

**Т.Е. Сусллова, О.В. Груздева, С.В. Кремено,
О.А. Кошельская, Е.А. Левашкина,
Н.М. Желтоногова, О.К. Кузьмина,
И.В. Кологривова**

E-mail: tes@cardio.tsu.ru

АГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

ГУ НИИ кардиологии Томского научного центра
СО РАМН

ВВЕДЕНИЕ

Инсулинорезистентность, артериальная гипертензия, дислипидемия, объединенные рамками метаболического синдрома, приводят к высокому риску развития атеросклеротических повреждений сосудов и сопровождаются изменением коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза [1, 2, 3]. Механизмы участия тромбоцитов в атерогенезе до конца не изучены, однако результаты экспериментальных работ свидетельствуют об участии этих клеток в активном захвате липидов крови с последующим быстрым образованием тромбоцитарных агрегатов [4]. Активированные тромбоциты выделяют биологически активные вещества (гистамин, серотонин, адреналин, тромбоксан), которые увеличивают проницаемость эндотелия, способствуя отложению липидов в сосудистой стенке [4]. Тромбоцитарные агрегаты составляют основу первичного пристеночного тромба, образование которого может привести к развитию нестабильной стенокардии, а его увеличение и укрепление нитями фибрина – к полной окклюзии сосуда и развитию инфаркта миокарда [5,6].

Метаболические нарушения, сопровождающие синдром инсулинорезистентности, возможно, оказывают влияние на функциональную активность тромбоцитов. Так, в литературе существуют экспериментальные данные о влиянии инсулина на агрегационную способность тромбоцитов [7]. Показано, что гипергликемия приводит к повышению АДФ- и тромбин-индуцированной агрегации тромбоцитов [8]. Между тем данных о взаимосвязи между метаболическими нарушениями, сопровождающими сердечно-сосудистые заболевания, и изменением агрегационной активности тромбоцитов имеется недостаточно.

Цель работы: исследовать агрегационную активность тромбоцитов и ее связь с биохимическими маркерами метаболического сердечно-сосудистого синдрома.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 25 больных (11 женщин и 14 мужчин в возрасте от 44 до 62 лет) с сочетанием хронической ишемической болезни сердца (стенокардия напряжения, функциональный класс II-III) и гипертонической болезни II стадии и наличием метаболического синдрома, диагностированного по критериям NCEP ATP III, 2001 г. Клинический диагноз верифицировали с помощью клинико-лабораторных методов исследования на базе отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца ГУ НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН. Время с момента подтверждения диагноза ишемическая болезнь сердца составило 5 ± 1 год, длительность течения АГ – 10 ± 2 года. Индекс массы тела равнялся $31,0 \pm 1,7$ кг/м². Среднесуточное колебание АД составило $148 \pm 9,82 / 95 \pm 2,35$ мм рт. ст. Контрольную группу составили 16 практически здоровых доноров. Пациенты и здоровые доноры были сопоставимы по основным клиническим данным (возрасту, полу). Забор крови из локтевой вены осуществлялся утром натощак после 12-часового голодания и через 2 часа после завтрака. Определение базального и постпрандиального (через 2 часа после завтрака) уровня глюкозы в сыворотке крови проводили с использованием наборов «Bioscon», Germany. Содержание общего холестерина (ОХС) и триацилглицеролов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) в сыворотке крови определяли с помощью наборов той же фирмы. Содержание холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) рассчитывали по формуле W. Friedwald (1972). Рассчитывали индекс атерогенности как отношение ХС ЛПНП / ХС ЛПВП. Концентрацию инсулина и С-пептида измеряли иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы DSL (США). Исследование агрегационной активности тромбоцитов проводили на двухканальном анализаторе (НПФ «Биола») с одновременной регистрацией светопропускания и средних размеров агрегатов в богатой тромбоцитами плазме [9]. Для индукции агрегации использовали АДФ в разведениях 1,25; 2,5 и 5 мкг/мл и адреналин в концентрации 2,5 и 5 мкг/мл. Оценивали следующие параметры агрегации: степень и скорость агрегации по кривой светопропускания и кривой среднего размера агрегатов.

