

DIELECTRIC CHARACTERISTICS OF BLOOD AND BLOOD COMPONENTS IN STABLE STENOCARDIA PATIENTS BEFORE AND AFTER AORTOCORONARY SHUNTING AND ITS ASSOCIATION WITH ADP-DEPENDENT THROMBOCYTES AGGREGATION

A.A. Kosinova¹, A.V. Kovalev², I.Y. Grinshtein¹, V.G. Soukhovolsky², Y.I. Grinshtein¹

¹Krasnoyarsk State Medical University named after prof. Voino-Yasenetsky;

²Krasnoyarsk Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.

The aim of the research. *To study dielectric properties of blood and its components in patients with stable stenocardia before aortocoronary shunting and after operation to reveal its connection with the ADP-dependent thrombocytes aggregation.*

Materials and methods. *In 36 patients with stable stenocardia of II-III functional class (FC) were studied the dielectric properties of red blood cells, platelets, plasma and whole blood in the original Fourier spectrometer, was defined their relationship with the ADP-induced platelet aggregation.*

Results. *Were defined dielectric properties of blood, plasma, thrombocytes and red blood cells in patients with stable stenocardia before and after aortocoronary shunting by Fourier spectrometry. There are significant differences between the groups of patients with low and normal aggregation before surgery on Cole parameters for thrombocytes.*

Conclusion. *Dielectric characteristics of thrombocytes are correlated with the level of ADP-dependent thrombocytes aggregation.*

Key words: *blood, erythrocytes, thrombocytes, dielectric properties, stenocardia.*

Введение

Актуальной остается проблема ранних и поздних тромбозов венозных и маммарных шунтов, неблагоприятных тромботических событий после коронарного шунтирования. В большом исследовании D. Gasevic et al., включавшем 6416 пациентов после острого инфаркта миокарда (ОИМ) и реваскуляризации, среди тех, кому было сделано коронарное шунтирование по поводу ОИМ, на 30-е сутки умерло 4,7% китайских, 2,2% южноазиатских и 4,1% белокожих пациентов. Отсроченная смерть наблюдалась в 0, 30 и 21 случае на 1000 пациентов/лет у китайских, южноазиатских и белокожих пациентов, соответственно [7].

Недостаточный уровень подавления тромбоцитов на лечении аспирином и клопидогрелом, определяемый высокой реактивностью тромбоцитов (ВРТ), является одним из факторов риска возникновения тромботических событий. [4] ВРТ, несмотря на прием клопидогрела, обнаружена у 30% западной популяции и зависит от различных клинических, фармакологических и генетических факторов [5]. Несмотря на терапию аспирином в 9-22% [2,8,9] случаев наблюдается аспиринарезистентность, определенная методом оптической агрегатометрии. Но до сих пор нет однозначного мнения о необходимости применения тестов агрегационной активности в выявлении пациентов высокого риска тромбозов и индивидуализации терапии. [1] Это объясняется тем, что имеющиеся тесты не стандартизированы, результаты некоторых тестов не коррелируют между собой. Остается актуальным также поиск метода определения состояния тромбоцита у пациентов на дезагрегантной терапии и для понимания процессов происходящих в клетке, на мембране, в клеточном окружении, и для оценки эффекта антитромбоцитарной терапии и ее возможной коррекции.

Одним из методов, имеющим мощный потенциал в выявлении ряда важных биофизических свойств клетки и способного предоставить информацию о морфологии клеток, их физиологическом состоянии, жизнеспособности и идентичности через измерение емкости, проводимости мембран, цитоплазмы клеток и ее окружения является диэлектрическая спектроскопия. Большим преимуществом среди подобных методов обладает Фурье-спектроскопия, отличающаяся быстрым определением параметров биологического материала в широком диапазоне частот и автоматической обработкой полученных результатов. В настоящей работе рассматривается возможность применения метода Фурье-спектроскопии для оценки состояния клеток крови и их окружения до и после аортокоронарного шунтирования (АКШ) у пациентов со стабильной стенокардией.

