

М.Ю. Колесник, А.В. Абрамов, В.В. Сиволап

Новий підхід до оцінки морфології тромбоцитів та експресії їх рецепторів у хворих на хронічну серцеву недостатність із супутнім цукровим діабетом 2 типу

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: імуногістохімія, тромбоцити, хронічна серцева недостатність, цукровий діабет 2 типу.

У статті наведено огляд існуючих методів оцінки тромбоцитарного гемостазу та запропоновано методику імуногістохімічного дослідження тромбоцитів та їх ключових рецепторів. Надаються результати власних досліджень морфології тромбоцитів та експресії ІІb/ІІІa глікопротеїнових рецепторів, а також трансмембранного Р-селектину у 30 практично здорових осіб та 65 хворих на хронічну серцеву недостатність на фоні цукрового діабету 2 типу. У хворих на ХСН ішемічного генезу із супутнім цукровим діабетом 2 типу, незважаючи на системний прийом аспірину, спостерігається висока активність тромбоцитів, що проявляється у підвищеній експресії ключових рецепторів адгезії та агрегації.

Новый подход к оценке морфологии тромбоцитов и экспрессии их рецепторов у больных с хронической сердечной недостаточностью с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

М.Ю. Колесник, А.В. Абрамов, В.В. Сиволап

В статье приведен обзор существующих методов оценки тромбоцитарного гемостаза и предложено методику иммуногистохимического исследования тромбоцитов и их ключевых рецепторов. Приводятся результаты собственных исследований морфологии тромбоцитов и экспрессии ІІb/ІІІa гликопротеиновых рецепторов, а также трансмембранного Р-селектина у 30 практически здоровых лиц и у 65 пациентов с хронической сердечной недостаточностью на фоне сахарного диабета 2 типа. У больных ХСН ишемического генеза на фоне сахарного диабета 2 типа, несмотря на регулярный прием аспирина, наблюдается высокая активность тромбоцитов, что проявляется повышенной экспрессией ключевых рецепторов адгезии и агрегации.

Ключевые слова: иммуногистохимия, тромбоциты, хроническая сердечная недостаточность, сахарный диабет 2 типа.

Патология. – 2010. – Т.7., №1. – С. 39-46

A new approach to the platelets' morphology and receptors investigation in chronic heart failure patients with concomitant diabetes mellitus type 2

M.Y. Kolesnyk, A.V. Abramov, V.V. Syvolap

Methods of platelets' investigation were reviewed and method of immunohistochemical evaluation of platelets and their receptors was proposed. The results of platelets' morphology and ІІb/ІІІa glycoprotein, P-selectin receptors investigation in 30 healthy individuals and in 65 chronic heart failure patients with diabetes mellitus type 2 were reported. Despite of aspirin use, high platelet reactivity is present in type 2 diabetes mellitus patients, that is shown in increased expression of the main aggregation and adhesion receptors.

Key words: immunohistochemistry, platelets, chronic heart failure, diabetes mellitus type 2.

Pathologia. 2010; 7(1): 39-46

Порушення тромбоцитарного гемостазу відіграють важливу роль в патогенезі серцево-судинних захворювань [1]. Переконалива доказова база з використання антитромбоцитарних агентів у кардіології довела безсумнівний вплив цих препаратів на сприятливий прогноз хворих [2]. Антитромбоцитарна терапія в теперішній час є обов'язковим компонентом як первинної, так і вторинної профілактики багатьох захворювань [2,3]. Широке використання інвазивних технологій лікування ішемічної хвороби серця (стентування) значно розширило показання до антитромбоцитарної терапії. В той же час, з'явилися нові проблеми, пов'язані із резистентністю до антитромбоцитарних препаратів [4,5]. Це стосується, перш за все, двох найбільш використовуваних у світі препаратів – аспірину та клопидогрелю.

Пошук оптимального методу для діагностики порушень тромбоцитарного гемостазу є однією із найактуальніших проблем кардіології. Майже щорічно з'являються нові сучасні прилади та методики, що намагаються довести свої переваги, право на життя та можливості використання у клінічній практиці (табл. 1).

Отже, в історичному аспекті найпершою спробою дослідити функцію тромбоцитарного гемостазу було вимірювання часу кровотечі. Цей тест є дуже неспецифічним і майже не застосовується сьогодні в реальній клінічній практиці. В 1962 році Born запропонував вивчати оптичну щільність тромбоцитарної плазми до та після активації агоністами агрегації тромбоцитів [6]. Цей метод отримав назву турбідиметричної агрегатометрії та на сьогодні залишається «золотим стандартом» оцінки функції тромбоцитарного гемостазу [7,8]. Відомо понад 200 агоністів агрегації тромбоцитів, проте у клінічній практиці найширше розповсюдження отримали АДФ, арахідонова кислота, адреналін, ристоміцин та колаген. Пізніше виник метод імпадансної агрегатометрії, яка дозволила вивчати функціональний стан тромбоцитів не у плазмі, а у цільній крові. В теперішній час з'явилося чимало сучасних приладів (VerifyNow, PlateletWorks, PFA-100 та ін.), які за своєю суттю є модифікацією методики агрегатометрії [9,10]. Деякі з них знаходяться у стадії апробації, а інші вже використовуються у

