

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Э.Ф. Баринов, О.Н. Сулаева, В.Ю. Делий

УДК 616-002.44/.45-005.1+612.398.195+612.111.7]-036.87-036

Э.Ф. Баринов, О.Н. Сулаева, В.Ю. Делий

РЕАКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ НА КОЛЛАГЕН И ПУРИНЫ – ОТ ТРАКТОВКИ МЕХАНИЗМОВ АГРЕГАЦИИ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ РЕЦИДИВА ЯЗВЕННОГО КРОВОТЕЧЕНИЯ

Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького (г. Донецк)

Работа является фрагментом НИР МОЗ Украины «Міжтканинні та міжклітинні кооперації в реалізації репаративної регенерації органів: залежність від реактивності організму» (№ 0109U008714 шифр МК 01.10)

Вступление. Ключевым патогенетическим событием при развитии язвенного кровотечения является повреждение стенки сосудов подслизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки [1]. Стереотипный ответ организма на данное событие включает активацию системы гемостаза [6]. Важнейшим индуктором тромбогенеза при этом считается коллаген, который не только способствует связыванию и активации фактора Виллебранда, но и напрямую стимулируют адгезию тромбоцитов [3]. Последнее событие связано с экспрессией на плазмолемме тромбоцитов многочисленных рецепторов к коллагену (GPVI и интегрин $\alpha_2\beta_1$). Активируя через сигналы фосфолипазы $C\gamma_2$ (ФЛС γ_2), внутриклеточный каскад с освобождением ДАГ и инозитол-1,4,5-трифосфата активирует протеинкиназу С (ПКС) и увеличивает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , что вызывает не только адгезию и изменение формы тромбоцитов, но также активацию $\alpha IIb\beta_3$ рецепторов, секрецию α - и β -гранул, освобождение коагуляционных факторов и вторичных агонистов, в том числе и пуринов [5, 9]. При этом, интерес к регуляторному пулу пуринов вызван как недостаточным пониманием сопряжения нисходящего каскада их сигнальной системы с таковой коллагена [8], так и их ролью в реализации патологических и компенсаторно-приспособительных реакций при ишемии, развивающейся на фоне кровотечения. В этом контексте можно предположить модулирующий эффект АДФ и АТФ на агрегацию тромбоцитов, вызванную коллагеном. Данная гипотеза востребована для анализа механизмов кровотечения, развивающегося на фоне хронического воспалительно-деструктивного процесса, предполагающего экспозицию коллагена базальной мембраны эндотелия и субэндотелия [1].

Цель работы: выявить закономерности реакции тромбоцитов на коллаген и модулирующую роль пуринов для прогнозирования рецидива язвенного кровотечения.

Объект и методы исследования. Тромбоциты выделяли из венозной крови 36 пациентов (25 мужчин и 11 женщин, средний возраст $53,6 \pm 2,5$ лет) с кровотечением из язв гастродуоденальной зоны на момент госпитализации. Богатую тромбоцитами плазму получали путем центрифугирования при 1000 об./мин в течение 5 минут. Оценивали изменение степени индуцированной агрегации тромбоцитов (АТр) спектрофотометрическим методом [4] на агрегометре фирмы Solar (Белоруссия) при введении первичного агониста коллагена (20 мг/мл, «Технология-стандарт») и вторичных агонистов в концентрации EC_{50} : АДФ - 5 мкМ, АТФ – 200 мкМ. Группу контроля составляли 27 добровольцев (18 мужчин и 9 женщин) аналогичного возраста, не имеющих в анамнезе язвенной болезни и нарушений в системе гемостаза. Статистическую обработку осуществляли в статическом пакете MedStat: оценивали медиану и W-критерий Вилкоксона для оценки центров двух независимых выборок [2].

Результаты исследований и их обсуждение. При исследовании функционального ответа тромбоцитов в контрольной группе у большинства пациентов (группа А, 22 человека, 78%) развивался классический ответ на коллаген, характеризующийся однофазной необратимой кривой с $Me \pm m = 93,0 \pm 6,6\%$. Однако у 5 (22%) человек (группа Б) регистрировали слабый функциональный ответ ($Me \pm m = 9,2 \pm 6,1\%$), характеризующийся обратимой агрегационной кривой. Для выяснения возможных механизмов вариации ответа тромбоцитов на первичный агонист коллаген, дальнейшее исследование проводили с использованием АДФ и АТФ (табл. 1). Как видно из таблицы, в группе А высокий агрегационный ответ тромбоцитов на коллаген сочетался с выраженной реакцией на АДФ, при этом амплитуда АТр, вызванной АТФ, соответствовала EC_{50} . Иная ситуация имела место в группе Б. При слабой реакции на коллаген, у данных индивидуумов регистрировался нормальный ответ на АДФ. Данная ситуация выглядит парадоксальной учитывая тот факт, что коллаген традиционно считается мощным проагрегантом, а АДФ – гораздо более слабым. Это связывают, в первую очередь, с наличием на тромбоцитах огромного количества

