

ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ АГРЕГАТЫ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ СЕРДЦА И МОЗГА**Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького (г. Донецк)**

Работа выполнена в рамках НИР МОЗ Украины «Міжтканинні та міжклітинні кооперації в реалізації репаративної регенерації органів: залежність від реактивності організму» № держреєстрації 0109U008714.

Вступление. Несмотря на развитие новых технологий диагностики и терапии, инфаркт миокарда и ишемический инсульт являются ведущими причинами смертности населения как в Украине, так и за рубежом. Ключевым патогенетическим звеном ишемического поражения специализированных клеток (нейронов и кардиомиоцитов) считается повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , что ведет к активации ряда протеаз, липаз и эндонуклеаз [3]. Оксидативный стресс в условиях ишемии проявляется повышением генерации свободных радикалов, которые вызывают повреждение мембран, митохондриальной и ядерной ДНК, вызывая гибель клеток и продукцию медиаторов воспаления [2]. Последние в свою очередь, индуцируют JNK, p-38, NF- κ B и AP-1 в глиальных клетках, кардиомиоцитах, эндотелиоцитах и лейкоцитах. При этом, независимо локализации ишемического повреждения (мозг или сердце) суммарный результат альтерации проявляется следующими изменениями: 1) снижением капиллярной перфузии и трофики специализированных клеток; 2) нарушением барьерной функции эндотелия; 3) повышением адгезии циркулирующих форменных элементов крови; 4) провоспалительной активацией клеток в зоне повреждения; 5) протромбогенной стимуляцией со стороны сосудистой стенки [5]. Последние два фактора тесно ассоциированы друг с другом, на сегодня их интегрирующим компонентом считаются тромбоциты, способные не только стимулировать провоспалительную активацию лейкоцитов, но и формировать с ними агрегаты [6, 7]. При этом важно отметить, что тромбоциты могут формировать контактные и сигнальные взаимодействия с разными лейкоцитами, реализующими как неспецифическую, так и специфическую защиту в организме человека [8]. Однако какова динамика и специфика тромбоцитарно-лейкоцитарных отношений при остром ишемическом поражении сердца и мозга, остаются мало изученными.

Целью исследования стала оценка морфологических и функциональных проявлений ассоциации тромбоцитов и лейкоцитов крови при остром нарушении коронарного и церебрального кровотока.

Объект и методы исследования. Для анализа закономерности межклеточных коопераций в периферической крови проведен морфологический и спектрофотометрический анализ крови 30

пациентов с инфарктом миокарда и 25 пациентов с ишемическим инсультом. Периферическую кровь забирали в пробирки с цитратом натрия, в пропорции 9:1. Для морфологической оценки готовили мазки крови, окрашивали их по методу Романовского-Гимзы. При морфологическом исследовании оценивали наличие, размер, структурный состав и удельное количество тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов по отношению к числу свободных лейкоцитов. Клинико-лабораторные исследования включали анализ маркеров воспаления, включая фибриноген, количество лейкоцитов, уровень С-реактивного белка.

Для оценки функционального состояния форменных элементов выделяли нейтрофилы, моноциты и тромбоциты методом центрифугирования на двойном градиенте [6]. Полученные суспензии тромбоцитов (200×10^3 /мл), нейтрофилов (5×10^6 клеток в 1 мл) и моноцитов-лимфоцитов (3×10^6 клеток в 1 мл) использовали для анализа изолированной или ассоциированной с лейкоцитами агрегации тромбоцитов. С этой целью оценивали спонтанную (с добавлением 0,1 мл физиологического раствора) и индуцированную АДФ (ЕС50) или адреналином (2,5 мкМ) агрегацию тромбоцитов (АТ). Затем оценивали изменение АТ при совместной инкубации тромбоцитов с суспензией нейтрофилов или моноцитов-лимфоцитов без стимулятора и при стимуляции АДФ. Результаты спектрофотометрической оценки верифицировали морфологически с окраской мазков по Романовскому-Гимзе. Группу сравнения составили 10 пациентов со стабильной стенокардией. В контрольную группу вошли 10 волонтеров сходного возраста. Полученные результаты обрабатывали в программе MedStat [1].