Сучасні методи оцінки функції тромбоцитів

Принцип тесту	Назва тесту	Переваги	Недоліки	Прогностична цінність	Моніторинг лікування аспірином	Моніторинг лікування тієнопіридинами	Моніторинг лікування ІІb/ІІІа антагоністами
Оцінка in vivo часу зупинки кровотечі	Час кровотечі	Тест in vivo, фізіологічний	Неспецифічний; нечутливий; великий коефіцієнт варіації; може залишати рубець	Ні	Ні	Ні	Ні
In vitro оцінка кровотоку	PFA-100	Простий; швидкий; малий об'єм зразка крові; не потрібна підготовка; оцінка в цільній крові	Залежить від рівня фактору фон Виллебранда та гематокріта	Так	Так	Не рекомендується	Не рекомендується
Стрес-індукована тромбоцитарна адгезія	IMPACT (cone and platelet) analyzer, DiaMed)	Простий; швидкий; малий об'єм зразка крові; оцінка в цільній крові	Методика не отримала широкого розповсюдження	Ні	Досліджується	Досліджується	Не рекомендується
Оцінка агрегації тромбоцитів	Агрегатометрія (турбидиметрична)	Історично «золотий» стандарт	Погана відтворюваність; великий об'єм зразка крові; потрібна підготовка зразка крові; тривалий за часом; коштовний	Так	Так	Так	Так
	Агрегатометрія (імпедансна)	Оцінка у цільній крові	Великий об'єм зразка крові; потрібна підготовка зразка крові; тривалий за часом; коштовний	Так	Так	Так	Так
	VerifyNow (Ultegra RPFA)	Простий; швидкий; малий об'єм зразка крові; не потрібна підготовка; оцінка в цільній крові	Методика не отримала широкого розповсюдження	Так	Так (з арахідоною кислотою)	Так (із АДФ)	Так
	Platelet-Works (Helena Laboratories)	Мінімальний об'єм зразка крові; дослідження у цільній крові	Невелика доказова база	Ні	Ні	Так	Так
Зміни у мембрані тромбоцитів під впливом агоністів агрегації	Експресія тромбоцитарного мембранного Р-селектину та GP ІІb/ІІІа (проточна цитофлуориметрія)	Мінімальний об'єм зразка крові; дослідження у цільній крові	Багатоступенева підготовка зразка; коштовний; потребує наявності спеціальних умов для приміщення; є дуже залежним від кваліфікації оператора	Так	Так (з арахідоною кислотою)	Так (із АДФ)	Так

Принцип тесту	Назва тесту	Переваги	Недоліки	Прогностична цінність	Моніторинг лікування аспірином	Моніторинг лікування тієнопіридидами	Моніторинг лікування ІІb/ІІІа антагоністами
Зміни у мембрані тромбоцитів під впливом агоністів агрегації	Фосфорильований VASP (проточна цитофлуориметрія)	Безпосередньо пов'язаний із P _Y 12 – молекулярною мішенню клопідогрелю; мінімальний об'єм зразка крові; дослідження у цільній крові	Багатоступенева підготовка зразка; коштовний; потребує наявності спеціальних умов для приміщення; є дуже залежним від кваліфікації оператора	Ні	Ні	Так	Ні
Дослідження вмісту цільних тілець та α-гранул після впливу на тромбоцити агоністами	Сироватковий тромбоксан B ₂	Безпосередньо пов'язаний із мішенню аспірину-ЦОГ-1	Непряме вимірювання, неспецифічно для тромбоцитів	Ні	Так	Ні	Ні
	11-дегідротромбоксан B ₂ сечі	Безпосередньо пов'язаний із мішенню аспірину-ЦОГ-1	Непряме вимірювання, неспецифічно для тромбоцитів; залежить від функції нирок	Так	Так	Ні	Ні
	Плазмовий sCD40L	Високо специфічний маркер тромбоцитарної активації	Виділення плазми може привести до штучної активації тромбоцитів	Так	Ні	Ні	Ні
	Плазмовий GP V	Специфічний тільки для тромбоцитів	Виділення плазми може привести до штучної активації тромбоцитів	Ні	Ні	Ні	Ні
	Розчинний P-селектин, β-тромбоглобулін	Відображає тромбоцитарну секрецію	Виділення плазми може привести до штучної активації тромбоцитів; P-селектин також міститься в ендотеліоцитах	Ні	Ні	Ні	Ні

клініках та науково-дослідних інститутах США і деяких країн Європи. Поява значної кількості нових приладів пояснюється спробою знайти оптимальний метод оцінки резистентності до аспірину та клопідогрелю, бо доведено, що ці стани реально пов'язані із прогнозом хворих [5].

