УДК 616.921.5:616.15

Романюк С.В., Витковский Ю.А.

ЛИМФОЦИТАРНО-ТРОМБОЦИТАРНАЯ АДГЕЗИЯ И АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ СО СТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИЕЙ И ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

Резюме. *Лимфоциты, как известно, формируют агрегаты с тромбоцитами. Увеличение циркулирующих лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов были зарегистрированы при многих заболеваниях. В предыдущих исследованиях показано, что лимфоциты взаимодействуют с тромбоцитами и формируют агрегаты. Количество и характер ЛТА варьируется в зависимости от активности тромбоцитов. У пациентов с ишемической болезнью сердца и прогрессирующим атеросклерозом снижается количество ЛТА. Аспирин снижает ЛТА. Установлено, что аспирин снижает спонтанную, АДФ -, коллаген - индуцированную агрегацию тромбоцитов и повышает ЛТА у больных с ишемической болезнью сердца.*

Ключевые слова. *ЛТА, агрегация, аспирин*

Romanyuk S.V., Vitkovsky Y.A.

LYMPHOCYTIC-PLATELET ADHESION AND AGGREGATION OF PLATELETS IN PATIENTS WITH ANGINA PECTORIS AND ACUTE CORONARY SYNDROME

Summary. *Lymphocytes are known to form heterotypic aggregates with platelets. Increase in circulating leukocyte and platelet aggregates were registered in many diseases. Previous studies have shown that lymphocyte interact with platelets to form aggregates. The number and nature LPA varies depending on the activity of platelets. In patients with ischemic heart disease and progressive atherosclerosis reduced the number of LPA. Aspirin reduces LTA. Established that aspirin reduces spontaneous, ADF-, collagen - induced platelet aggregation and increases LPA in patients with angina pectoris.*

Keywords*. LPA, aggregation, aspirin.*

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания остаются основной причиной смерти среди населения развитых стран. Атеросклероз - процесс, который является определяющим фактором в патогенезе стенокардии и инфаркта миокарда. В настоящее время он рассматривается как системное воспалительное заболевание, которое характеризуется аккумуляцией иммунных клеток в интиме крупных артерий. Эти клетки включают в себя моноциты/макрофаги, лимфоциты, а также дендритные и натуральные киллеры [8,12]. В основном они представлены CD-68+ моноцитами/макрофагами, а также CD-4+ и CD-8+ Т–лимфоцитами. Моноциты встречаются на всем протяжении фиброзной покрышки, в то время как Т-лимфоциты располагаются в ее краевых отделах [3, 4]. Установлено, что в общем кровотоке тромбоциты вступают в контакт с циркулирующими лейкоцитами [7,10]. Посредством тромбоцитов лейкоциты адгезируют на поверхности активированного эндотелия или прикрепляются к белкам экстрацеллюлярного матрикса. При этом активированные кровяные пластинки продолжают прилипать к лейкоцитам и лейкоцитарно-тромбоцитарным агрегатам, что приводит к дальнейшему росту клеточного скопления на поверхности сосудистой стенки.

Как показали наши исследования, тромбоциты способны к спонтанному образованию коагрегатов с лимфоцитами. Так, в общем пуле лимфоцитов, выделенных из крови доноров, обнаруживается до 14 ± 1% клеток, адгезировавших на своей поверхности тромбоциты [1]. Выявлено, что клетками способными к адгезивному взаимодействию с тромбоцитами являются Т-хелперы (CD4+) и натуральные киллеры (CD16+). Степень лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии зависит от функционального состояния лимфоцитов и кровяных пластинок. Коллаген, АДФ и адреналин наиболее выражено повышают лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию. Механизм лимфоцитарно-тромбоцитарного взаимодействия включает в себя образование интегриновых и неинтегриновых мостов, таких как α_{IIb}/β_3- и β_1-связанные интегрины, Р-селектин–PSGL и CD40–CD40L [11].

В настоящее время обнаружено, что увеличение количества циркулирующих лейкоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов отмечается при некоторых патологических процессах, в частности, выявлено увеличение числа агрегатов нейтрофилов и тромбоцитов у пациентов с нестабильной стенокардией [6].