рецепторов к коллагену - более 1000 на одном тромбоците, что на порядок выше такового для АДФ (около 150). Кроме того, активация тромбоцитов коллагеном сопровождается секрецией плотных гранул с освобождением АДФ [10]. По сути, выявленный в работе факт превышения амплитуды агрегационного ответа тромбоцитов на АДФ в сравнении с коллагеном может быть результатом: 1) низкой чувствительности рецепторов к коллагену, в частности за счет разобщения эффектов активации GPVI и $\alpha 2\beta 1$; 2) изменения (угнетения) тирозиновых киназ, принимающих участие в трансдукции сигнала с рецепторов коллагена; 3) ограничения активности ФЛС γ_2 и ее нисходящего каскада и пр. [5]. Вероятно, выяснить данные факты можно с использованием молекулярно-генетических методов. Однако можно предположить, что одним из факторов низкого ответа на коллаген в группе Б является нарушение механизмов секреции плотных гранул и освобождения АДФ. В конечном итоге, выявленные особенности реакции тромбоцитов на агонисты в контрольной группе предполагают вариабельность комбинаций в механизмах регуляции тромбогенеза и существование предрасположенности к ограничению

ответа на факторы сосудисто-тканевого звена системы гемостаза.

Анализ ответа тромбоцитов на используемые индукторы у пациентов с язвенными кровотечениями выявил ряд интересных особенностей. Во-первых, обращало на себя внимание выраженное снижение реакции на коллаген среди пациентов с кровотечениями из язв гастродуоденальной зоны. У 28 (78%) из 36 обследованных больных статистически значимая реакция тромбоцитов на коллаген отсутствовала (группа Б). Только у 8 (22%) пациентов (группа А) был зарегистрирован значимый ответ на коллаген, $Me \pm m = 80,3 \pm 7,6$, проявляющийся развитием выраженной необратимой агрегации тромбоцитов (табл. 2). В данной группе ответ тромбоцитов на пурины при широкой вариабельности признака, находился в пределах, адекватных используемой EC_{50} концентрации агонистов. Наличие столь значимых различий ответа тромбоцитов на коллаген и пурины продиктовало интерес к роли этих агонистов в детерминации течения и исхода язвенного кровотечения. Сопоставление результатов оценки АТр с динамикой и эндоскопическими показателями гемостаза позволили установить следующее. В группе А у всех пациентов был зафиксирован стабильный гемостаз, тогда как в группе Б у 6 пациентов (75%) зарегистрировано развитие повторных кровотечений. Анализ механизмов нарушения агрегационного ответа тромбоцитов на коллаген при язвенных кровотечениях показал вариабельность ответа тромбоцитов на пурины. Так, отсутствие реакции тромбоцитов на коллаген сопровождалось двукратным уменьшением ответа на АДФ (по сравнению с контрольной группой; $p < 0,01$), в то время как АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов широко варьировала. При этом комбинация низкого ответа тромбоцитов на коллаген и АДФ сопровождалась повышением вероятности развития рецидивов кровотечений. В отличие от этого, при высокой АДФ-индуцированной АТр даже при отсутствии ответа тромбоцитов на коллаген, частота повторных кровотечений была значимо меньше. Данный факт свидетельствует о значении вторичных агонистов (пуринов) в реализации компенсаторно-приспособительных реакций тромбоцитов, направленных на поддержание тромбогенеза при язвенных кровотечениях. Кроме того, выявленный факт побуждает к анализу роли/значимости G-белок ассоциированных рецепторов тромбоцитов в модуляции их агрегационного ответа и реализации механизмов тромбогенеза в условиях ulcerогенеза.

Выводы. У больных с язвенными кровотечениями отмечается снижение агрегации тромбоцитов в ответ на коллаген. Сочетанное снижение реакции тромбоцитов на коллаген и АДФ является фактором риска развития повторного кровотечения.

Перспективы дальнейших исследований. Изучение статуса внутриклеточных сигнальных систем позволит определить молекулярные механизмы дисфункции тромбоцитов при язвенных кровотечениях.

Таблица 1

Параметры агрегации тромбоцитов (%) в контрольной группе

Индуктор агрегации	Тип реакции тромбоцитов	
	Высокая агрегация Группа А (n=22) (ДИ 63,0%-100,0%)	Низкая агрегация Группа Б (n=5) (ДИ 0,00-25,00%)
Коллаген	93,0±6,6	9,2±6,1***
АДФ	93,0±6,9	53,0±24,3
АТФ	57,4±6,0	27,0±24,3

Примечание: * - достоверность межгрупповых различий $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

Таблица 2

Параметры агрегации тромбоцитов (%) в группе больных с язвенными кровотечениями

Лиганд	Тип реакции тромбоцитов	
	Высокая агрегация Группа А (n=8) (ДИ=57-100%)	Низкая агрегация Группа Б (n=28) (ДИ=0-18%)
Коллаген	80,3±7,6	2,0±1,7***
АДФ	43,0±17,1	18,0±10,7
АТФ	52,1±17,4	13,5±8,4

Примечание: * - достоверность межгрупповых различий $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