Іншою групою методів дослідження тромбоцитарного гемостазу є визначення продуктів дегрануляції тромбоцитів у плазмі, сироватці або сечі. Серед таких речовин найчастіше досліджуються сироватковий тромбоксан B₂, плазмовий CD 40L та глікопротеїд V, P-селектин та β-тромбоглобулін, а також 11-дегідротромбоксан B₂ сечі [11,12,13,14,15]. Головними недоліками цих методів є те, що не всі означені речовини є специфічними для тромбоцитів, можлива штучна активація тромбоцитів під час виділення сироватки або плазми, що приведе до хибної трактовки отриманих результатів. Дані щодо прогностичної значущості цих речовин є суперечливими.

Нарешті, однією із сучасних методик оцінки тромбоцитарного гемостазу є методика проточної цитофлуориметрії. Для її проведення виконується

забір зразків венозної крові у пробірці, що містять антикоагулянт (3,8 % розчин цитрату натрію). Після виділення суспензії тромбоцитів додаються FITC-кон'юговані моноклональні антитіла у перенасиченій концентрації до певного тромбоцитарного рецептора. Після чого система детекції реєструє потік клітин та фіксує рівень їх флюоресценції. У кінцевому результаті методика дозволяє отримати два альтернативних показники – «відсоток позитивних до досліджуваного рецептора клітин серед загальної кількості проаналізованих тромбоцитів» або «середню інтенсивність флюоресценції». Середня інтенсивність флюоресценції відповідає інтенсивності експресії певних тромбоцитарних рецепторів, які планувалося дослідити [16].

Метод проточної цитофлуориметрії має певні недоліки, які можна поділити на декілька категорій [17].

По-перше, доступність проточних цитофлуориметрів через високу вартість є значно обмеженою в країнах СНД та Україні, що не дозволяє широко використовувати метод у реальній клінічній практиці. Вартість реагентів та допоміжних матеріалів для проведення проб є також значною.

По-друге, коректна експлуатація проточних цитофлуориметрів потребує створення спеціальних умов. Так, до приміщення, у якому проводиться методика, пред'являються підвищені вимоги до стерильності та вентиляції. Для функціонування системи потрібна високоочищена вода та майже щоденна експлуатація обладнання із обов'язкою процедурою калібровки.

По-третє, це недоліки, пов'язані з підготовкою зразків крові та реагентів. Для запобігання спонтанної активації тромбоцитів пробу треба виконати протягом 45 хвилин після забору крові. Процедура фіксації, яка могла б запобігти цьому, передбачена лише для деяких типів моноклональних антитіл. Приготування реагентів та проведення проби залежить від кваліфікації оператора.

Методика проточної цитофлуориметрії не дозволяє отримувати морфологічну характеристику досліджуваних клітин. Варто також зазначити, що дослідженню підлягають лише циркулюючі тромбоцити. В той же час, неможливо оцінити функцію пристінкових тромбоцитів, що відіграють важливу роль у процесах адгезії та агрегації. У процесі підготовки проби певна частина тромбоцитів спонтанно активується, створюючи тромбоцитарні агрегати. Система детекції у проточній цитофлуориметрії здатна визначити інтенсивність флуоресценції кожної окремої частки, але не може відрізнити окремих тромбоцитів від тромбоцитарного агрегату [17].

Спільною роботою кафедр патологічної фізіології та пропедевтики внутрішніх хвороб Запорізького державного медичного університету вперше запропоновано методику дослідження морфології тромбоцитів та імуногістохімічного визначення експресії їх рецепторів, яка дозволяє діагностувати порушення тромбоцитарного гемостазу при різних захворюваннях та проводити оцінку ефективності антитромбоцитарної терапії. У якості моделі нами було обрано такі хвороби, як хронічна серцева недостатність та цукровий діабет 2 типу, що є тромбоз-асоційованими патологічними станами. Серед різноманітних рецепторів тромбоцитів нами досліджені P_{2b}/P_{2a} глікопротеїнові рецептори. Вони є комплементарними до фібриногену та відіграють ключову роль у створенні незворотних тромбоцитарних агрегатів. Слід зазначити, що активація цих рецепторів є кінцевим етапом агрегації тромбоцитів після стимуляції останніх різними агоністами. Серед рецепторів адгезії для дослідження був обраний трансмембранний P-селектин, що бере участь у так званому «ролінгу» тромбоцитів, тобто їх адгезії до пошкоджених ендотеліоцитів та активованих лейкоцитів. У якості антитромбоцитарного агента нами був обраний найчастіше призначуваний у світі препарат – аспірин. Він є незворотнім інгібітором ферменту циклооксигенази-1 та через це пригнічує утворення тромбоксану A₂. Останній є потужним агоністом агрегації тромбоцитів. Через блокаду цього механізму аспірин протидіє процесам тромбоутворення.

Мета роботи: дослідити та порівняти особливості

морфології тромбоцитів, експресії їх рецепторів у практично здорових осіб, хворих на хронічну серцеву недостатність (ХСН) ішемічного генезу із цукровим діабетом 2 типу (ЦД) та без нього на фоні тривалої терапії аспірином.