Нами доказано, что тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии в полной мере отражает степень тяжести патологического процесса и служит надежным критерием, свидетельствующим о его стабилизации [2]. Однако отсутствуют сведения о феномене взаимодействия кровяных пластинок и лимфоцитов при развитии стенокардии и острого коронарного синдрома.

Цель исследования. Изучить лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию и агрегационную активность тромбоцитов у больных со стабильной стенокардией и острым коронарным синдромом с подъемом и без подъема сегмента ST.

Материалы и методы. Нами обследовано 115 человек, из них: 40 мужчин со стабильной стенокардией напряжения II-III функционального класса, 46 - с прогрессирующей стенокардией и 29 - с инфарктом миокарда с зубцом Q в возрасте 40-60 лет в первые сутки заболевания. Контролем служили здоровые лица этой же возрастной группы в количестве 22 человека. Больные со стенокардией разделены на две группы: 1-я - ранее не принимавшие и 2-я - принимавшие аспирин (125 мг/сут). Пациенты с инфарктом миокарда наблюдались на 1-2–е, 10-12-е и 20-22-е сутки с момента поступления. Все они получали дезагрегантную и антикоагулянтную терапию по традиционной схеме. В исследование не включались больные с сахарным диабетом, тяжелыми нарушениями ритма и сердечной недостаточностью III – IV ф.кл. NYHA.

Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия оценивалась в кровотоке по оригинальной методике Витковского Ю.А. и соавт. (1999 г.). Свежую гепаринизированную кровь обследуемых больных наслаивали на градиент урографин-фиколл (плотность 1,077) и выделяли лимфоциты. Собирали интерфазное кольцо, содержащие клетки и кровяные пластинки, однократно промывали физиологическим раствором и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок микроскопировали в камере Горяева. Подсчитывали число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов на 100 клеток, которое выражали в процентах.

Всем пациентам проводилось исследование агрегационной способности кровяных пластинок в обогащенной тромбоцитами плазме. Агрегацию оценивали с помощью стандартного турбидометрического метода, с использованием двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов НПФ «Биола» (Москва). В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали растворы в конечной концентрации: АДФ (5 и 2,5 мкг), коллагена (1 мг/мл) и адреналина (1,25 мкг/мл) фирмы «Технология-стандарт» (Баранул). Оценивали результаты по кривой степени агрегации в отн.ед. и по кривой степени светопропускания в процентах.

Результаты исследования обработаны с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel. Статистический анализ данных включал оценку достоверности отличий сравниваемых величин (контроль-опыт) по t-критерию Стьюдента с определением статистической значимости различий при достигнутом уровне значимости $p<0,05$ и расчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s), значимыми считался $r_s>0,3$.

Результаты исследования и обсуждение. Установлено, что у пациентов, ранее не принимавших аспирин, снижалось количество лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов (ЛТК) до 8,0±1,4% при стабильной стенокардии и до 7,8±0,8% при прогрессирующей стенокардии по сравнению с контрольной группой (14,3±1,2%, $p<0,01$). Выявлено, что в группе больных принимавших аспирин, число ЛТК соответствовало контролю: при стабильной стенокардии – 13,8±0,9%, прогрессирующей стенокардии – 13,9±1,0% (рис. 1).

