

© СМЕРТИНА Е.Г., ПЕТРОВА М.М., ИОНОВА В.Г., ТАНАШЯН М.М., ХАЛО Н.В.,
ШИМОХИНА
Н.Ю.

**СОСТОЯНИЕ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ И АГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ
ТРОМБОЦИТОВ В ОСТРОМ И РАННЕМ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ
ПЕРИОДАХ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА**

Е.Г. Смертина, М.М. Петрова, В.Г. Ионова, М.М. Танашян, Н.В. Хало, Н.Ю. Шимохина
Красноярская государственная медицинская академия им. В.Ф. Войно-Ясенецкого, ректор
– д.м.н., проф. И.П. Артюхов; Городская больница №6 им. Н.С. Карповича, гл. врач –
к.м.н. А.М. Чихачев, ГУ НИИ неврологии РАМН, директор – д.м.н., проф. З.А. Суслина.

***Резюме.** У пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), в остром и раннем восстановительном периодах выявлено стойкое повышение в крови маркеров эндотелиальной дисфункции при выраженном снижении реактивности эндотелия. При условии совместного рассмотрения различных индукторов появляется возможность выявления «аномальной» агрегации тромбоцитов, свидетельствующей о степени нарушения компенсации в условиях длительно существующей эндотелиальной дисфункции. Подтверждена более высокая диагностическая значимость использования низких доз индукторов агрегации (0,1 мкМ АДФ).*

***Ключевые слова:** ишемический инсульт, фактор Виллебранда, эндотелиальная дисфункция, агрегация тромбоцитов.*

Артериальная гипертензия (АГ) и атеросклероз являются основными факторами риска развития инсульта. Ключевая роль в патогенезе данных заболеваний принадлежит нарушению функции эндотелия сосудов и вазоактивным эндотелиальным факторам. Изменения сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, наблюдающиеся в течение острого периода ОНМК, являются одним из универсальных факторов патогенеза ишемического инсульта (ИИ) (5).

Повреждение целостности сосудистой стенки вызывает целый ряд последовательных реакций активации сосудистой стенки, кровяных пластинок и факторов свертывания крови, направленных на формирование в месте повреждения стабильного тромбоцитарно-фибринового сгустка. Участие тромбоцитов в гемостазе представлено способностью к закономерным, последовательным превращениям – адгезии, агрегации и реакции высвобождения.

Вырабатывая различные биологически активные вещества, эндотелий принимает непосредственное участие в поддержании сосудистого тонуса, регуляции адгезии и агрегации тромбоцитов, проявляет про- и антикоагулянтную, фибринолитическую активность, участвует в процессах воспаления и ангиогенеза. Особого внимания заслуживает исследование дисфункции эндотелия, которая может в значительной степени влиять на показатели плазменного и тромбоцитарного звена системы гемостаза. В широком смысле эндотелиальная дисфункция может быть определена как неадекватное (увеличенное или сниженное) образование в эндотелии различных биологически активных веществ (4).

Фактор Виллебранда (VWF) является одним из наиболее важных маркеров, отражающим нарушение функции эндотелия, его уровень в плазме может иметь существенное клиническое значение в прогнозе развития первичного и повторного ИИ (9, 10, 15, 17, 20). Показано, что повышенный уровень vWF является фактором риска развития кардиоэмболического инсульта. Повышение уровня vWF в плазме крови может быть использовано, как дополнительный диагностический критерий при определении показаний к применению терапии варфарином у пациентов с фибрилляцией предсердий, особенно со средней степенью риска (17).

Для оценки функциональной активности эндотелия применяются различные провокационные пробы, в частности, манжеточная проба (МП), с кратковременной ишемией тканей плеча. При этом в пробах, взятых из кубитальной вены до и после теста, изучаются показатели, отражающие функции эндотелия. Оценке изменения уровня фактора Виллебранда (vWF) до и после МП посвящены единичные работы. Показано, что при начальных проявлениях и выраженной дисфункции снижается выброс vWF в результате его активации (2).