Пацієнти, матеріали та методи

Обстежено 65 хворих на ХСН ішемічного генезу у стані декомпенсації кровообігу на фоні ЦД (середній вік 62,5±7,56 років). Групу зіставлення склали 35 пацієнтів на ХСН у стані декомпенсації без ЦД (середній вік 59,9±8,65 років). Дослідження проводили на клінічній базі кафедри пропедевтики внутрішніх хвороб ЗДМУ – кардіологічному відділенні КУ «6-та міська клінічна лікарня» м. Запоріжжя та в умовах центральної науково-дослідної лабораторії ЗДМУ (зав. – проф. Абрамов А.В.). Всі хворі у досліджуваних групах вірогідно не відрізнялися за віком, статтю, основними антропометричними показниками та базисною терапією ХСН. Всі хворі тривало приймали аспірин. Контрольну групу склали 30 практично здорових осіб відповідної статі та віку.

Критеріями включення у дослідження були:

- серцева недостатність ішемічного генезу в стані декомпенсації II-IV ФК по NYHA;
- синусовий ритм;
- післяінфарктний кардіосклероз в анамнезі;
- цукровий діабет 2 типу у пацієнтів, що перебувають на дієті або на препаратах сульфонілмочевини та/або бігуанідах;
- анамнез тривалого прийому аспірину у добовій дозі 75 мг/добу;
- письмова інформована згода на участь у дослідженні.

Критеріями виключення з дослідження були:

- цукровий діабет 1 типу;
- цукровий діабет 2 типу на препаратах інсуліну;
- цукровий діабет 2 типу у пацієнтів, що приймають препарати із групи тіазолідиндіонів.

Присутність клінічно значущої супутньої патології, що включає:

- хронічну печінкову недостатність;
- фібриляцію або тріпотіння передсердь;
- геморагічний інсульт в анамнезі;
- крупні кровотечі в анамнезі;
- виразкову хворобу шлунка або 12-палої кишки у стадії загострення;
- гострі інфекційні захворювання;
- злоякісні пухлини;
- відсутність прийому базисної медикаментозної терапії ХСН;
- відмова від участі у дослідженні з будь-якої причини.

Діагноз ХСН встановлювали відповідно до рекомендацій Асоціації кардіологів України [18]. Також всім хворим проводили визначення рівня мозкового натрійуретичного пептиду з використанням стандартного набору виробництва фірми «Biomedica» (Австрія). ЦД діагностували за умов наявності анамнестичних даних

на ЦД та/або підвищення рівня глюкози плазми венозної крові натщесерце понад 7,0 ммоль/л. Додатково визначали рівень глікованого гемоглобіну імунотурбідиметричним методом на автоматичному аналізаторі Olympus AU-640.

Вранці проводили забір венозної крові в об'ємі 9 мл у пластикові пробірки, що містили 1 мл 2,7% розчину трилону Б та 200 мкл універсального антипротеазного коктейлю («Sigma-Aldrich», США). Отримували багату на тромбоцити плазму шляхом центрифугування протягом 7 хвилин на швидкості 1000 об/хв. Після цього за допомогою автоматичного дозатора обережно перенесли плазму в інші пластикові пробірки. Для виділення тромбоцитів отриманий матеріал центрифугували на швидкості 3000 об/хв протягом 10 хвилин. Краплю тромбоцитарної суміші наносили на ультратонкі скельця з адгезивним покриттям «Super Frost Plus» («Menzel Gmb & Co KG», Німеччина) та висушували при кімнатній температурі. Після цього мазки фіксували 100 % метанолом («Merck», Німеччина). Для кожного хворого готували чотири препарати для ідентифікації досліджуваних рецепторів.

Для визначення специфічних маркерів тромбоцитів використовували імунофлюоресцентний метод за допомогою специфічних антитіл виробництва «Diacclone» (Франція).

Для визначення експресії трансмембранного глікопротеїнового рецептора GP-ІІb тромбоцитів використовували моноклональні антитіла миші (IgG1) проти CD41 (клон MEM-06) людини.

Для визначення експресії трансмембранного глікопротеїнового рецептора GP-ІІІa тромбоцитів використовували моноклональні антитіла миші (IgG1) проти CD61 (клон C17) людини.

Для визначення експресії трансмембранного комплексу глікопротеїнових рецепторів ІІb/ІІІa тромбоцитів у активному стані використовували моноклональні антитіла миші (IgG1) проти CD41a (клон НІР8) людини.

Для визначення експресії трансмембранного глікопротеїду Р-селектину тромбоцитів використовували моноклональні антитіла миші (IgG1) проти CD62P (клон НІ62Р) людини.

На окремі скельця з мазками тромбоцитів наносили розчин одного з антигенів в 0,1 М фосфатному буфері (рН=7,4) у відношенні 1:1000 та інкубували у вологій камері протягом доби при $t = +4^{\circ}\text{C}$. Далі скельця тричі по 10 хв відмивали 0,1 М фосфатним буфером (рН=7,4) і продовж 1 години ($t = 37^{\circ}\text{C}$) інкубували із вторинними антитілами у розчині з 0,1 М фосфатним буфером (рН=7,4) у відношенні 1:64. У якості вторинних антитіл використовували козячі антитіла до повної молекули IgG миші, які кон'юговані з FITC («Sigma Chemical», США). Після інкубації скельця промивали 0,1 М фосфатним буфером і заключали в суміш гліцерину і фосфатного буфера у відношенні 9:1 для дослідження методом флюоресцентної мікроскопії.