Статистический анализ проводили с помощью непараметрических критериев. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании спонтанной агрегации тромбоцитов не было выявлено различий между группами больных и здоровых доноров. При исследовании АДФ и адреналин-индуцированной агрегации в группе больных было установлено статистически значимое

увеличение степени агрегации по кривой светопропускания, индуцированной 5 мкг/мл АДФ ($p=0,04$), и повышение скорости агрегации тромбоцитов по кривой светопропускания, индуцированной 1,25 мкг/мл АДФ ($p=0,02$) по сравнению со здоровыми донорами (табл. 1). В обеих группах при увеличении концентрации АДФ происходило повышение степени и скорости агрегации тромбоцитов по кривой светопропускания, однако статистически значимые различия наблюдались только в группе больных. У больных также наблюдалась различная агрегационная активность тромбоцитов по кривой среднего размера агрегатов при варьировании концентрации АДФ. Так, происходило повышение степени агрегации по кривой среднего размера агрегатов при низких значениях АДФ. Также в группе больных наблюдалась тенденция к повышению скорости агрегации по кривой среднего размера агрегатов при снижении концентрации АДФ. Известно, что АДФ является одним из сильных индукторов агрегации тромбоцитов и выделяется из секреторных гранул тромбоцитов на стадии начальной активации под воздействием коллагена и тромбина [10, 11, 12]. При связывании АДФ с рецепторами тромбоцитов увеличивается концентрация ионов кальция в цитоплазме клеток, изменяется их форма, что сопровождается ингибированием аденилатциклазы [11, 12]. Реализация метаболических эффектов активации АДФ-рецепторов тромбоцитов осуществляется через сопряжение с мембранным G-протеином. Конечным

патофизиологическим эффектом стимуляции тромбоцитов молекулами АДФ является активация тромбоцитарного гликопротеинового комплекса Pb/IIIa , являющегося рецептором фибриногена, что создает условия для соединения фибриногена и тромбоцитов [11, 12, 13]. Из активированных тромбоцитов высвобождается еще больше АДФ, что обеспечивает рост тромбоцитарного тромба.

Выявленная нами повышенная агрегационная активность тромбоцитов при высоких концентрациях АДФ в группе обследованных пациентов по сравнению с группой здоровых доноров может иметь важное клиническое значение, так как в зоне повреждения сосуда создаются высокие концентрации данного индуктора, стимулирующие соседние неактивные форменные элементы крови (феномен “снежного кома”), что в свою очередь может повышать риск тромбообразования.

В группе больных с метаболическим синдромом было выявлено увеличение степени адреналин-индуцированной (5 мкг/мл) агрегации по кривым светопропускания и среднего размера агрегатов по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 2). При увеличении концентрации индуктора в группе больных также отмечалось повышение скорости агрегации как по кривой светопропускания, так и по кривой среднего размера агрегатов, однако оно не было статистически достоверным. Известно, что адреналин стимулирует альфа₂-адренорецепторы тромбоцитов в процессе агрегации, приводит к снижению внутриклеточного

Таблица 1

Параметры АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов с сочетанием хронической ишемической болезни сердца и метаболического синдрома и у здоровых доноров при разных концентрациях индуктора ($M \pm m$)

Показатель	Группы обследованных					
	Здоровые доноры (n=16)			Пациенты (n=25)		
	АДФ 1,25мкг/мл	АДФ 2,5 мкг/мл	АДФ 5 мкг/мл	АДФ 1,25мкг/мл	АДФ 2,5 мкг/мл	АДФ 5 мкг/мл
Степень агрегации по кривой среднего размера агрегатов, отн. ед.	5,37±0,85	4,48±0,61	3,72±0,62	4,97±0,46	5,01±0,49	4,51±0,44
Степень агрегации по кривой светопропускания, %	22,25±4,63	44,48±5,13	56,58±2,28	34,79±5,94	59,31±4,85	70,77±3,89 $p = 0,04$
Скорость агрегации по кривой среднего размера агрегатов, отн. ед./мин	14,36±2,55	16,18±3,87	11,34±2,07	17,85±6,28	13,17±1,42	12,22±1,42
Скорость агрегации по кривой светопропускания, %/мин	28,33±1,48	58,28±6,21	68,80±8,88	48,74±5,70 $p = 0,02$	67,52±6,55	74,96±6,28

Примечание:

n – число обследованных;

p – достигнутый уровень значимости критерия различий в сравнении с группой здоровых.