В остром периоде ИИ обнаружены признаки активации тромбоцитов. Сохранение стойкой активации тромбоцитов через 3 месяца ассоциируется с развитием повторного инсульта (12).

Целью настоящего исследования были оценка степени эндотелиальной дисфункции по результатам манжеточной пробы в различные периоды ОНМК, а также агрегационной активности тромбоцитов и выявление «аномальной» агрегации с применением высоких и низких доз индукторов.

Материалы и методы

Обследовано 57 пациентов в остром периоде ИИ (средний возраст $56,3 \pm 0,9$ лет, 35 мужчин и 22 – женщины). В первые 24 часа после развития симптоматики и через 14

суток проводился забор крови для гемостазиологического исследования. В раннем восстановительном периоде через 3 месяца было 23 (40,3 %) пациентов. Группу контроля составили 22 человека, сопоставимых по полу и возрасту (средний возраст $52,4 \pm 1$ год), не имеющие в анамнезе церебральной, кардиальной патологии.

Исследование показателей системы гемостаза заключалось в определении: 1) агрегации тромбоцитов (АГ), спонтанной и индуцированной, с применением в качестве индукторов аденозиндифосфорной кислоты в низких (АДФ 0,1мкМ) и высоких дозах (АДФ 5 мкМ), адреналина 10 мкг/мл на агрегометре «LA230-2 БИОЛА». Оценивались радиус агрегатов для спонтанной и индуцированной малыми дозами агрегации и максимальное светопропускание (%) для АДФ 5 мкМ и адреналина 10 мкг/мл; 2) ристоцетин ко-факторной активности фактора Виллебранда; 3) фибриногена в плазме по Клауссу, АПТВ, протромбинового времени, на анализаторе «STA-COMPACT» с использованием реактивов фирмы «Diagnostics stago» (Швеция), растворимых фибрин мономерных комплексов (РФМК) по ортофенантролиновому тесту.

Исследовали концентрацию vWF в плазме крови до и после МП у пациентов в остром периоде ОНМК и через 3 месяца. По изменению уровня vWF оценивали степень выраженности эндотелиальной дисфункции.

Статистическая обработка полученных данных выполнялась при помощи программы Statistica 6.0 с использованием непараметрических методов анализа. Для проверки гипотезы о различии выборок применяли критерии Вилкоксона, Манна–Уитни. Для сравнения показателей в нескольких группах использовался дисперсионный анализ Краскэла–Уоллиса. Различия считались значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты представлены в виде медиан и межквартильного интервала Me [25%; 75%].

Результаты и обсуждение

У пациентов в остром периоде ОНМК выявлено повышенное содержание маркеров гиперкоагуляции по сравнению с группой здоровых – фибриногена ($p=0,0001$), растворимых комплексов фибрин–мономеров ($p=0,00003$). Уровень фактора Виллебранда в остром периоде ИИ был выше по сравнению с контролем на 31,7% ($p=0,002$), статистически значимого изменения уровня vWF после проведенного лечения не обнаружено. Уровень vWF оставался повышенным и через 3 месяца, по сравнению с контрольной группой на 21,3% ($p=0,004$), но значимого изменения концентрации в плазме крови в раннем восстановительном периоде не происходило (рис.1).