Оброблені гістологічні препарати досліджували на

комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 («Kontron Elektronik», Німеччина). Зображення, отримане на мікроскопі AXIOSKOP («Zeiss», Німеччина) за допомогою високоемісійного світлофільтру 38HE («Zeiss», Німеччина) (спектр збудження 450-490 нм, спектр емісії 500-550 нм), через високочутливу відеокамеру COHU-4922 («COHU Inc.», США) негайно вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386. При цьому виключався ефект «вигорання» препарату, пов'язаний із поступовим руйнуванням молекули FITC під впливом тривалого ультрафіолетового опромінення. Відеокадр з імунофлюоресценцією оцифровували за денситометричною шкалою із 256 градаціями сірого кольору. З кожного скельця вводили 10 випадкових полів зору, що давало змогу проаналізувати від 1500 до 2500 тромбоцитів.

Аналіз відеокадрів проводився в автоматичному режимі за допомогою пакету програм VIDAS-2.5 («Kontron Elektronik», Німеччина). При цьому в автоматичному режимі визначалися ділянки із значущою флюоресценцією, характерною для тромбоцитів, імунопозитивних до визначуваного CD-маркера.

Основними морфометричними показниками тромбоцитів були:

- площа тромбоциту, μm^2 ;
- еквівалентний діаметр тромбоциту, μm , що розраховувався як діаметр кола, площа якого відповідала площі тромбоциту.

Основними денситометричними показниками тромбоцитів були:

1. Питома щільність флюоресценції (GreyLog), умовні одиниці імунофлюоресценції – $\text{OD}_{\text{ф}}$, що розраховувалась за формулою:

$$\text{GreyLog}_i = |\lg(D_i / \text{BGg})|,$$

де, D_i – показник інтенсивності флюоресценції клітини, BGg – показник неспецифічної флюоресценції препарату (так званий «фон»). Цей показник відповідає інтенсивності експресії визначуваного рецептора. Варто додати, що він є аналогічним показнику середньої інтенсивності флюоресценції за методом проточної цитофлуориметрії;

2. Сумарна щільність флюоресценції (GreyCont), умовні одиниці імунофлюоресценції – $\text{OD}_{\text{ф}}$, що розраховувалась за формулою:

$$\text{GreyCont}_i = S_i * \text{GreyLog}_i,$$

де S_i – площа (μm^2), зайнята імунореактивним матеріалом у тромбоциті, а GreyLog_i – показник питомої щільності флюоресценції. Цей показник відповідав сумарній щільності відповідних поверхневих антигенів (CD-маркерів).

Усі вказані показники визначалися індивідуально для кожного тромбоцита в автоматичному режимі, що дозволяло отримати його унікальну характеристику.

Усім обстеженим особам також проводилось дослідження плазмового Р-селектину за допомогою стандартного набору виробництва фірми «Bender

MedSystems GmbH» (Австрія) згідно інструкції, що додавалася до нього. Визначення проводили за допомогою мікропланшетного фотометра DigiScan-400 ЦНДЛ Запорізького державного медичного університету (завідувач – проф. Абрамов А.В.) на підставі Програми виконання сумісних наукових досліджень між кафедрою пропедевтики внутрішніх хвороб з доглядом за хворими та ЦНДЛ ЗДМУ на 2007-2011 роки.

Статистичну обробку матеріалів здійснювали із застосуванням пакету програм «STATISTICA 6» («Statsoft», США, № ліцензії AXXR712D833214FAN5). Нормальність розподілу кількісних ознак аналізували за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Дані описової статистики надавали у вигляді медіани та міжквартильного розмаху – Me ($Q_{25} - Q_{75}$). Порівняння показників у групах проводили із застосуванням критерію Краскела-Уоліса, аналіз post hoc проводили за критерієм Ньюмена-Кейлса. Статистично значущою вважали різницю за $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

При порівнянні досліджуваних параметрів між хворими на ХСН без ЦД, що тривало приймали аспірин, та практично здоровими особами отримано наступні дані (табл. 2). Так, середній діаметр та площа тромбоцитів не мали вірогідних відмінностей. Питома щільність

флюоресценції CD 41 (ІІв-глікопротеїновий рецептор тромбоцитів) була на 63% ($p=0,0001$) нижче у хворих на ХСН без ЦД у порівнянні із практично здоровими особами. Сумарна щільність флюоресценції CD41 також була достовірно нижче у хворих на ХСН без ЦД на 73,8% ($p=0,0001$). Питома щільність флюоресценції CD 41a (ІІв/ІІа глікопротеїновий рецептор у активному стані) була нижчою на 72% ($p=0,00002$) у хворих на ХСН без ЦД. Сумарна щільність флюоресценції CD 41a була на 71,5% ($p=0,00002$) нижча у хворих на ХСН без ЦД. Питома щільність флюоресценції CD 61 (ІІв-глікопротеїновий рецептор) була достовірно нижчою (рис. 1, кольор. вкладка б) у хворих на ХСН без ЦД на 61% ($p=0,0001$), а сумарна щільність на 71% ($p=0,0001$) нижча у порівнянні із практично здоровими особами. Питома щільність флюоресценції CD 62P (трансмембранний Р-селектин) була нижча (рис. 2, кольор. вкладка б) на 62% ($p=0,00002$) у хворих на ХСН без ЦД, а сумарна щільність флюоресценції CD 62P нижче на 61% ($p=0,00002$).