Цель работы: изучить диэлектрические характеристики крови и ее компонентов у больных стабильной стенокардией до аортокоронарного шунтирования и после оперативного вмешательства и выявить ее связь с АДФ-зависимой агрегацией тромбоцитов

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находились 36 пациентов (мужчин) с II и III классом стенокардии напряжения согласно Канадской классификации (средний возраст $59 \pm 7,8$ лет), с атеросклеротическим поражением коронарных артерий, доказанных коронароангиографией. Всеми пациентами было подписано информированное согласие об участии в исследовании. Всем пациентам перед АКШ отменялись антиагреганты минимум за 5 суток. У пациентов забиралась кровь из кубитальной вены в объеме 8,0 мл в 2 пластиковых вакуумтейнера по 4 мл с 3,2% цитратом натрия. Образцы крови центрифугировались в течение 10 минут на 1000 оборотах. Из первого образца крови получали эритроцитарную взвесь (осадок со дна пробирки)

и отмытые тромбоциты по методу Е.А. Савченко с соавт., из второго изучалась цельная кровь (до центрифугирования) и плазма, богатая тромбоцитами (после центрифугирования в течение 10 минут на 1000 оборотах). Исследовались диэлектрические характеристики крови, плазмы крови, эритроцитов, тромбоцитов на диэлектрическом импульсном Фурье-спектрометре. Диэлектрические характеристики крови были описаны с помощью трех, так называемых, «коуловских» параметров (r_0 , x_0 , y_0). Часть плазмы, богатой тромбоцитами, а также плазму, бедную тромбоцитами (полученную центрифугированием крови при 3400 оборотах в течение 15 минут) использовали для измерения АДФ-зависимой (с 5 мМоль АДФ) агрегации тромбоцитов на агрегометре Chronolog 490-4D, США. У 26 пациентов АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов и диэлектрическая характеристика крови и ее компонентов измерена в 3 точках наблюдения (до аортокоронарного шунтирования, на 1-е сутки и на 10-е сутки после аортокоронарного шунтирования).

Для диэлектрических характеристик крови пациентов до оперативного лечения ($n=36$), имеющим нормальное распределение, представлены параметрические описательные статистики средние значения и стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Сравнительные статистики рассчитаны для 26 пациентов до и после АКШ по непараметрическим критериям.

Достоверность различий между парными выборками оценивали по непараметрическому критерию Уилкоксона, между двумя независимыми выборками по критерию Манна-Уитни. Для сравнения нескольких независимых выборок применяли ранговый дисперсионный анализ Крускала-Уоллиса. Связь признаков оценивалась по непараметрическому коэффициенту Спирмана. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics 17.0

Результаты и обсуждение

Исследование включает отдельный анализ диэлектрических свойств тромбоцитов, эритроцитов, плазмы крови и цельной крови до аортокоронарного шунтирования и после (на 1-е и 10-е сутки после операции) (табл. 1). При стабильной стенокардии напряжения II-III ФК диэлектрические характеристики крови и ее компонентов изменяются в достаточно малом диапазоне значений – коэффициент вариации 0,9%-11,13%.

Диэлектрические характеристики крови и ее компонентов значимо отличаются между собой ($p < 0,05$), кроме групп по диэлектрической активности плазмы и тромбоцитов. Так как наибольшими по

Таблица 1

Диэлектрические характеристики крови и ее компонентов до оперативного лечения ($n=36$)

Опытные образцы	Коуловские параметры	Значение диэлектрической активности, $M \pm m$	Коэффициент вариации, %
Кровь	r_0	$4,511 \pm 0,041$	0,906
	x_0	$1,923 \pm 0,017$	0,869
	y_0	$-1,384 \pm 0,012$	-0,875
Плазма	r_0	$4,105 \pm 0,098$	2,398
	x_0	$2,106 \pm 0,054$	2,558
	y_0	$-0,981 \pm 0,065$	-6,61
Тромбоциты	r_0	$4,117 \pm 0,119$	3,962
	x_0	$2,093 \pm 0,062$	2,968
	y_0	$-1,018 \pm 0,113$	-11,13
Эритроциты	r_0	$4,119 \pm 0,27$	6,566
	x_0	$1,984 \pm 0,144$	7,243
	y_0	$-1,488 \pm 0,086$	-5,768

размерам компонентами плазмы (после центрифугирования крови на 1000 оборотах в течение 10 минут) являются тромбоциты, то они и определяют в большей степени ее диэлектрические свойства (рис. 1).

Всем пациентам выполнялось аортокоронарное шунтирование в условиях искусственного кровообращения. Во время которого происходит гемодилюция, активация внутреннего и внешнего пути свертывания, системы комплемента, фибринолитической системы, тромбоцитов, лейкоцитов, растворимых белков. [6] Поэтому логичным было ожидание изменений в диэлектрических свойствах крови и ее компонентов до и после аортокоронарного шунтирования. Что нам удалось проследить для некоторых показателей диэлектрической активности эритроцитов, плазмы и тромбоцитов.