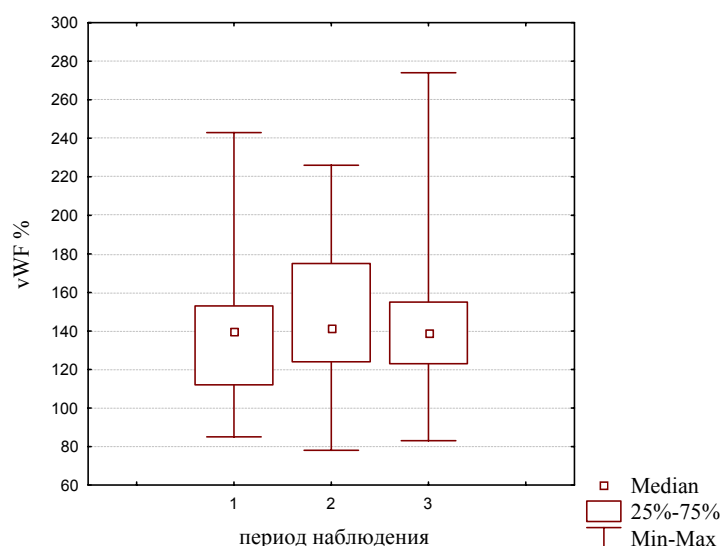


Рис.1. Уровень фактора Виллебранда в остром и восстановительном периодах ишемического инсульта.

Полученные результаты согласуются с рядом авторов, в исследованиях которых выявлено стойкое повышение уровня vWF в течение всего острого периода ИИ и через 3 месяца после перенесенного ОНМК, что свидетельствует о выраженности эндотелиальной дисфункции. Увеличение уровня vWF ассоциируется с повышенным риском смертности после перенесенного инсульта (7, 18).

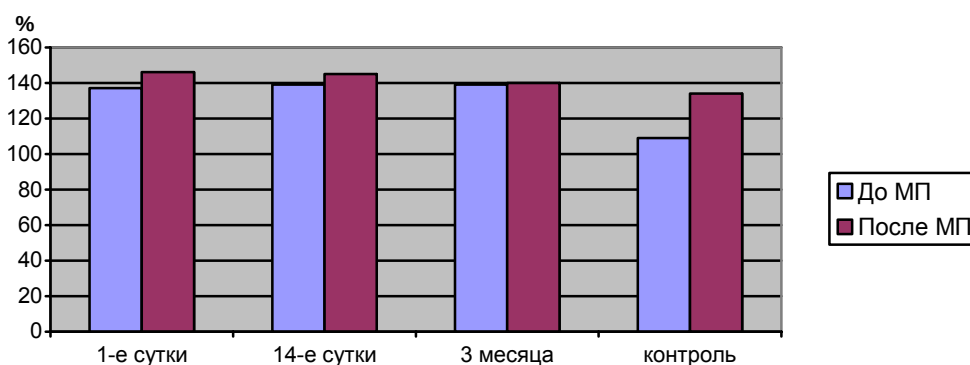


Рис. 2. Показатели активности фактора Виллебранда до и после манжеточной пробы.

После проведения МП в основной и контрольной группах отмечалось статистически значимое увеличение концентрации vWF, но различное по выраженности. Наибольшее увеличение происходило у здоровых испытуемых – на 30% ($p=0,0006$). У пациентов в остром периоде ОНМК в первые сутки заболевания в ответ на МП увеличение составило всего 6,5 % ($p=0,0001$), а на 14–е сутки – 4,3 % ($p=0,00001$). Самым низким ответ оказался в группе пациентов, обследуемых через 3 месяца после перенесенного ОНМК, увеличение концентрации vWF после проведения МП произошло на 0,7% ($p=0,003$). Полученные данные указывают на декомпенсированное состояние эндотелия (выраженной

эндотелиальной дисфункции), характеризуемым значительным угнетением реактивности эндотелия.

Таблица 1

Агрегация тромбоцитов у больных с острым нарушением мозгового кровообращения в остром и раннем восстановительном периодах

Параметры	Показатели агрегации тромбоцитов в группах			
	1 сутки (n =57)	14 сутки (n =57)	3 месяца (n =23)	Контроль (n =22)
САТ	1,3[1,1;1.6]	1.3[1,1;1.9]	1.5[1,2;1,9]*	1.2[1,1;1,5]
АДФ 0,1 (мкМ)	1,6[1,3;2]	1.6[1,4;2.2]	1.5[1,4;2,1]	1.5[1,3;2,4]
АДФ 5 (мкМ)	34[21,6;44.2]	27.6[17,8;38.2]**	31,4[20,2;39,3]	39[16,7;53,1]
Адреналин 10 (мкг/мл)	25,3[15,4;41,9]	16,4 [9,6;28]**	19,2[8,9;26,5]	34,4[14,1;47,8]

