

## АКТИВАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИЗВИТОСТЬЮ БРАХИОЦЕФАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕЁ КОРРЕКЦИИ

*Е.Г. Ключева<sup>1</sup>, В.В. Голдобин<sup>1</sup>, С.М. Туаршева<sup>1</sup>, Т.В. Вавилова<sup>1</sup>, О.В. Сироткина<sup>1,2</sup>, А.Б. Ласковец<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина, Россия

## PLATELET ACTIVATION IN PATIENTS WITH BRACHIOCEPHALIC ARTERY TORTUOSITY AND ITS CORRECTION POSSIBILITIES

*E.G. Klocheva<sup>1</sup>, V.V. Goldobin<sup>1</sup>, S.M. Tuarsheva<sup>1</sup>, T.V. Vavilova<sup>1</sup>, O.V. Sirotkina<sup>1,2</sup>, A.B. Laskovets<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Petersburg Institute of nuclear physics named after B.P. Konstantinov, Gatchina, Russia

© Коллектив авторов, 2013

Представлены клинические данные и показатели тромбоцитарного гемостаза у больных с патологической извитостью магистральных артерий головы на ранних стадиях недостаточности мозгового кровообращения. Прием дипиридамола в течение месяца сопровождался изменением данных агрегометрии и проточной цитометрии. Наиболее чувствительными показателями были скорость агрегации тромбоцитов на индукцию 5 мкмоль аденозиндифосфата, степень агрегации на индукцию коллагеном, экспрессия тромбоцитами Р-селектина, стимулированная 10 мкмоль аденозиндифосфата. Резистентность к дипиридамолу была выявлена у 36% обследованных.

**Ключевые слова:** патологическая извитость магистральных артерий головы, тромбоциты, агрегация тромбоцитов, проточная цитометрия, Р-селектин, дипиридамола, резистентность к дипиридамолу.

Clinical data and platelet hemostasis parameters in patients with pathologic tortuosity of brachiocephalic arteries in early stages of brain blood circulation insufficiency. Dipyridamole intake in 1 month led to aggregometry and flow cytometry changes. The mostly sensitive parameters were the velocity of platelet aggregation after 5  $\mu$ mol adenosindiphosphate induction, degree of aggregation after collagen induction and P-selectin expression on platelet surface after 10  $\mu$ mol adenosindiphosphate stimulation. Dipyridamole resistance was revealed in 36% of patients.

**Key words:** pathologic tortuosity of brachiocephalic arteries, platelet, platelet aggregation, flow cytometry, P-selectin, dipyridamole, dipyridamole resistance.

Цереброваскулярные заболевания являются важнейшей медико-социальной проблемой и занимают второе место среди причин смертности и первое место среди причин инвалидизации населения [1]. Одной из причин церебрально-го ишемического инсульта является патологическая извитость магистральных артерий головы (ПИМАГ) [2]. ПИМАГ предрасполагает к нарушению гемодинамики за счет перепада давления на внутренней и наружной стенке изгиба артерии, что приводит к турбулентному току крови. Дополнительным фактором тромбообразования у данных пациентов является замедление кровотока за счет перегиба сосуда [3]. Современные методы нейровизуализации: магнитно-резонансная ангиография (МРА) церебральных артерий, рентгеноконтрастная ангиография церебральных артерий при спи-

ральной компьютерной томографии позволяют выявлять ПИМАГ у больных с признаками дисциркуляторных нарушений на ранних стадиях недостаточности мозгового кровообращения.

Нехирургическая профилактика ишемических нарушений у данных пациентов направлена на коррекцию гемореологических показателей. Активация тромбоцитов является наиболее вероятной реакцией клеточного гемостаза в условиях турбулентного кровотока с перепадом давлений (shear stress phenomenon) и предполагает назначение препаратов, препятствующих конформационному изменению тромбоцитов у данных пациентов.

По литературным данным, назначение дипиридамола приводит к стабилизации формы тромбоцитов, препятствующей их активации [4]. Механизм стабилизации тромбоцитов

связывают с ингибированием высвобождения внутриклеточного кальция и отсутствием его влияния на актиновый компонент цитоскелета за счет модуляции активности протеинкиназ циклическими аденозинмонофосфатом и гуанозинмонофосфатом [5, 6].