Таким чином, хворі на ХСН без ЦД на постійній терапії аспірином мають зіставні середні діаметри та площу тромбоцитів у порівнянні із практично здоровими особами, а експресія всіх досліджуваних рецепторів у хворих на ХСН без ЦД була статистично значуще

Таблиця 2

Морфометричні показники тромбоцитів та ступінь експресії їх рецепторів*

Показник	Контроль ₁	Хворі на ХСН без ЦД ₂	Хворі на ХСН із ЦД ₃	P ₁₋₂	P ₁₋₃	P ₂₋₃
Середній діаметр тромбоциту, мкм	2,31 (2,21-2,41)	2,08 (1,58-2,75)	1,61 (1,48-1,84)	0,24	0,00003	0,0004
Середня площа тромбоциту, мкм ²	4,44 (4,12-4,93)	4,27 (2,32-6,86)	2,41 (2,08-3,01)	0,59	0,002	0,0008
Питома щільність флюоресценції CD 41, ОД _{1ф}	1,17 (1,04-1,31)	0,43 (0,16-0,85)	0,73 (0,45-0,94)	0,0001	0,0003	0,004
Сумарна щільність флюоресценції CD41, ОД _{1ф}	5,58 (4,88-6,48)	1,46 (0,49-2,7)	2,25 (1,24-2,97)	0,0001	0,0001	0,052
Питома щільність флюоресценції CD 41a, ОД _{1ф}	1,27 (1,04-1,4)	0,35 (0,2-0,86)	0,7 (0,59-0,85)	0,00002	0,000009	0,006
Сумарна щільність флюоресценції CD41a, ОД _{1ф}	5,56 (5,04-6,1)	1,64 (0,61-2,19)	1,9 (1,46-2,49)	0,00002	0,000009	0,1
Питома щільність флюоресценції CD 61, ОД _{1ф}	1,09 (0,83-1,22)	0,39 (0,17-0,78)	0,69 (0,53-0,94)	0,0001	0,004	0,009
Сумарна щільність флюоресценції CD61, ОД _{1ф}	5,07 (4,59-6,03)	1,41 (0,53-2,23)	1,89 (1,35-3,02)	0,0001	0,0001	0,01
Питома щільність флюоресценції CD 62P, ОД _{1ф}	1,16 (0,92-1,24)	0,41 (0,18-0,79)	0,67 (0,51-0,85)	0,00002	0,0003	0,006
Сумарна щільність флюоресценції CD 62P, ОД _{1ф}	5,1 (4,08-5,62)	1,66 (0,59-2,13)	1,85 (1,32-2,54)	0,00002	0,000009	0,04

* Всі дані описової статистики подано у вигляді медіани та міжквартильного розмаху.

знижена. Останнє пояснюється тим, що хворі на ХСН постійно приймали аспірин. Тромбоксановий механізм є одним із головних в активації Пб/Ша глікопротеїнових рецепторів та дегрануляції α -гранул тромбоцитів, що призводить до транслокації Р-селектину із цих органел до мембрани. Блокування цього механізму аспірином закономірно зменшує активність Пб/Ша – рецепторів та ступінь експресії Р-селектину на мембрані тромбоциту.

Порівняння даних між хворими на ХСН із супутнім ЦД, що тривало приймали аспірин у добовій дозі 75 мг/доб, та практично здоровими особами виявило наступні особливості. Так, середній діаметр тромбоцитів у хворих на ХСН був нижчим на 31% ($p=0,00003$) у порівнянні із практично здоровими особами. Відповідно, середня площа була нижчою на 41% ($p=0,002$) у хворих на ХСН із ЦД. Питома щільність флюоресценції CD41 була на 32% ($p=0,0003$) нижчою у хворих на ХСН із ЦД у порівнянні із практично здоровими особами. Сумарна щільність флюоресценції CD41 була достовірно нижчою у хворих на ХСН із ЦД на 52% ($p=0,0001$). Питома щільність флюоресценції CD41а була нижчою на 42% ($p=0,000009$) у хворих на ХСН із ЦД. Сумарна щільність флюоресценції CD41а була на 62% ($p=0,000009$) нижчою у хворих на ХСН із ЦД. Питома щільність флюоресценції CD61 була достовірно нижчою у хворих на ХСН із ЦД на 32% ($p=0,004$), а сумарна щільність – на 62% ($p=0,0001$) нижча в порівнянні із практично здоровими особами. Питома щільність флюоресценції CD62P була нижчою на 42% ($p=0,0003$) у хворих на ХСН із ЦД, а сумарна щільність флюоресценції CD 62P нижча на 62% ($p=0,000009$).