Параметры адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов с сочетанием хронической ишемической болезни сердца и метаболического синдрома и у здоровых доноров при разных концентрациях индуктора ($M \pm m$)

Показатель	Группы обследованных			
	Здоровые доноры (n = 16)		Пациенты (n = 25)	
	адреналин 2,5 мкг/мл	адреналин 5 мкг/мл	адреналин 2,5 мкг/мл	адреналин 5 мкг/мл
Степень агрегации по кривой среднего размера агрегатов, отн. ед.	3,65±0,76	2,76±0,29	3,19±0,32	3,84±0,37 p = 0,04
Степень агрегации по кривой светопропускания, %	36,36±7,99	29,54±7,58	38,71±7,9	43,90±7,91 p=0,03
Скорость агрегации по кривой среднего размера агрегатов, отн. ед./мин	3,50±1,11	3,11±0,7	2,49±0,34	4,44±0,76
Скорость агрегации по кривой светопропускания, %/мин	25,62±5,32	19,96±5,01	24,03±4,95	32,44±6,79

Примечание:

n – число обследованных;

p – достигнутый уровень значимости критерия различий в сравнении с группой здоровых.

цАМФ и повышает проницаемость мембран тромбоцитов для внеклеточного кальция [10]. Кроме того, для реализации адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов необходимо связывание внеклеточного фибриногена со специфическими индуцибельными рецепторами плазматической мембраны. Поскольку состояние инсулинорезистентности ассоциируется с активацией симпатико-адреналовой системы [14], возрастание параметров адреналин-индуцированной агрегации может увеличивать риск внутрисосудистой агрегации тромбоцитов у пациентов с метаболическим синдромом. В последние годы выявлено новое свойство адреналина – его способность вызывать так называемую мембранную модуляцию, т.е. восстановление чувствительности мембраны после того как они стали рефрактерными к повторному действию агониста или нечувствительными в результате действия дезагрегантов [10]. Данным свойством адреналина объясняют нередкую неэффективность дезагрегантной терапии, проводимой в ситуациях, при которых в циркулирующей крови повышен уровень катехоламинов.

У обследованных больных были выявлены следующие биохимические маркеры метаболического синдрома: дислипидемия, которая характеризовалась повышением уровня триацилглицеролов, холестерина липопротеинов низкой плотности, общего холестерина, индекса атерогенности, а также снижением уровня холестерина липопротеинов высокой плотности; повышение постпрандиального уровня глюкозы; увеличение базального и постпрандиального уровня инсулина и С-пептида (табл. 3).

С помощью корреляционного анализа в группе обследованных больных были выявлены зависимости между параметрами АДФ- и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов и биохимическими маркерами метаболического сердечно-сосудистого

синдрома. Так, установлена отрицательная зависимость между уровнем ХС ЛПВП и степенью АДФ – индуцированной (1,25 мкг/мл) агрегации по кривой среднего размера агрегатов ($-0,61$, $p=0,03$). Возможно, нарушение обмена липопротеинов способствует изменению функциональной активности тромбоцитов, в частности за счет перестройки липидной структуры мембраны тромбоцитов, что сопровождается усилением их способности отвечать на индукторы агрегации. В группе больных нами обнаружено, что степень АДФ – индуцированной (1,25 мкг/мл) агрегации по кривой светопропускания прямо связана с постпрандиальным уровнем инсулина ($0,79$, $p=0,004$), а также имеет тенденцию прямой связи с базальным уровнем инсулина ($0,5$, $p=0,08$). Установлена прямая зависимость между постпрандиальным уровнем инсулина и скоростью АДФ – индуцированной агрегации (1,25 мкг/мл) по кривой светопропускания ($0,76$, $p=0,006$). Взаимосвязи между уровнем инсулина и параметрами адреналин-индуцированной агрегации обнаружено не было. Обнаружено, что базальный и постпрандиальный уровень С-пептида прямо связан со скоростью АДФ – индуцированной (1,25 мкг/мл) агрегации по кривой светопропускания ($0,55$, $p=0,05$ и $0,73$, $p=0,01$). Кроме того, постпрандиальный уровень С-пептида имел прямую связь со степенью АДФ – индуцированной (1,25 мкг/мл) агрегации по кривой светопропускания ($0,63$, $p=0,03$). Известно, что у здоровых людей инсулин в физиологических концентрациях снижает чувствительность тромбоцитов к индукторам агрегации (АДФ, коллаген, тромбоцит-активирующий фактор) [15]. Реализация антиагрегационных эффектов инсулина может осуществляться с помощью различных механизмов. Согласно данным Kahn N.N. и соавт., инсулин в физиологических концентрациях регулирует функцию тромбоцитов через увеличе-