**Целью исследования** являлось изучение изменений показателей тромбоцитарного гемостаза и возможностей их коррекции приемом дипиридамола у пациентов с клинически малосимптомной ПИМАГ.

### Материалы и методы

Были обследованы 33 пациента с ПИМАГ в возрасте  $46,7 \pm 14,2$  года, мужчин 6 (18%), женщин 27 (82%). Комплексное обследование включало клиничко-неврологическое, инструментальное и лабораторное исследования. На каждого больного заполнялась специально разработанная карта.

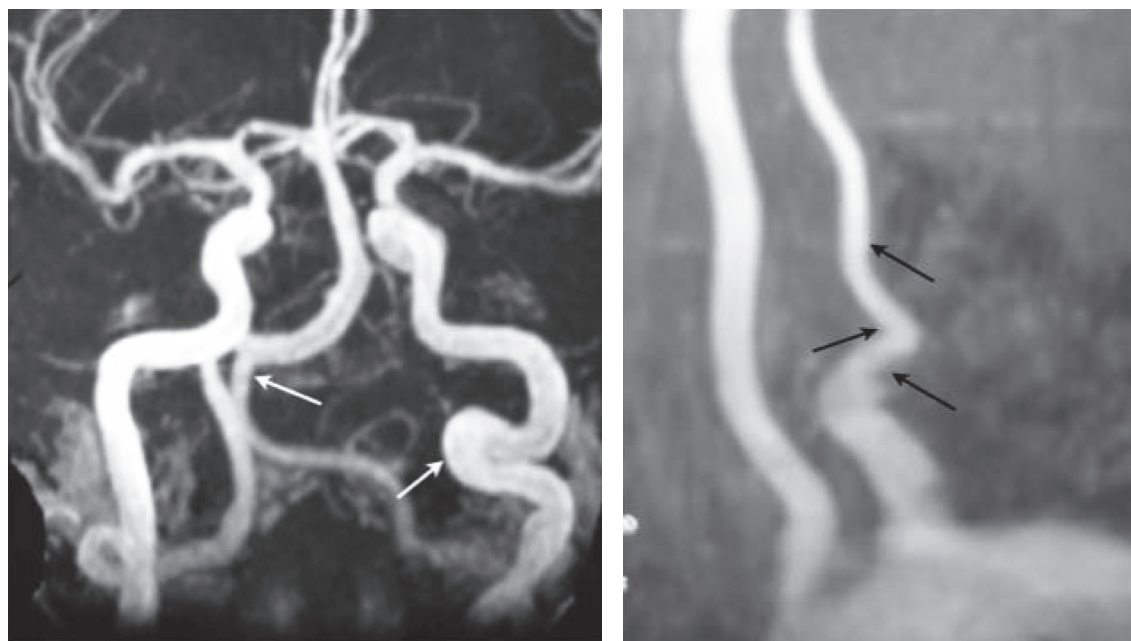
Неврологический осмотр выполнялся по стандартной методике.

МРА церебральных артерий выполнялась на томографе «Signa EXCITE HD» с напряженностью магнитного поля 1,5 Тесла в режиме 3D TOF с определением калибра артерии, правильности её хода и отхождения. На рисунке 1 представлены различные типы извитости у обследованных пациентов.

Лабораторное исследование проводили при первичном обследовании и через месяц после начала терапии дипиридамолом. Лаборатор-

ное исследование включало клинический анализ крови, а также аденозиндифосфат (АДФ)-индуцированную агрегатометрию и проточную цитометрию. Венозную кровь забирали в утреннее время, натощак. В условиях процедурного кабинета под венозным жгутом проводилась венепункция локтевой вены иглой 21G со свободным током крови через вакутейнер в вакуумные полипропиленовые пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта  $K_2$  и  $K_3$  соль этилнлдиаминтетрауксусной кислоты (для гематологического анализа) и 3,8% цитрата натрия (для агрегатометрии и проточной цитометрии). Выполнение клинического анализа крови с подсчетом количества тромбоцитов осуществляли кондуктометрическим методом на автоматических гематологических анализаторах «Beckman Coulter LH 500» и «MaxM» (США). Показатель среднего объема тромбоцитов (MPV) рассчитывался прибором автоматически из гистограммы тромбоцитов.

АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали фотометрическим методом на агрегометре «SOLAR» (Беларусь). Концентрация индуктора составляла 5 мкМ (АДФ производства «Sigma-Aldrich», США). Результат оценивали по изменению степени светопропускания в точке максимума, а также по скорости агрегации через 30 с после добавления АДФ. Перед исследованием на проточном цитометре проводили центрифугирование полученной крови при 1500 об/мин в течение 5 мин при



**Рис. 1.** Извитость брахиоцефальных артерий у обследованных пациентов (стрелками указаны извитые артерии)

комнатной температуре для получения плазмы, богатой тромбоцитами (БТП). Плазму обедненную тромбоцитами (ОТП), получали путем центрифугирования БТП при 3000 об/мин в течение 15 мин. ОТП использовали для разведения БТП до 300 тысяч кл/мкл, если это было необходимо, а также калибровки агрегометра на уровень  $T = 100\%$ . Содержание GP IIb/IIIa на поверхности тромбоцитов, а также число клеток, экспрессирующих Р-селектин, определяли на проточном цитометре «CYTOMICS FC 500» («Beckman Coulter», США). Использовались флуоресцентно меченные моноклональные антитела CD61-FITC, CD62P-PE (Beckman Coulter, США). Количество GP IIb/IIIa на поверхности тромбоцитов до и после индукции 10 мкМ АДФ оценивали по показателю средней интенсивности флуоресценции. Экспрессию Р-селектина на поверхности тромбоцитов оценивали как процент клеток, меченных CD62P-PE до и после индукции 10 мкМ АДФ. Математически рассчитывались параметры:

1)  $\Delta GP IIb/IIIa$ , который показывает увеличение в % количества рецепторов GP IIb/IIIa на поверхности тромбоцитов после индукции АДФ;

2)  $\Delta P$ -селектина, показывающий увеличение % тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин после индукции АДФ.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ Statistica 6.0 for Windows (StatSoft Inc.). Изучаемые количественные признаки представлены в виде  $M \pm \sigma$ , где  $M$  – среднее,  $\sigma$  – одно стандартное отклонение. Проверка нормальности распределения проводилась по критерию Шапиро –

Уилка. Для проверки гипотезы о равенстве средних для двух групп использовались параметрические ( $t$ -Стьюдента для связанных выборок) или непараметрические ( $\chi^2$ , Вилкоксона) критерии. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Результаты. На повторное обследование не явились 8 (27%) пациентов, которые были исключены из статистического анализа.

Причинами обращения в клинику были жалобы на головную боль у 14 (56%), эпизоды головокружения у 17 (68%), синкопальное состояние у 1 (4%) больных. Основные очаговые симптомы представлены на рисунке 2.

Наиболее часто клиническая картина была представлена двигательными расстройствами в виде пирамидной недостаточности и атаксии.

Достоверного изменения числа тромбоцитов и MPV за время лечения выявлено не было (табл. 1).

В таблице 2 приведены показатели агрегации тромбоцитов в ответ на индукцию АДФ и коллагеном.

Было выявлено снижение скорости агрегации тромбоцитов на индукцию АДФ и степени агрегации на индукцию коллагеном, что может указывать на эффективность проводимого лечения.

Метод оптической агрегометрии в настоящее время является «золотым стандартом» для анализа активности тромбоцитов. Однако недостатком данной методики является зависимость оптических характеристик от нетромбоцитарных причин: липидемии, протеинемии. Кроме того, в процессе подготовки проб к исследованию *in vitro* происходит изменение активности тромбоцитов.