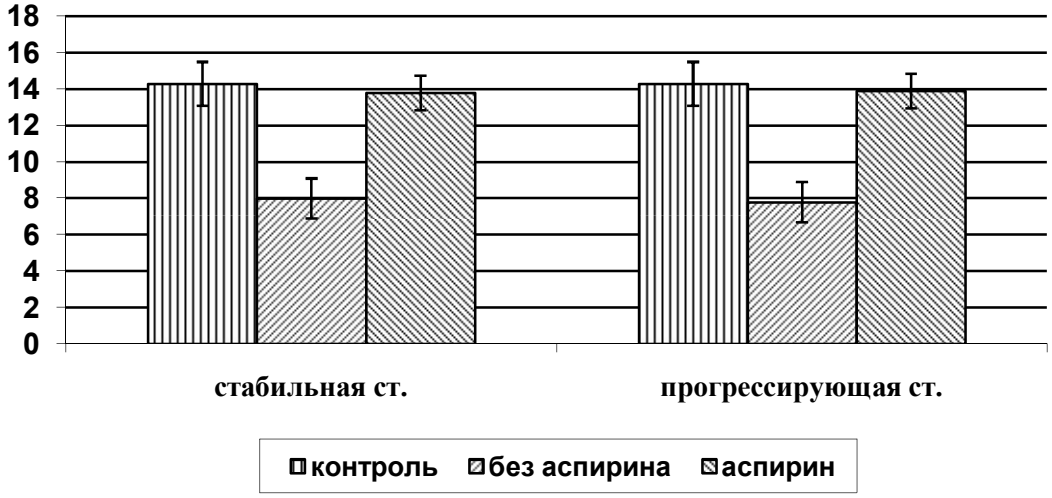

Рис. 1. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у пациентов со стабильной и прогрессирующей стенокардией.

У пациентов, перенесших инфаркт миокарда, количество ЛТК не отличалось от показателей контрольной группы за весь период наблюдения и составило 15,1± 1,6% на 1-2 сутки, 14,6±1,7% на 10-12 сутки и 13,1±1,4% на 20 -22 сутки. Однако в пределах одной группы показатели значительно варьировали. Поэтому мы разделили этих пациентов на подгруппы в зависимости от количества ЛТК. В первую подгруппу (n= 10) вошли пациенты с количеством ЛТК <12 %, во вторую от 12 до 16% (n= 10), в третью > 16% (n=9).

Выявлено, что у больных стенокардией, ранее не принимавших аспирин, в сравнении с контрольной группой увеличивалась спонтанная агрегация тромбоцитов (стабильная – 3,0±0,5%, p<0,001**;** прогрессирующая – 2,2±0,5%, p<0,01; в контроле – 0,5±0,2%) по кривой степени светопропускания. Кривая степени агрегации, которая отражает средний размер агрегатов, показала увеличение спонтанной агрегации при прогрессирующей стенокардии. Обнаружено, что у больных со стабильной стенокардией в сравнении с контрольной группой уменьшается АДФ-индуцированная (АДФ 2,5 мкг), а при прогрессирующей стенокардии – коллаген-индуцированная агрегация (табл. 1).

В группе пациентов со стенокардией, принимавших аспирин, спонтанная агрегация не изменялась. У пациентов со стабильной стенокардией обнаружено снижение только коллаген-индуцированной агрегации, а с прогрессирующей стенокардией – уменьшалась индуцированная агрегация всеми агонистами по сравнению со здоровыми (табл. 1). Подобные изменения зарегистрированы также с помощью кривой светопропускания.

Таблица 1

Агрегация тромбоцитов у пациентов со стабильной и прогрессирующей стенокардией, (M±SD)

		Спонтанная		АДФ 5 мкг		АДФ 2,5 мкг		Адреналин		Коллаген	
Контроль		Макс. знач.	Макс. накл.	Макс. знач.	Макс. накл.	Макс. знач.	Макс. накл.	Макс. знач.	Макс. накл.	Макс. знач.	Макс. накл.
		1,2± 0,1	0,6±0,1	8,5±0,7	23,7±2,5	7,7±0,6	20,8±2,2	6,8±0,5	9,3±1,5	5,8±0,5	14,7±1,7
Стаб. стенокардия	Безаспирина	1,1±0,1	0,4±0,1	6,3±1,3	16,4±4,1	4,8±1,4	12,3±3,4	5,0±1,2	4,9±1,8	6,0±1,0	13,5±2,7
	Аспирин p_1 p_2	1,6±0,2*	0,9±0,1* p<0,05	7,3±0,6	17,9±2,0	7,0±0,7 p<0,05	20,0±2,2 *p<0,05	5,9±0,7	8,6±0,7	5,3±0,7	7,9±1,5 p<0,01
Прог. стенокардия	Без аспирина	1,7±0,2	0,5±0,1	6,8±0,7	18,7±3,0	6,8±1,1	17,5±3,8	5,3±0,6	6,5±1,3	3,9±0,7	6,3±1,5 6,2±1,8
	Аспирин p_3 p_4	1,4±0,2	0,9±0,1 p<0,05	5,5±0,7 p< 0,001	12,9±2,1 *p<0,001	6,2±0,8 p<0,05	11,1±2,0 *p<0,001	5,4±0,5 p<0,05	5,7±1,1 p<0,05	4,4±0,7 p<0,05 p<0,05	p<0,01 p<0,001