Результаты исследований и их обсуждение. У пациентов с инфарктом миокарда (ИМ) и ишемическим инсультом (ОИМК) отмечено развитие лейкоцитоза, повышение уровня С-реактивного белка и фибриногена. Морфологический анализ мазков крови выявил наличие агрегатов, включающих комплексы нейтрофилы-тромбоциты-фибрин, моноциты-тромбоциты-фибрин, или нейтрофилы-моноциты-тромбоциты. Наиболее частым вариантом агрегатов на момент госпитализации были ассоциации тромбоцитов и нейтрофилов. Реже встречались комплексы моноциты-тромбоциты, наиболее редкими были агрегаты лимфоцитов-моноцитов и тромбоцитов. Количество таких агрегатов на момент госпитализации коррелировало с лейкоцитозом ($r=0,425$; $p<0,01$) и уровнем С-реактивного белка ($r=0,593$; $p<0,01$), а также тропонина при ИМ

($r=0,681$; $p<0,01$), отражая диагностическую значимость агрегатов.

Анализ агрегации тромбоциты показал повышение спонтанной АТ и выраженную необратимую агрегацию при инкубации с АДФ в стандартной концентрации (5 мкМ). Анализ АТ при инкубации с разными концентрациями АДФ, позволил определить ЕС50. Данная величина при ИМ и ОНМК оказалась значимо ниже контроля – соответственно $2,1\pm 0,2$ и $1,8\pm 0,3$ мкМ и достоверно отличалась от группы сравнения ($p<0,01$) и контроля ($p<0,001$). Аналогичный подход позволил выявить снижение ЕС50 адреналина, отражающее повышение чувствительности $\alpha 2A$ -адренорецепторов тромбоцитов. Учитывая значимое повышение реакции тромбоцитов на гуморальные агонисты, которые в норме вызывают слабую и обратимую АТ, зарегистрированный факт гиперагрегации тромбоцитов может отражать изменение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , считающегося ключевым механизмом активации тромбоцитов. Интересно, что усиление агрегации тромбоцитов отмечалось и при добавлении в инкубационную среду суспензии 0,1 мл взвеси лейкоцитов. При добавлении к суспензии тромбоцитов нейтрофилов отмеченное повышение спонтанной агрегации до $58,5\pm 7,6\%$ при ИМ и до $71,5\pm 3,7\%$ у пациентов с ОНМК. Введение в инкубационную среду моноцитов повышало АТ до $49,3\pm 3,4\%$ и $52,6\pm 2,3\%$ при ИМ и ОНМК соответственно.

Классические представления о патогенезе ишемического инсульта и ИМ базируются на аномальным тромбогенезе, сопряженном с атеротромбозом, ключевыми участниками которых являются тромбоциты. При этом активированные тромбоциты являются источником металлопротеиназ и простагландинов, вызывающих нарушение проницаемости гисто-гематических барьеров, включая ГЭБ; а также гемокинов, стимулирующих активность и направленную миграцию лейкоцитов. В то же время тромбоциты способны продуцировать IL-8 известный также как CXCL8, RANTES и CCL5, являющиеся хемоаттрактантами для нейтрофилов, вызывая не

только их привлечение, но и стимуляцию функциональной активности [4]. Описанный в литературе факт формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов при нестабильной стенокардии, инфаркте миокарда и ангиопластике, на сегодня рассматривают как фактор нарушения микроциркуляции в зоне ишемии и развития воспаления в зоне повреждения [3, 7]. Предполагается также роль тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов в активации репарации сосудистой стенки. Последнее утверждение строится на наличии в секреторных гранулах тромбоцитов широкого спектра факторов роста, а также проангиогенных факторов в том числе VEGF-A, -C [6].

Результаты проведенного исследования не только подтверждают наличие тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов в периферической крови пациентов с ИМ и ОНМК, но и демонстрируют их связь с лабораторными показателями острого воспалительного ответа организма на повреждение и проагрегантным статусом тромбоцитов. Более того, исследования *in vitro* показали не только возможность активации лейкоцитов со стороны тромбоцитов, но и, что очень важно, обратный процесс – стимуляцию агрегации тромбоцитов со стороны лейкоцитов.

Выводы. Острое нарушение коронарного и церебрального кровотока, сопровождается стереотипной реакцией системы крови. Последняя морфологически проявляется формированием тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов в циркулирующей крови, образование которых обусловлено активацией и взаимной стимуляцией форменных элементов крови, участвующих в тромбогенезе и воспалении.

Перспективы дальнейших исследований. Выяснение ведущих патогенетических механизмов острого нарушения коронарного и церебрального кровотока и молекулярных детерминант взаимоотношений между тромбоцитами и лейкоцитами позволит наметить пути коррекции нарушения тромбогенеза и определить стратегию профилактики ишемического поражения органов.