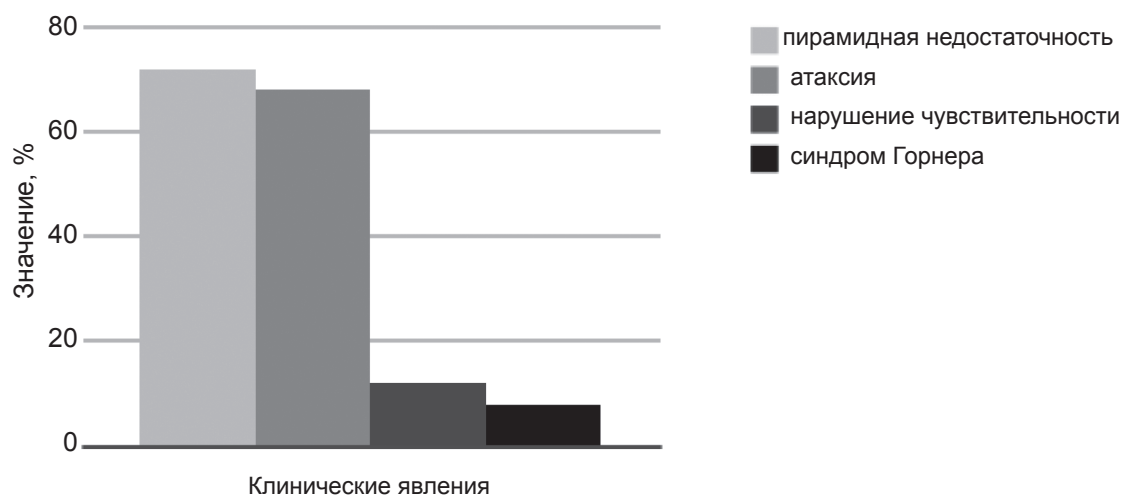


Рис. 2. Клинические проявления у обследованных пациентов с ПИМАГ

Таблица 1

**Значения тромбоцитарных показателей гемограммы**

Значение	Исходно	Через 30 дней	р
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	244,8 $\pm$ 73,0	241,4 $\pm$ 76,3	0,615
MPV, фл.	8,3 $\pm$ 1,0	11,2 $\pm$ 14,0	0,602

Таблица 2

**Агрегация тромбоцитов у обследованных пациентов**

Значение	Исходно	Через 30 дней	р
Степень агрегации АДФ, %	79,4 $\pm$ 19,9	72,8 $\pm$ 15,4	0,277
Скорость агрегации АДФ, %/мин	35,8 $\pm$ 11,7	29,7 $\pm$ 14,2	0,024
Степень агрегации коллаген, %	88,7 $\pm$ 22,6	79,8 $\pm$ 17,9	0,045
Скорость агрегации коллаген, %/мин	7,3 $\pm$ 8,4	6,2 $\pm$ 7,4	0,353

В основе метода проточной цитометрии заложена высокоспецифичная реакция антиген-антитела, что, возможно, позволяет отражать ситуацию *in vivo* более адекватно, по сравнению с оптической агрегометрией.

В таблице 3 указаны значения экспрессии на тромбоците рецепторов к фибриногену в единицах интенсивности флуоресценции. Не наблюдалось достоверного изменения экспрессии рецепторов в обследуемой группе под влиянием приема препарата, что объясняется генетической детерминированностью количества рецепторов к фибриногену на тромбоците и малой чувствительностью к экзо- и эндогенным влияниям.

В таблице 4 приведены значения тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин. Наблюдалось достоверное уменьшение количества тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин после индукции АДФ по сравнению с исходным уровнем. Экспрессия Р-селектина является специфическим маркером активации тромбоцита, отражающим его конформационные изменения, поскольку в неактивированном состоянии Р-селектин депонирован в  $\alpha$ -гранулах внутри тромбоцита [7].