Таким чином, між хворими на ХСН із супутнім ЦД, що тривало приймають аспірин, та практично здоровими особами реєструється ще більш виражені відмінності. Так, відбувається зменшення діаметра, площі та експресії досліджуваних рецепторів у хворих на ХСН із супутнім ЦД.

Порівняльний аналіз показників тромбоцитарного гемостазу між групами хворих на ХСН із супутнім ЦД та без нього виявив наступне. Всі хворі мали анамнез тривалого безперервного прийому аспірину. Групи не відрізнялися одна від одної за основними показниками, окрім наявності ЦД. Отже, хворі на ХСН із ЦД мали менший діаметр на 21% ($p=0,0004$), ніж хворі ХСН без ЦД. Середня площа тромбоцитів була також меншою у хворих на ХСН із ЦД – на 42% ($p=0,0008$). Проте, при порівнянні експресії рецепторів ми отримали протилежно спрямовані зміни. Так, питома щільність флюоресценції CD41 виявилась на 62% ($p=0,004$) вищою у хворих на ХСН із ЦД у порівнянні із хворими без ЦД. Сумарна щільність флюоресценції CD41 вище у хворих на ХСН із ЦД на 54% ($p=0,052$), що було на межі статистичної значущості. Питома щільність флюоресценції CD41а була у двічі вищою у хворих на ХСН із ЦД ($p=0,006$). Сумарна щільність флюоресценції CD41а була на 16% вище у хворих на ХСН із ЦД, проте не досягла статистично достовірного рівня ($p=0,1$). Питома

щільність флюоресценції CD 61 (рис. 3, кольор. вкладка б) була достовірно вище у хворих на ХСН із ЦД на 77% ($p=0,009$), а сумарна щільність на 62% вище у порівнянні із хворими на ХСН без ЦД ($p=0,001$). Питома щільність флюоресценції CD 62P (рис.4, кольор. вкладка б) була вище на 61% у хворих на ХСН із ЦД ($p=0,006$), а сумарна щільність флюоресценції CD 62P вища на 11% ($p=0,04$).

Таким чином, ЦД 2 типу, що є фактором несприятливого перебігу у хворих на ХСН, призводить до виражених змін тромбоцитарного гемостазу. Так, незважаючи на достовірне зменшення середньої площі та діаметра, спостерігається збільшення як питомої, так і сумарної щільності флюоресценції ключових рецепторів тромбоцитів, що беруть участь у процесах адгезії та агрегації. Це підтверджується даними інших дослідників, що також реєстрували більш високу остаточну реактивність тромбоцитів у хворих на ЦД, які отримували антитромбоцитарні препарати [5,19,20,21]. При цьому відомо, що за наявності ЦД відсоток хворих, що мають резистентність до аспірину та клопидогрелю, достовірно вищий [22,23].

Ми не зареєстрували достовірних змін вмісту розчинного плазмового Р-селектину між практично здоровими особами, хворими на ХСН із супутнім ЦД та без нього ($p=0,5$). Це можна пояснити тим, що лише 1% від всього Р-селектину, знаходиться у вільному циркулюючому пулі. Решта Р-селектину міститься або в α -гранулах тромбоцитів, або на поверхні мембрани тромбоцитів. Під час гострих судинно-серцевих катастроф (інфаркт міокарда, інсульт), коли процеси активації та агрегації тромбоцитів сягають критичного рівня, відбувається й підвищення вмісту вільно циркулюючої фракції Р-селектину. Проте, за стабільного перебігу захворювання плазмова концентрація цього маркера не є інформативним показником. Ряд дослідників також продемонстрували, що рівень експресії тромбоцитарного Р-селектину, визначеного методикою проточної цитофлуориметрії, є більш інформативним показником як за своєю прогностичною цінністю, так і в якості оцінки ефективності антитромбоцитарної терапії [24].

Отже, запропонована нами методика здатна адекватно проводити оцінку стану системи тромбоцитарного гемостазу при різних патологічних станах. Вона має кілька суттєвих переваг над існуючими способами. Так, після отримання тромбоцити фіксуються на скельцях із адгезивним покриттям, що запобігає їх спонтанній активації та руйнації. Після цього дослідник не лімітується у жорстких часових умовах проведення дослідження. До приміщення, в якому проводиться методика, пред'являються стандартні вимоги. Важливим є те, що можна використовувати флуоресцентні мікроскопи різних виробників, так само, як і моноклональні антитіла. Якість реакції також значно підвищується за рахунок застосування вторинних антитіл. У якості системи аналізу зображення можуть використовуватися кілька доступних ліцензованих

систем, деякі з яких є безкоштовними. Система аналізу зображення здібна в автоматичному режимі розрізняти окремі тромбоцити від тромбоцитарного агрегату. Також є можливість проаналізувати зображення у мануальному режимі. Результати дослідження можна документувати у вигляді фотографій. Методика дозволяє пов'язати інтенсивність експресії будь-якого тромбоцитарного рецептора із такими морфометричними показниками, як площа та діаметр тромбоцита. Це дає змогу глибше і детальніше оцінити морфофункціональні властивості тромбоцитів за різних патологічних станів та проводити моніторинг ефективності лікування антитромбоцитарними агентами.