* - статистическая значимость различий между подгруппами 1 и 2, 3 и 4 (p<0,05). p_1 - различия между контролем и стабильной стенокардией (без аспирина). p_2 – различия между контролем и стабильной стенокардией (с аспирином). p_3 – достоверность различий между контролем группами и прогрессирующей стенокардией (не принимавших аспирин). p_4 – достоверность различий между контролем группами и прогрессирующей стенокардией (принимавших аспирин).

В группе пациентов, перенесших инфаркт миокарда, наблюдались значительные изменения агрегационных свойств тромбоцитов. Установлено, что к концу первых суток после развития инфаркта увеличивается максимальное значение спонтанной агрегации по кривой светопропускания (3,6±0,7%) в сравнении с контрольной группой (0,5±0,2 %, p<0,001). Использование сильных агонистов выявило значительное снижение агрегационной функции кровяных пластинок для адреналина – 28,8±4,0%, против 46,0±6,3% в контроле (p<0,05) и для коллагена – 45,3±6,3%, против 84,6±8,1% в контроле (p<0,001). Гипоагрегацию в первые сутки инфаркта миокарда также подтвердили показатели среднего размера агрегатов, зарегистрированных на фоне как слабых (АДФ 2,5 мкг) так и сильных индукторов (адреналин, коллаген). Признаки АДФ-индуцированной гипоагрегации сохранялись до 10-х суток нахождения пациентов в стационаре. На 20-е сутки признаки гипоагрегации полностью исчезали при добавлении всех индукторов (рис. 2).

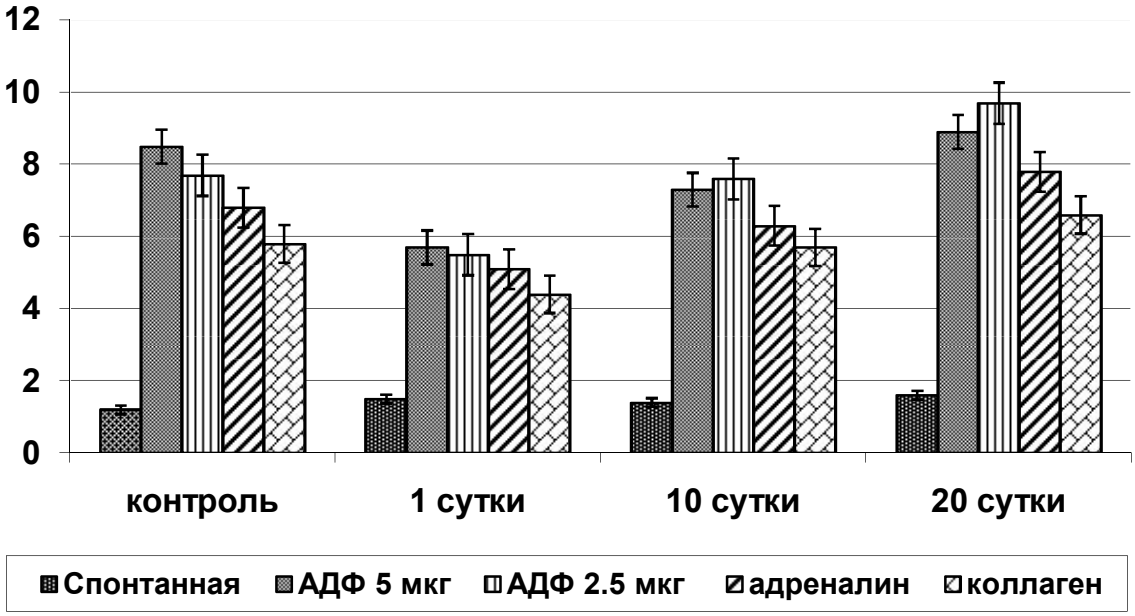

Рис.2. Агрегация тромбоцитов у пациентов, перенесших инфаркт миокарда (показатели кривой среднего размера агрегатов).