Примечание: * – значимость различий $p \leq 0,05$ по отношению к контролю;

** до и после лечения.

Повышение спонтанной агрегации тромбоцитов (САТ) по сравнению с контрольной группой, достигающее статистической значимости ($p=0,008$), восстановлено только у пациентов, обследованных через 3 месяца после перенесенного инсульта. При исследовании индуцированной АТ с применением больших доз индукторов: АДФ 5 мкМ и адреналина – происходит статистически значимое ($p=0,03$, $p=0,02$) снижение АТ на 14-е сутки наблюдения и на фоне проводимой стандартной антитромботической терапии (таб.1). Для более детального анализа изменения функциональной активности тромбоцитов при исследовании индуцированной АТ с использованием АДФ 0,1 мкМ и АДФ 5 мкМ, мы выделили две группы пациентов – с нормальной и высокой АТ для АДФ 0,1 мкМ, низкой и высокой АТ для АДФ 5 мкМ.

Таблица 2

Агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ 0,1 мкМ, средний радиус агрегатов

Этапы	Показатели в динамике	
	Нормальная агрегация (n=36)	Высокая агрегация (n=21)
До лечения	1,36[1.2;1,6]	2,51 [2.1; 3,2]
После	1,49 [1,4;1,9]*	2,13 [1,7; 2,7]

Примечание: * – значимость различий $p=0,007$

Изначально у 21 из 57 (36,8%) пациентов с ИИ агрегация в ответ на 0,1 мкМ АДФ была выше нормы (таб.2). Ни один из пациентов не принимал дезагрегантной терапии до заболевания. В то же время у этих пациентов при оценке больших агрегатов, в ответ на 5 мкМ АДФ картина была противоположная. Только у 5 (23,8%) пациентов наблюдалась повышенная АТ, у 9 (42,8%) – она была меньше нижней границы нормы, что соответствует данным, полученным в других исследованиях (1, 14, 19). Этот факт подтверждает то, что значительное количество клеток функционально заторможены или рефрактерны, а потому не могут включаться в агрегаты. На этом фоне не происходит образования агрегатов большого размера и методически запись регистрирует пониженную агрегацию, хотя у больных образование малых агрегатов повышено, что позволяет судить о протромботическом состоянии.

Таблица 3

Агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ 5 мкМ, %

Этапы	Показатели в динамике	
	Низкая агрегация (n=32)	Нормальная и высокая агрегация (n=25)
До лечения	21,6 [6,0;27]	44,2 [40;61]
После лечения	17,2 [12,5;29]	32,6 [23,5;42]*

Примечание: * – значимость различий $p=0,003$

Из таблицы 3 видно, что на фоне осуществляемой антитромботической терапии в группе пациентов с нормальным и повышенным уровнем образования крупных агрегатов в ответ на 5 мкМ АДФ происходит статистически значимое ($p=0,003$) снижение АТ на 14-е сутки наблюдения. Однако, при использовании низких доз индуктора у пациентов с изначально нормальным агрегационным ответом происходит статистически значимое увеличение АТ после лечения ($p=0,007$), что свидетельствует о сохраняющемся гемостатическом потенциале и отсутствии чувствительности тромбоцитов к действию дезагрегантной терапии (табл.2). При исследовании АТ у 23 пациентов через 3 месяца в раннем восстановительном периоде на фоне проводимой антитромбоцитарной терапии – приема аспирина 75 мг (приверженность к лечению составила 100%) отмечено, что число с высокой АТ, индуцированной 0,1 мкМ АДФ, увеличилось до 47,8%. В ответ на 5 мкМ АДФ из 11 у 8 (72,7%) пациентов агрегационный ответ оставался низким.