Таблица 3

**Содержание С-пептида, инсулина, глюкозы
и гликозилированного гемоглобина у пациентов
с сочетанием хронической ишемической болезни
сердца и метаболического синдрома
и у здоровых доноров (М±m)**

Показатели	Пациенты (n = 25)	Здоровые доноры (n = 16)
Инсулин (базальный уровень), пмоль/л,	91,97±3,44 p=0,012	53,82±13,21
Инсулин (постприандиальный уровень), пмоль/л	418,37±19,8 p=0,038	150,13±14,24
С-пептид (базальный уровень), пмоль/л	672,436±57,7 p=0,0054	416,93±51,0
С-пептид (постприандиальный уровень), пмоль/л	1453,355±22,8 p=0,041	817,05±17,17
Глюкоза (базальный уровень), ммоль/л	4,57±0,2	4,1±0,17
Глюкоза (постприандиальный уровень), ммоль/л	5,71±0,36 p=0,0035	3,56±0,25
Общий холестерол, ммоль/л	5,0±0,3 p=0,045	5,98±0,2
Холестерол ЛПНП, ммоль/л	2,87±0,36 p=0,005	3,8±0,25
Холестерол ЛПВП, ммоль/л	1,6±0,07 p=0,012	1,24±0,14
Триацилглицеролы, ммоль/л	1,24±0,09 p=0,016	2,04±0,13
Индекс атерогенности	1,82±0,33 p=0,0124	3,69±0,33

Примечание:

n – число обследованных;

p – достигнутый уровень значимости критерия различий в сравнении с группой здоровых.

ние уровня циклической АМФ и стимулирование связывания тромбоцитов с простагландином E_1 , что приводит к ингибированию агрегационной активности тромбоцитов [16]. Известно также, что антиагрегационные эффекты инсулина могут быть связаны и с NO-индуцированным повышением уровня цГМФ в тромбоцитах, однако этот эффект отсутствует при инсулинорезистентных состояниях. По данным Westergaard J. и соавт., инсулин у больных с ожирением в меньшей степени, чем у здоровых людей, ингибировал агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами (АДФ, адреналин и т.д.) [17]. Определенное значение в изменении активности тромбоцитов при инсулинорезистентных состояниях могут также иметь провоспалительные цитокины, в частности фактор

некроза опухоли α , который снижает чувствительность клеточных рецепторов к инсулину и вызывает экспрессию молекул адгезии [18]. Выявленное нами изменение чувствительности тромбоцитов к индукторам агрегации в условиях гиперинсулинемии может быть одним из механизмов, объединяющих инсулинорезистентность и атеротромбоз.