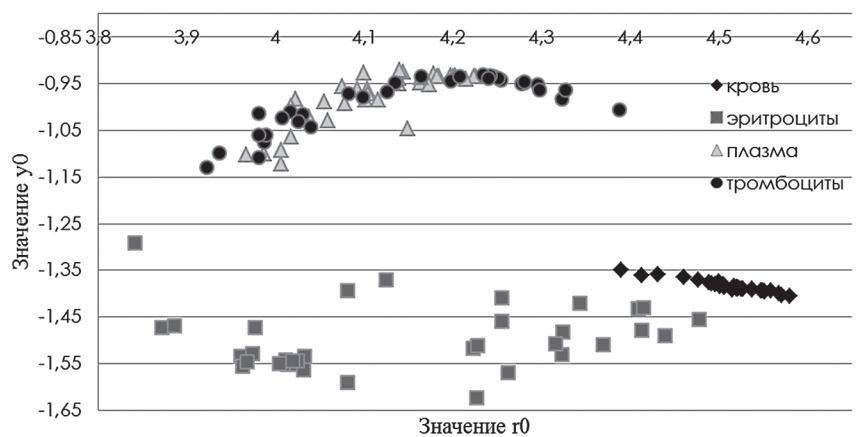


Рис. 1. Диэлектрические характеристики (r_0 , y_0) крови и ее компонентов до АКШ.

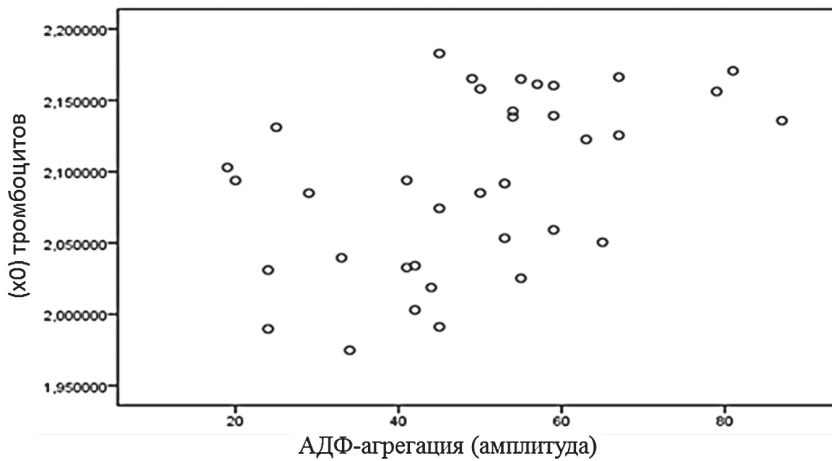


Рис. 2. Корреляция между x_0 тромбоцитов и АДФ-индуцированной агрегацией тромбоцитов. $R=0,473$; $p=0,002$ (для x_0 тромбоцитов).

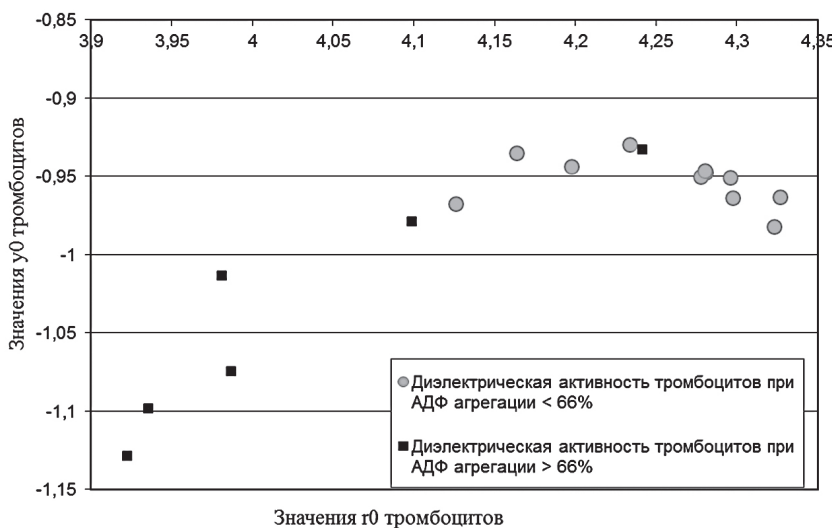


Рис. 3. Сравнение групп пациентов с низкой и нормальной АДФ-индуцированной агрегацией тромбоцитов по диэлектрической активности тромбоцитов до АКШ.