Патогенетические механизмы изменения функциональной активности тромбоцитов могут заключаться в нарушениях «пула хранения» α - и плотных гранул, обеспечивая состояние невосприимчивости к действию агонистов агрегации. Вместе со снижением антитромботической активности тромбоциты становятся особенно восприимчивыми к действию различных типов агонистов, включая АДФ и эпинефрин. При использовании низких доз АДФ (0,1–1,5 мкМ АДФ) происходят изменение формы и обратимая фаза АТ, при более высоких дозах индуктора – необратимая агрегация, сопровождающаяся дегрануляционным процессом (6).

В настоящее время установлено, что множественные эффекты в результате действия АДФ на тромбоциты опосредованы несколькими пуринорецепторами. Среди P_2 –рецепторов по их функционально–морфологическим особенностям выделяют две группы: P_2X_1 лигандные рецепторы, связанные с ионными каналами, и два вида P_2Y –рецепторов, которые сцеплены с G протеинами, осуществляющими внутримембранную передачу сигнала активации. В условиях длительно существующей эндотелиальной дисфункции тромбоцит обладает механизмами, ограничивающими ненужную активацию, приводящую к необратимому повреждению. Это состояние невосприимчивости может быть опосредовано рецепторами P_2Y . В исследовании Caerphilly была продемонстрирована низкая чувствительность тромбоцитов (на высокую дозу АДФ), прогнозирующая высокий риск инсульта (11).

В работе Л.Г. Климович с соавт. (5) получено подтверждение того, что по мере прогрессирования коронарного атеросклероза прогрессирует и дисфункция тромбоцитов, которая выражается в возрастании активации тромбоцитов и снижении их функции, неадекватном ответе на терапию. Авторы ставят под сомнение оправданность применения у данной категории пациентов антиагрегантной терапии.

По данным ряда исследований низкая чувствительность к действию аспирина связана с повышенной концентрацией в плазме антигена vWF и фибриногена (8, 13). Длительная профилактика сосудистых заболеваний чрезмерным подавлением функции тромбоцитов может дать обратный эффект, как предполагает J. Liao (16).

У пациентов, перенесших ОНМК, в остром и раннем восстановительном периодах наблюдается стойкое повышение в крови маркеров эндотелиальной дисфункции при выраженном снижении реактивности эндотелия, что не может не отражаться на тромбоцитарном звене гемостаза и, возможно, играет роль в развитии «парадоксальной» АТ с различным ответом на действие низких и высоких доз индукторов. Подтверждена более высокая диагностическая значимость использования низких доз индукторов

агрегации (0,1 мкМ АДФ), что согласуется с результатами, полученными в других исследованиях (1, 3).

Ценность полученных результатов заключается в выводе о том, что автономное рассмотрение каждого из индукторов не позволяет сделать достаточно определенного заключения об эффекте проводимой терапии, предрасположенности к тромботическим осложнениям. При условии совместного рассмотрения изученных индукторов появляется возможность выявления «аномальной» АТ, свидетельствующей о степени нарушения компенсации в условиях длительно существующей эндотелиальной дисфункции, а также подбора комбинированной антитромбоцитарной терапии для наиболее эффективной профилактики повторных цереброваскулярных событий.

STATE OF ENDOTHELIUM FUNCTION AND AGGREGATIVE ACTIVITY OF PATELETS IN ACUTE AND EARLY REHABILITATION PERIOD OF ISHEMIC STROKE

Krasnoyarsk state medical academy named in honored V.F. Vojno-Yasinetskij
In the patients who had an ischemic stroke, in acute and early rehabilitation periods a stable increase of endothelial dysfunction markers in blood in the marked decrease of endothelium reactivity was revealed. In case of combined consideration of various inductors there is an opportunity of revealing the 'abnormal' platelet aggregation which is the evidence of some degree of compensation abnormalities in the conditions of long existing endothelial dysfunction. Higher diagnostic importance of the use of low doses of aggregation inductors (0.1 mcM ADP) was confirmed.