Список литературы

1. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики / Ю. Е. Лях, Г. В. Гурьянов, В. Н. Хоменко. – Д. – 2006. – 211 с.
2. Палеев Ф. Н. Неспецифические маркеры воспаления в прогнозировании течения ишемической болезни сердца / Ф. Н. Палеев, И. С. Абудеева, О. В. Москалец // Кардиология. – 2009. – № 9. – С. 59–65.
3. Шимохина Н. Ю. Агрегационная активность тромбоцитов в системе гемостаза у больных с осложнённым течением гипертонической болезни в сочетании с ишемической болезнью сердца / Н. Ю. Шимохина, М. М. Петрова, А. А. Савченко // Кардиология. – 2010. – № 8. – С. 21–24.
4. Brass L. Understanding and Evaluating Platelet Function / L. Brass // Hematology. – 2010. – Vol. 2010. – P. 387–396.
5. Breet N. J. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation / N. J. Breet, J. W. van Werkum, H. J. Bouman // JAMA. – 2010. – Vol. 303. – P. 754–762.
6. Chakroun T. Platelet-leukocyte aggregates as a marker for platelet activation in platelet concentrates / T. Chakroun, S. Abdelkefi // Transfus. Clin. Biol. – 2008. – Vol. 15. – P. 148–153.
7. Marquardt L. Leukocyte-platelet aggregates in acute and subacute ischemic stroke / L. Marquardt, C. Anders, F. Buggle // Cerebrovasc. Dis. – 2009. – Vol. 28. – P. 276–282.
8. Rivera J. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation / J. Rivera, M. L. Lozano // Haematologica 2009. – Vol. 94. – P. 700–711.

УДК 616.831+616.132.2]-005-036.11+616.155.2/.3

ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ АГРЕГАТЫ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ СЕРДЦА И МОЗГА Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Статинова Е.А., Киреева М.А., Максименко О.Л.

Резюме. Для выяснения роли взаимодействия между тромбоцитами и лейкоцитами в патогенезе ишемического поражения органов был проведен морфологический анализ и оценка агрегации тромбоцитов пациентов с острым нарушением коронарного и церебрального кровотока (ОКС и ОНМК). Результаты проведенного исследования подтвердили наличие тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов в периферической крови пациентов с ОКС и ОНМК, продемонстрировали их связь с показателями острого воспалительного ответа на повреждение и проагрегантным статусом тромбоцитов. Исследования *in vitro* показали не только возможность активации лейкоцитов со стороны тромбоцитов, но и стимуляцию агрегации тромбоцитов со стороны лейкоцитов.

Ключевые слова: тромбоциты, лейкоциты, агрегаты, ишемия, мозг, сердце.

УДК 616.831+616.132.2]-005-036.11+616.155.2/.3

ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНИ АГРЕГАТИ ЗА УМОВ ІШЕМІЧНОГО УРАЖЕННЯ СЕРЦЯ І МОЗКУ Барінов Е.Ф., Сулаєва О.М., Статінова О.А., Кіреєва М.О., Максименко О.Л.

Резюме. Для з'ясування ролі взаємодії між тромбоцитами та лейкоцитами в патогенезі ішемічного ураження органів був проведений морфологічний аналіз крові і оцінка агрегації тромбоцитів пацієнтів з гострим порушенням коронарного і церебрального кровотоку (ГКС і ОПМК). Результати проведенного дослідження підтвердили наявність тромбоцитарно-лейкоцитарних агрегатів в периферичній крові пацієнтів з ГКС та ОПМК, продемонстрували зв'язок їх параметрів з показниками гострої запальної відповіді на ушкодження і проагрегантним статусом тромбоцитів. Дослідження *in vitro* показали не тільки можливість активації лейкоцитів з боку тромбоцитів, але й стимуляцію агрегації тромбоцитів з боку лейкоцитів.

Ключові слова: тромбоцити, лейкоцити, агрегати, ішемія, мозок, серце.

UDC 616.831+616.132.2]-005-036.11+616.155.2/.3

Platelet-Leukocyte Aggregates At Ischemic Lesions Of The Heart And Brain

Barinov E.F., Sulayeva O.N., Statinova E.A., Kiryeyeva M.A., Maksimenko O.L.

Summary. To establish the role of the interaction between platelets and leukocytes in the pathogenesis of ischemic organs damage the morphological analysis and assessment of platelet aggregation were performed in patients with acute coronary syndrome and ischemic stroke. Results of the study confirmed the presence of platelet-leukocyte aggregates in peripheral blood of patients with acute coronary syndrome and stroke, have shown their relation to the acute inflammatory response to injury and increased aggregation of platelets. Studies *in vitro* have shown either stimulation of leukocytes by activated or stimulation of platelet aggregation by leukocytes.

Key words: platelets, leukocytes, aggregates, ischemia, brain, heart.

Стаття надійшла 11.07.2011 р.