms and functions of interkingdom signaling in host-pathogen associations. *MBio* 2016; 7: e01748
9. Kunsmann L, Ruter C, Bauwens A et al. Virulence from vesicles: novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Sci Rep* 2015; 5: 13252
10. Locatelli M, Buelli S, Pezzotta A et al. Shiga toxin promotes podocyte injury in experimental hemolytic uremic syndrome via activation of the alternative pathway of complement. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 1786–98.
11. Magnus T, Rother J, Simova O et al. The neurological syndrome in adults during the 2011 northern German *E. coli* serotype O104:H4 outbreak. *Brain* 2012; 135: 1850–9

12. Malina M, Gulati A, Bagga A, Majid MA, Simkova E, Schaefer F. Peripheral gangrene in children with atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics* 2013; 131: e331–5
13. Pacheco AR, Sperandio V. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Curr Opin Microbiol* 2009; 12: 192–8
14. Ruggenti P, Noris M, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int* 2001; 60: 831–46.
15. Sacks SH, Chowdhury P, Zhou W: Role of the complement system in rejection. *Curr Opin Immunol* 15: 487–492, 2003; Platt JL, Saadi S: The role of complement in transplantation. *Mol Immunol* 36: 965–971, 1999
16. Ståhl AL, Arvidsson I, Johansson KE et al. A novel mechanism of bacterial toxin transfer within host blood cell-derived microvesicles. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1004619

Адрес за кореспонденция:

ас. д-р Стоянка Танчева Илиева, д.м.
Катедра „Обща медицина и клинична
лаборатория“
Медицински университет – Варна
ул. „Марин Дринов“ 55
Варна 9000
e-mail: tanq_tancheva@abv.bg