Нами обнаружено, что количество ЛТК у пациентов после инфаркта миокарда значительно варьировало. Установлено, что в подгруппе больных с минимальным содержанием тромбоцитарно-лейкоцитарных коньюгатов, признаки гипоагрегации тромбоцитов были наиболее выражены. Так по результатам кривой среднего размера агрегатов выявлено наличие корреляционной связи средней силы между числом ЛТК и агрегацией тромбоцитов в первые сутки после инфаркта (r_s>0,4). По мере формирования рубца сила корреляции снижалась, а также изменялся ее характер за счет уменьшения признаков гипоагрегации (r_s >0,3). В подгруппе с увеличенным количеством ЛТК связь имела отрицательный характер, и была меньшей силы в сравнении с подгруппой с низким содержанием лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов(r_s <- 0,3). По мере выздоровления ее сила также снижалась.

Таким образом, у больных как со стабильной, так и с прогрессирующей стенокардией в циркулирующей крови снижается количество лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов. Предположительно, уменьшение их количества связано с усиленной миграцией активированных лимфоцитов и тромбоцитов за пределы сосудистого русла. Ранее проведенные нами исследования in vitro доказали, что тромбоциты стимулируют адгезию лимфоцитов к экстрацеллюлярному матриксу в условиях тока жидкости, но не в статическом состоянии. При этом лимфоцитарно-тромбоцитарные кластеры, сформированные на поверхности матрикса, являются главными триггерами адгезии лимфоцитов [6]. Использование аспирина в комплексном лечении пациентов со стенокардией способствует восстановлению общего количества лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов до показателей нормы. Этот эффект можно объяснить гипоагрегационным действием аспирина, которое ведет к уменьшению количества тромбоцитарных агрегатов на поверхности поврежденного или активированного эндотелия и тем самым препятствует контакту ЛТК с сосудистой стенкой. Проведенными ранее исследованиями установлено, что блокада α_{IIb}/β_3 рецепторов (т.е. агрегации тромбоцитов) тирофибаном предупреждает образование клеточно-тромбоцитарных кластеров, тем самым, подавляя на 95% лимфоцитарную адгезию к субэндотелиальному матриксу в условиях тока жидкости [5]. Вероятно, что аспирин, обладая антиагрегационным эффектом, подобным тирофибану, приводит к увеличению количества ЛТК в циркуляции. Препарат, препятствуя опосредованному тромбоцитами контакту лимфоцитов с сосудистой стенкой, снижает миграцию этих клеток в зону атеросклеротического поражения, а значит, уменьшается степень воспалительной реакции в сосудистой стенке. Этим, отчасти, можно объяснить положительный эффект аспирина на течение сердечно-сосудистых заболеваний.

У пациентов, перенесших инфаркт миокарда, выявлена спонтанная гиперагрегация тромбоцитов на фоне индуцированной гипоагрегации. Спонтанная гиперагрегация является признаком повышенной функциональной активности кровяных пластинок, а индуцированная гипоагрегация кровяных пластинок обусловлена влиянием аспирина, который принимали пациенты. Известно, что такие дезагреганты, как аспирин не влияют на спонтанную агрегацию тромбоцитов. Поэтому выявленная спонтанная гиперагрегация на фоне индуцированной гипоагрегации доказывает наличие повышенной активности тромбоцитов, которая обусловлена патофизиологическими сдвигами характерными инфаркту миокарда.