Значимыми были отличия в диэлектрических свойствах плазмы крови (значение γ_0) до и после АКШ ($p=0,007$ при сравнении показателей до и на 1-е сутки после АКШ; $p=0,029$ при сравнении показателей на 1-е и 10-е сутки после АКШ).

Также значимо менялись диэлектрические характеристики для γ_0 эритроцитов ($p=0,016$ для до операционных значение и на 10-е сутки после АКШ), x_0 эритроцитов ($p=0,000$ и $p=0,01$ на 1-е и 10-е сутки после АКШ и до операции и на 10-е сутки, соответственно), для y_0 тромбоцитов до и на 1-е сутки после АКШ ($p=0,049$).

Еще одним интересным наблюдением является то, что диэлектрические свойства тромбоцитов коррелируют с уровнем АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов до оперативного лечения (рис. 2): $R=0,473$; $p=0,002$ (для x_0 тромбоцитов), $r=0,383$; $p=0,013$ (для γ_0 тромбоцитов). Вероятно, *in vitro*, при выделении тромбоцитов для определения диэлектрических характеристик происходит активация

кровяных пластинок в зависимости от их начального состояния, что происходит и при АДФ-индуцированной активации тромбоцитов. При активации тромбоцитов, меняется структура их мембраны, появляется больше неровностей, выпячиваний, что изменяет их диэлектрическую активность. [3]. После АКШ подобной связи не прослеживается. Это может быть связано с влиянием многих причин: условиями искусственного кровообращения, интра- и послеоперационной терапией, сопутствующими состояниями, индивидуальным ответом организма на оперативное вмешательство.

Учитывая факт связи между диэлектрической активностью и АДФ-индуцированной агрегацией тромбоцитов, мы разделили пациентов на группы в зависимости от уровня АДФ-индуцированной агрегации по Вайсу. Группы пациентов с условно низкой (<66%) и нормальной (>66%) агрегацией тромбоцитов по Вайсу до аортокоронарного шунтирования имеют значимые отличия по x_0 , y_0 и γ_0 для тромбоцитов (рис. 3) ($p=0,003$, $0,001$, $0,031$ соответственно)

Заключение

Определены диэлектрические показатели крови, плазмы крови, тромбоцитов и эритроцитов у пациентов со стабильной стенокардией до и после аортокоронарного шунтирования Фурье-спектрометрией.

Имеются значимые отличия между группами пациентов с низкой и нормальной агрегацией до оперативного лечения по коуловским параметрам для тромбоцитов. Диэлектрические характеристики тромбоцитов коррелируют с уровнем АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов.

Литература

1. Гринштейн Ю.И., Косинова А.А., Гринштейн И.Ю. Контроль антитромбоцитарной терапии: кризис доверия или поиск новых решений? // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2013. – № 6. – С. 668-675.
2. Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Гринштейн И.Ю., Савченко Е.А. Особенности гемостаза, метаболической активности тромбоцитов и частота резистентности к аспирину у больных с хронической сердечной недостаточностью после аортокоронарного шунтирования // Кардиология. – 2008. – № 6. – С.51-56.

3. Косинова А.А., Ковалев А.В., Гринштейн Ю.И., Суховольский В.Г., Савченко А.А. Диэлектрические характеристики крови и ее компонентов у больных стабильной стенокардией // Сибирское медицинское обозрение. – 2013. – № 4. – С. 24-28.

4. Aradi D., Komócsi A., Vorobcsuk A., Rideg O., Tokés-Füzesi M., Magyarlaki T., Horváth I.G., Serebruany V.L. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis // *Am. Heart J.* – 2010. – Vol. 160, № 3. – P. 543-551.

5. Bonello L., Tantry U.S., Marcucci R., Blindt R., Angiolillo D.J., Becker R., Bhatt D.L., Cattaneo M., Collet J.P., Cuisset T., Gachet C., Montalescot G., Jennings L.K., Kereiakes D., Sibbing D., Trenk D., Van Werkum J.W., Paganelli F., Price M.J., Waksman R., Gurbel P.A. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate // *JACC.* – 2010. – Vol. 56, № 12. – P. 919-933.

6. Esper S.A., Subramaniam K., Tanaka K. A. Pathophysiology of Cardiopulmonary Bypass: Current Strategies for the Prevention and Treatment of Anemia, Coagulopathy, and Organ Dysfunction // *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia.* – 2014. – №18. – P. 161-176.

7. Gasevic D., Khan N.A., Qian H., Karim Sh., Simkus G., Quan H., Mackay M. H., O'Neill B. J., Ayyobi A. F. Outcomes following percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting surgery in Chinese, South Asian and white patients with acute myocardial infarction: administrative data analysis // *BMC Cardiovascular Disorders.* – 2013. – № 13. – P. 121.