Список литературы

1. Баринов Э.Ф. Морфологические предикторы рецидива кровотечения при язвах гастродуоденальной области / Э.Ф. Баринов, П.Г. Кондратенко, О.Н. Сулаева // Укр. журнал хірургії. – 2008. - №2. -- С. 25-30.
2. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики / Ю.Е. Лях, Г.В. Гурьянов, В.Н. Хоменко. – Д., 2006. – 211 с.
3. Brass L. Understanding and Evaluating Platelet Function / L. Brass // Hematology. – 2010. – Vol. 2010. – P. 387–396.
4. Harrison P. Assessment of platelet function in the laboratory / P. Harrison // Hamostaseologie. – 2009. – Vol. 29. – P. 25–31.
5. Jackson S. P. Signaling event underlying thrombus formation / S. P. Jackson, W. S. Nesbitt, S. Kulkarni // J. Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 1. – P. 1602–12.
6. Leslie M. Beyond clotting: the powers of platelets / M. Leslie // Science. – 2010. – Vol. 328. – P. 562–564.
7. Mezzano D. The level of laboratory testing required for diagnosis or exclusion of a platelet function disorder using platelet aggregation and secretion assays / D. Mezzano, T. Quiroga J. Pereira // Semin. Thromb. Hemost. – 2009. – Vol. 35. – P. 242–254.
8. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors / S. Offermanns // Circ. Res. – 2006. – Vol. 99. – P. 1293–1304.
9. Szabo D. Calcium signaling in platelets / D. Varga-Szabo, A. Braun, B. Nieswandt // J. Thromb. Haemost. – 2009. – Vol. 7. – P. 1057–1066.
10. Williams M. S. Genetic Regulation of Platelet Receptor Expression and Function: Application in Clinical Practice and Drug Development / M. S. Williams, E. J. Weiss, M. S. Sabatine // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2010. – Vol. 30. – P. 2372–2384.

УДК 616-002.44/.45-005.1+612.398.195+612.111.7]-036.87-036

РЕАКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ НА КОЛЛАГЕН И ПУРИНЫ – ОТ ТРАКТОВКИ МЕХАНИЗМОВ АГРЕГАЦИИ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ РЕЦИДИВА ЯЗВЕННОГО КРОВОТЕЧЕНИЯ

Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Делий В.Ю.

Резюме. С целью установления закономерностей ответа тромбоцитов на коллаген и пурины проведена оценка индуцированной агрегации тромбоцитов у 36 больных с кровотечениями из язв гастродуоденальной зоны. Установлено, что сохранение агрегационного ответа тромбоцитов на коллаген, независимо от эффектов пуринов, ассоциировано с эндоскопическими признаками стабильного гемостаза и благоприятным течением репаративного процесса. Комбинация низкого ответа тромбоцитов на коллаген и пурины было ассоциировано с увеличением риска развития рецидивов кровотечения.

Ключевые слова: язвенные кровотечения, агрегация тромбоцитов, коллаген, пурины.

УДК 616-002.44/.45-005.1+612.398.195+612.111.7]-036.87-036

РЕАКЦІЯ ТРОМБОЦИТІВ НА КОЛАГЕН І ПУРИНИ - ВІД ТРАКТУВАННЯ МЕХАНІЗМІВ АГРЕГАЦІЇ ДО ПРОГНОЗУВАННЯ РЕЦИДИВУ ВИРАЗКОВОЇ КРОВОТЕЧІ

Барінов Е.Ф., Сулаєва О.М., Делій В.Ю.

Резюме. З метою встановлення закономірностей відповіді тромбоцитів на колаген і визначення ролі пуринів в її реалізації проведена оцінка індукованої агрегації тромбоцитів 36 хворих з кровотечами з виразок гастродуоденальної зони. Встановлено, що збереження агрегаційної відповіді тромбоцитів на колаген, незалежно від ефектів пуринів, асоційоване з ендоскопічними ознаками стабільного гемостазу і сприятливим перебігом репаративного процесу. Комбінація низької відповіді тромбоцитів на колаген і пурини була асоційована із зростанням ризику рецидиву кровотечі.

Ключові слова: виразкові кровотечі, агрегація тромбоцитів, колаген, пурини.

UDC 616-002.44/.45-005.1+612.398.195+612.111.7]-036.87-036

Platelet Reaction Of Collagen And Purines – From Interpretation Of Aggregation Mechanisms To Prognosis Of Rebleeding

Barinov E.F., Sulaieva O.N., Deliy V.Y.

Summary. To investigate the dependence of platelet response on collagen and the role of purines in its realization the analysis of induced platelet aggregation in 36 patients with gastric and duodenal ulcer bleeding was performed. It was shown that high platelet response on collagen was associated with characteristic of endoscopic stable hemostasis and reparation of ulcers independently of purine effects. Combination of low platelet response on collagen and purines was associated with increase of rebleeding risk.

Key words: ulcer bleeding, platelet aggregation, collagen, purines.

Стаття надійшла 23.03.2012 р.

Рецензент – проф. Костенко В.О.