Небезосновательно предположить, что изменения функциональной активности тромбоцитов, которые обнаружены нами у пациентов, перенесших инфаркт, отразится на силе их контактного взаимодействия с лейкоцитами. Известно, что стимуляция тромбоцитов проявляется экспрессией провоспалительных маркеров на их мембране, таких как Р-селектин и CD40L [13]. Посредством Р-селектина и его лейкоцитарного лиганда PSGL-1, тромбоциты образуют тромбоцитарно-лейкоцитарные коньюгаты. Через CD40L кровяные пластинки взаимодействуют с моноцитами и сосудистым эндотелием [11]. Работами Michelson A.D. [2001] и др. установлено, что после острого коронарного синдрома число циркулирующих моноцитарно-тромбоцитарных коагрегатов является более показательным маркером активации кровяных пластинок, чем определение экспрессии Р-селектина на их поверхности. Таким образом, установленное нами снижение количества лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов в циркуляции указывает на наличие признаков гиперфункции тромбоцитов, что указывает в свою очередь на исходную гиперфункцию кровяных пластинок у исследуемых пациентов. Причем, чем ниже степень лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, тем выраженнее гиперактивация тромбоцитов.

Выводы:

1. В крови больных стабильной и прогрессирующей стенокардией отмечается снижение количества лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов.
2. Использование аспирина в комплексном лечении пациентов со стенокардией восстанавливает общее количество лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов до показателей нормы.
3. В группе больных ИМ с минимальным содержанием тромбоцитарно-лейкоцитарных коньюгатов, признаки активации тромбоцитов были наиболее выражены.

Литература:

1. Витковский Ю.А. Феномен лимфоцитарно-тромбоцитарного розеткообразования / Ю.А. Витковский, Б.И. Кузник, А.В. Солпов // Иммунология. – 1999. – № 4. – С. 35 – 37.
2. Витковский Ю.А. Патогенетическое значение лимфоцитарно- тромбоцитарной адгезии / Ю.А. Витковский, Б.И. Кузник, А.В. Солпов // Медицинская иммунология. – 2006. – Т.8. – № 5-6. – С.745–753.
3. Жданов В.С., Чумаченко П.В., Дробкова И.П. Воспалительно-иммунологическая клеточная реакция в интиме аорты и легочной артерии и развитие атеросклероза /В.С.Жданов, П.В. Чумаченко, И.П. Дробкова // Кардиология. – 2004. – № 2. – С. 40– 44.
4. Патоморфологические особенности атеросклеротических бляшек при остром коронарном синдроме / Т.П. Шлычкова [и др.] // Кадиология. – 2003. – № 12. – С. 42–46.
5. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction / A.D. Michelson [et al.] // Circulation. – 2001. – Vol. 104. – P. 1533–1537.
6. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina / I. Ott [et al.] // Circulation. – 1996. – Vol. 94. – P. 1239–1246.
7. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelets proteins and platelet specific genes / J.P. McRedmond [et al.] // Mol. Cell. Proteomics. –2004 – Vol. 3. – P. 133 – 144.
8. Lusis A.J. Atherosclerosis // Nature. – 2000. – vol. 407. – P. 233 -241.
9. Platelets enhance CD4+ lymphocyte adhesion to extracellular matrix under flow conditions:

Role of platelet aggregation, integrins, and non-integrin receptors / A. Solpov [et al.] // Thrombosis and Haemostasis. – 2006 – Vol. 95. – P. 815-821.
10. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules / T.G. Diacovo [et al.] // Science. – 1996. – Vol. 273. – P. 252-255.
11. P-selectin, tissue factor and CD40 ligand expression on platelet-leukocyte conjugates in the presence of GPIIb/IIIa antagonist / L. Zhao [et al.] // Platelets. – 2003. – Vol. 14 (7-8). – P. 473-480.
12. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease/ R. Ross // N. Engl. J. Med. – 1999. – Vol. 340. – P. 115-126.
13. Wagner D.D. Platelets in Inflammation and Thrombosis / D.D. Wagner, P.C. Burger // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. - 2003. – Vol. 23. – P. 2131–2137.