8. Liu X.F., Cao J., Fan L., Liu L., Li J., Hu G.L., Hu Y.X., Li X.L. Prevalence of and risk factors for aspirin resistance in elderly patients with coronary artery disease // *J. Geriatr. Cardiol.* – 2013. – Vol. 10, № 1. – P. 21-27.

9. Ulehlova J., Slavik L., Krcova V., Hutyrá M, Galuszka J., Indrak K. The assessment of aspirin resistance by using light transmission and multiple electrode aggregometry // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2011. – Vol. 33, № 3. – P. 305-309.

References

1. Grinshtein Yu.I., Kosinova A.A., Grinshtein I.Yu. Monitoring of antithrombotic therapy: a crisis of confidence or new solutions? // *Rational Pharmacotherapy in Cardiology.* – 2013. – № 6. – P.668-675.

2. Grinshtein Yu.I., Savchenko A.A., Grinshtein I.Yu., Savchenko E.A. Features of hemostasis, thrombocytes metabolic activity and frequency of aspirin resistance in patients with chronic heart failure after aortocoronary shunting // *Cardiology.* – 2008. – № 6. – P.51-56.

3. Kosinova A.A., Kovalev A.V., Grinshtein Yu.I., Sukhovol'skiy V.G., Savchenko A.A. Dielectric properties of blood and its components in patients with stable stenocardia // *Siberian Medical Review.* – 2013. – № 4. – P. 24-28.

4. Aradi D., Komócsi A., Vorobcsuk A., Rideg O., Tokés-Füzesi M., Magyarlaki T., Horváth I.G., Serebruany V.L. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis // *Am. Heart J.* – 2010. – Vol. 160, № 3. – P. 543-551.

5. Bonello L., Tantry U.S., Marcucci R., Blindt R., Angiolillo D.J., Becker R., Bhatt D.L., Cattaneo M., Collet J.P., Cuisset T., Gachet C., Montalescot G., Jennings L.K., Kereiakes D., Sibbing D., Trenk D., Van Werkum J.W., Paganelli F., Price M.J., Waksman R., Gurbel P.A. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate // *JACC.* – 2010. – Vol. 56, № 12. – P. 919-933.

6. Esper S.A., Subramaniam K., Tanaka K. A. Pathophysiology of Cardiopulmonary Bypass: Current Strategies for the Prevention and Treatment of Anemia, Coagulopathy, and Organ Dysfunction // *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia.* – 2014. – №18. – P. 161-176.

7. Gasevic D., Khan N.A., Qian H., Karim Sh., Simkus G., Quan H., Mackay M. H., O'Neill B. J., Ayyobi A. F. Outcomes following percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting surgery in Chinese, South Asian and white patients with acute myocardial infarction: administrative data analysis // *BMC Cardiovascular Disorders.* – 2013. – № 13. – P. 121.

8. Liu X.F., Cao J., Fan L., Liu L., Li J., Hu G.L., Hu Y.X., Li X.L. Prevalence of and risk factors for aspirin resistance in elderly patients with coronary artery disease // *J. Geriatr. Cardiol.* – 2013. – Vol.10, № 1. – P. 21-27.

9. Ulehlova J., Slavik L., Krcova V., Hutyrá M, Galuszka J., Indrak K. The assessment of aspirin resistance by using light transmission and multiple electrode aggregometry // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2011. – Vol. 33, № 3. – P. 305-309.

Сведения об авторах

Косинова Александра Александровна – аспирант кафедры терапии ИПО, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391)2276892, e-mail: tarskihaa@mail.ru.

Ковалев Антон Владимирович – кандидат технических наук, ФГБУН Красноярский научный центр СО РАН.

Адрес: 660036, Красноярск, ул. Академгородок, г. 50/38; тел. 8(391) 2431448; e-mail: sunhi@nm.ru.

Гринштейн Игорь Юрьевич – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры поликлинической терапии, семейной медицины и ЗОЖ с курсом ПО, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2642718; e-mail: grinst@rambler.ru.

Суховольский Владислав Григорьевич – доктор медицинских наук, ФГБУН Красноярский научный центр СО РАН.

Адрес: 660036, Красноярск, ул. Академгородок, г.50/38; тел. 8(391) 2217472; e-mail: soukhovolsky@nm.ru.

Гринштейн Юрий Исаевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой терапии ИПО, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2642718; e-mail: grinstein.yi@mail.ru.