Анализ экспрессии тромбоцитами Р-селектина, скорости АДФ-индуцированной агрегации и степени коллаген-индуцированной агрегации показал неодинаковую динамику среди

Таблица 3

**Экспрессия рецепторов к фибриногену (Pb/Па) на тромбоците у обследованных пациентов**

Время исследования	Интенсивность флуоресценции		
	базальная	стимулированная АДФ	$\Delta$ , %
Исходно	6,9 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 0,9	8,5 $\pm$ 4,5
Через 30 дней	7,0 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 0,8	7,5 $\pm$ 4,4
р	0,423	0,756	0,717

Таблица 4

**Экспрессия Р-селектина на тромбоцитах у обследованных пациентов**

Время исследования	Экспрессия Р-селектина, %		
	базальная	стимулированная АДФ	$\Delta$
Исходно	3,2 $\pm$ 2,7	37,5 $\pm$ 14,2	90,6 $\pm$ 9,2
Через 30 дней	2,9 $\pm$ 2,2	32,0 $\pm$ 13,3	90,5 $\pm$ 5,9
р	0,424	0,049	0,530

обследованных пациентов. Так, у 7 (28%) больных не наблюдалось уменьшения исследуемых показателей в динамике приема дипиридамола, у 2 (8%) пациентов уменьшение было меньше, чем 10% от исходного уровня, что можно рассматривать как отсутствие реакции на проводимую терапию. В настоящее время резистентность к дипиридамолу не имеет ясных клинико-лабораторных критериев. По данным литературы, агрегометрическое исследование у пациентов с транзиторными ишемическими атаками и ишемическим инсультом выявило резистентность к дипиридамолу у 56–59% больных [8]. В группе пациентов с ранними проявлениями церебральной дисциркуляции получены данные, позволяющие предположить резистентность к дипиридамолу у 36% обследованных.

### Выводы

1. Назначение препаратов для первичной профилактики церебральных ишемических нарушений затруднено низкой приверженностью пациентов к лечению.

2. Наиболее чувствительными показателями антиагрегантной активности дипиридамола были скорость агрегации тромбоцитов под влиянием аденозиндифосфата, степень агрегации под влиянием коллагена, а также экспрессия Р-селектина на поверхности тромбоцитов после стимуляции аденозиндифосфатом.

3. Данное исследование позволяет говорить о резистентности к приему дипиридамола у 36% пациентов с патологической извитостью магистральных артерий головы в стадии начальных проявлений недостаточности мозгового кровообращения.

### Литература

1. Суслина, З.А. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика / З.А. Суслина, М.А. Пирадов. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 288 с.
2. Котов, С.В. Врожденная неполноценность соединительной ткани у взрослых больных с патологической извитостью сонных артерий / С.В. Котов, О.П. Сидорова, Н.М. Поплавская // Журн. невропатол. и психиат. им. С.С. Корсакова (приложение «Инсульт»). – 2007. – С. 225–226.
3. Вережагин, Н.В. Роль перегибов внутренних сонных и позвоночных артерий в возникновении тромбоза мозговых сосудов / Н.В. Вережагин, Г.Я. Левина, В.Г. Степанова // Архив патологии. – 1972. – № 6. – С. 28–33.
4. *Dipyridamole synergizes with nitric oxide to prolong inhibition of thrombin-induced platelet shape change* / B.O. Jensen [et al.] // Platelets. – 2011. – Vol. 22, № 1. – P. 7–18.
5. *Taming platelets with cyclic nucleotides* / U.R. Schwarz [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 2001. – Vol. 62, №9. – P. 1153–1161.
6. *Smolenski, A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets* / A. Smolenski // J. Thromb. Haemost. – 2012 – Vol. 10, № 2. – P. 167–176.
7. *Harrison, P. Platelet  $\alpha$ -granules* / P. Harrison, E.M. Cramer // Blood Rev. – 1993. – Vol. 7, № 1. – P. 52–62.
8. *Enhanced ex vivo inhibition of platelet function following addition of dipyridamole to aspirin after transient ischaemic attack or ischaemic stroke: first results from the TRinity AntiPlatelet responsiveness (TrAP) study* / W.O. Tobin [et al.] // Br. J. Haematol. – 2011. – Vol. 152, № 5. – P. 640–647.

В.В. Голдобин

Тел.: +7-901-301-66-53

e-mail: vgoldobin@inbox.ru