Литература

1. Бурячковская Л.И., Каминный А.И., Кухарчук В.В. и др. Клеточные и биохимические предпосылки применения Омега-3 ПНЖК для профилактики и лечения ИБС // Рус. мед. журнал. – 2007. – Том 15, № 4. – С. 290–296.
2. Ваизова О.Е. Фармакологическая и экстракорпоральная коррекция дисфункции сосудистого эндотелия при церебральном атеросклерозе: автореф. дисс. ... докт. мед. наук. – М., 2006. – С.
3. Климович Л.Г., Иващенко А.А., Рудько И.А. Высвобождение АТФ из плотных гранул и агрегация тромбоцитов у больных после шунтирования. Контроль дезагрегантной терапии // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2004. – №2. – С. 37–45.
4. Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Физиология и патофизиология эндотелия: сб.: Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция. СПб.: СПбГМУ, 2003. – С. 4–38.

5. Суслина З.А, Танащян М.М., Ионова В.Г. Ишемический инсульт: кровь, сосудистая стенка, антитромботическая терапия. М.: Мед. книга, 2005.
6. Ashby B., Colman R.W., Daniel J.L. et al. Platelet stimulatory and inhibitory receptors. In: Colman R.W., Hirsh J., Marder V.J. et al. // *Haemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*. 4th ed. – Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. – 2001. – P. 505–520.
7. Carter A. M., Catto A.J., Mansfield M.W. et al. Predictive Variables for Mortality After Acute Ischemic Stroke // *Stroke*. – 2007. – Vol. 38. – P. 1873.
8. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection // *Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 5, № 1. – P. 230–237.
9. Constans J. and C Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease // *Clin Chim Acta*. – 2006. – Vol. 368, № 1–2. – P. 33–47.
10. Cooney M., Dudina A., O'callaghan P. et al. Von Willebrand Factor in CHD and Stroke: Relationships and Therapeutic Implications // *Curr. Treat Options Cardiovasc. Med.* – 2007. – Vol. 9, № 3. – P. 180–190.
11. Elwood P.C., Beswick A., Janet P. et al. Platelet tests in the prediction of myocardial infarction and ischaemic stroke: Evidence from the Caerphilly Prospective Study // *Haematol.* – 2001. – Vol. 113, № 2. – P. 514–520.
12. Fateh-Moghadam S., Htun P., Tomandl B. et al. Hyperresponsiveness of platelets in ischemic stroke // *Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 97, № 6. – P. 974–978.
13. Harrison P., Segal H., Silver L. et al Aspirin non-responsiveness in a population-based study of acute vascular events // *Platelets*. – 2006. – Vol. 17, № 8. – P. 600.
14. Kobusiak-Prokopowicz M., Kulickowski W., Karolko B. et al. Platelet aggregation and P-selectin levels during exercise treadmill test in patients with ischaemic heart disease // *Kardiol. Pol.* – 2006. – Vol. 64, № 10. – P. 1094–1100, disc. 1101.
15. Lee K.W., Lip G. Y., Tayebjee M. et al. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, № 2. – P. 526–532.
16. Liao J. K. Secondary Prevention of Stroke and Transient Ischemic Attack Is More Platelet Inhibition the Answer? // *Circulation*. – 2007. – Vol. 115. – P. 1615–1621.
17. Lip G., Lane D., Walraven C.V. and Hart R.G. Additive Role of Plasma von Willebrand Factor Levels to Clinical Factors for Risk Stratification of Patients With Atrial Fibrillation // *Stroke*. – 2006. Vol. 37. – P. 2294–2300.
18. McCabe D.J., Harrison P., Mackie I.J. et al. Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after

ischaemic stroke or transient ischaemic attack // *Haematol.* – 2004. – Vol. 125, № 6. – P. 777–787.

19. Sharp D.S., Ben-Shlomo Y., Beswick A.D. et al. Platelet aggregation in whole blood is a paradoxical predictor of ischaemic stroke: Caerphilly Prospective Study revisited // *Platelets.* – 2005. – Vol.16, № 6. – P. 320-328.
20. Vischer U.M. Von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease // *Thromb. Haemost.* – 2006. Vol. 4, № 6. – P. 1186–1193.