Таким образом, изменение метаболического фона (дислипидемия, гипергликемия, гиперинсулинемия) способствует увеличению агрегационной активности тромбоцитов, что повышает риск тромбообразования и обуславливает возникновение сердечно-сосудистых осложнений при метаболическом синдроме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алмазов В. А. Метаболический сердечно – сосудистый синдром. / В.А. Алмазов, Я.В. Благосклонная, Я.В. Шляхто. – СПб. : Изд – во СПб. ГМУ, 1999. – 208 с.
2. Громнацкий Н. И. Коррекция тромбоцитарного гемостаза, нарушения толерантности к глюкозе, дислипидемии и перекисного окисления липидов у больных метаболическим синдромом / Н. И. Громнацкий, И. Н. Медведев. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2004. – № 1. – С. 10 – 15.
3. Нарушение плазменно – тромбоцитарного звена гемостаза у больных с сочетанием артериальной гипертензии и дислипидемии / М. Ю. Жук, В. А. Метельская, Н. В. Перова и др. // Российский кардиологический журнал. – 2003. – № 5. – С. 11 – 17.
4. Willigen G. , Gorter G. , Akkerman J. W. LDLs increase the exposure of fibrinogen binding sites on platelets and secretion of dense granules / G. Willigen, G. Gorter, J. W. Akkerman // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1994. – Vol. 14. – P. 41 – 46.
5. Bhatt D.L. Antiplatelet and anticoagulant therapy in the secondary prevention of ischemic heart disease / D.L. Bhatt, E.J. Topol // Med. Clin. North. Am. – 2000. – Vol. 84, № 1. – 163-179.
6. Bhatt D. L. , Topol E. J. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy / D. L. Bhatt, E. J. Topol // Nat. Rev. Drug. Discov. – 2003. – Vol. 2, № 1. – P. 15 – 28.
7. Insulin directly reduces platelet sensitivity to aggregating agents. Studies in vitro and in vivo / M. Trovati, G. Anfossi, F. Cavalot et. al. // Diabetes. – 1988. – Vol. 37, № 6. – P. 780 – 786.
8. Acute hyperglycaemia enhances platelet activation : involvement of multiple mechanisms / N. Li, D. Sudic, M. Forslund, M. Razmara // Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). – 2004. – Vol. 104 : Abstract 3884.
9. Born G. V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G. V. Born // Nature. – 1962. – Vol. 194, № 6. – P. 927 – 929.
10. Шитикова А. С. Тромбоцитарный гемостаз / А. С. Шитикова. – СПб. – 2000. – 227 с.
11. Kroll M. H. , Schafer A. I. Biochemical mechanisms of platelet activation / M. H. Kroll, A. I. Schafer // Blood. – 1989. – Vol. 74. – P. 1181-1195.
12. Rupprecht H. J. Adenosine diphosphate receptor antagonists: from pharmacology to clinical practice / H. J. Rupprecht // Europ. Heart J. – 2000. – Vol. 2 (Suppl. E). – P. 1 – 5.

13. Savi P., Herbert J. ADP receptors on platelets and ADP – selective antiaggregating agents / P. Savi, J. Herbert // Medical Research reviews. – 1996. – Vol. 16, № 2. – P. 159 – 179.
14. Reaven, G.M. Hypertension and associated metabolic abnormalities – the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system / G.M. Reaven, H. Lithell, L. Landsberg // N. Engl. J. Med. – 1996. – Vol. 334. – P. 374-381.
15. Insulin directly reduces platelet sensitivity to aggregating agents. Studies in vitro and in vivo / M. Trovati, G. Anfossi, F. Cavalot et. al. // Diabetes. – 1988. – Vol. 37, № 6. – P. 780 – 786.
16. Kahn N.N. Restoration by insulin of impaired prostaglandin E1/I2 receptor activity of platelets in acute ischemic heart disease / N.N. Kahn, H.S. Mueller, A.K. Sinha // Circ. Res. – 1991. – Vol. 68, № 6. – P. 245 – 254.
17. Westerbacka J. Inhibition of platelet-collagen interaction: an in vivo action of insulin abolished by insulin resistance in obesity / J. Westerbacka, H. Yki-Järvinen, A. Turpeinen et. al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. . – 2002. – Vol. 22, № 1. – P. 167-172.
18. Fernandez-Real J. M. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome / J. M. Fernandez-Real, T.W. Ricard // Endocrine Reviews.- 2003.- Vol. 24, №.3. – P. 278–301.

AGGREGATION ACTIVITY OF THROMBOCYTES AND BIOCHEMICAL MARKERS OF METABOLIC SYNDROME

**T.Ye. Souslova, O.V. Grouzdeva, S.V. Kremeno,
O.A. Kosheľ'skaya, Ye.A. Levashkina,
N.M. Zheltonogova, O.K. Kouzmina,
I.V. Kologrivova**

SUMMARY

ADF- and adrenalin-induced aggregation activity of thrombocytes was revealed to be increased in patients having chronic ischemic heart disease combined with metabolic syndrome compared to healthy donors. Close correlation links were established between aggregation activity parameters and basal and postprandial level of C-peptide and insulin as well as between levels of cholesterol and high density lipoproteides. Changed metabolic level contributes to changed aggregation activity of thrombocytes which might be one of the mechanisms of cardiovascular complications of metabolic syndrome.