Висновки

- Система тромбоцитарного гемостазу відіграє важливу роль у патогенезі серцево-судинних захворювань. Це потребує вдосконалення існуючих та створення нових методів дослідження структури та функції тромбоцитів, оцінки ефективності антитромбоцитарної терапії.
- Методика дослідження морфології тромбоцитів та імуногістохімічного визначення експресії їх трансмембранних рецепторів дозволяє проводити адекватну оцінку стану тромбоцитарного гемостазу при різних патологічних станах.
- Супутній ЦД 2 типу призводить до підвищення активності тромбоцитів у хворих на ХСН, незважаючи на регулярний прийом аспірину. Реєструється достовірно вищий рівень експресії ключових рецепторів адгезії та агрегації при меншій площі та діаметрі тромбоцитів у порівнянні із хворими на ХСН без ЦД.
- Запропонована методика може бути перспективною у дослідженні інших тромбоз-асоційованих станів та моніторингу ефективності антитромбоцитарних препаратів.

Література

1. *Michelson A.D.* Platelets/ A.D. Michelson. – San Diego, Calif: Academic Press, 2002. – 940 p.
2. *Gerald F.* Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients/ F. Gerald. – BMJ. – 2002. – Vol. 324. – P. 71–86.
3. *Blann A.* Antiplatelet therapy and the vascular tree/ A. Blann. – Heart. – 2006. – Vol. 92. – P. 3–4.
4. *Wiviott S.D.* Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast-moving story/ S.D. Wiviott, E.M. Antman. – Circulation. – 2004. – Vol. 109. – P. 3064–3067.
5. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance of the European Society of Cardiology/ W. Kuliczkowski, A. Witkowski, L. Polonski et. al.// Eur. Heart J. – 2009. – Vol. 30. – P. 426–435.
6. *Born G.V.R.* Light on platelets/ G.V.R. Born// J. Physiol. – 2005. – Vol. 568. – P. 713–714.
7. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease/ P.A. Gum, K. Kottke-Marchant, P.A. Welsh et al.// J Am Coll Cardiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 961–965.
8. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent athero-thrombotic events in patients with acute myocardial infarction/ S. Matetzky, B. Shenkman, V. Guetta et al.// Circulation. – 2004. – Vol. 109. – P. 3171–3175.
9. Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks/ K. Grundmann, K. Jaschonek, B. Kleine et al.// J Neurol. – 2003. – Vol. 250. – P.63–66.
10. Point-of-care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event after percutaneous coronary intervention: results of the GOLD (AU-Assessing Ultegra) multicenter study/ S.R. Steinhubl, J.D. Talley, G.A. Braden et al.// Circulation. – 2001. – Vol. 103. – P. 2572–2578.
11. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events/ J.W. Eikelboom, J. Hirsh, J.I. Weitz et al. // Circulation. – 2002. – Vol. 105. – P. 1650–1655.
12. *Freedman J.E.* CD40-ligand assessing risk instead of damage/ J.E. Freedman// N. Engl. J. Med. – 2003. – Vol. 348. – P.1163–1165.
13. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes/ C. Heeschen, S. Dimmeler, C.W. Hamm et al.// N Engl J Med. – 2003. – Vol. 348. – P.1104–1111.
14. Soluble CD40 ligand in acute and chronic heart failure/ T. Ueland, P. Aukrust, A. Yndestad et al. // Eur. Heart J. – 2005. – Vol. 26. – P. 1101–1107.
15. Soluble CD40L risk prediction after acute coronary syndrome/ N. Varo, J.A. de Lemos, P. Libby et al.// Circulation. – 2003. – Vol. 108. – P.1049–1052.
16. *Shapiro H. M.* Practical flow cytometry/ H. M. Shapiro. – London: Wiley InterScience, 2003. – 681 P.
17. *Gresele P.* Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders/ P. Gresele. – London: Cambridge University Press. – 2002. – 1101 P.
18. Рекомендації Асоціації кардіологів України з діагностики, лікування та профілактики хронічної серцевої недостатності у дорослих// Серцева недостатність. – 2009. – Т. 1(додаток). – С. 4–22.
19. *Colwell J.A.* Platelet in diabetes/ J.A. Colwell, R.W. Nesto// Diabetes Care. – 2003. – Vol. 26. – P. 2181–2188.
20. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus/ P. Ferroni, S. Basili, A. Falco et al.// J. of Thromb. and Haemostasis. – 2004. – Vol. 2. – P.1282–1291.
21. *Watala C.* Blood platelet abnormalities in and pharmacological modulation of platelet reactivity in diabetes mellitus/ C. Watala, M. Bonkler, P. Gresner// Pharmacol Rep. – 2005. – Vol. 57. – P. 42–58.
22. *Wang T.H.* Aspirin and clopidogrel resistance: an emergent clinical entity/ T.H. Wang, Bhatt D.L., Topol E.J.// Eur. Heart J. – 2006. – Vol. 27. – P. 647–654.
23. Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment/ D.J. Angiolillo, A. Fernandez-Ortiz, E. Bernardo et. al.// Diabetes. – 2005. – Vol. 54. – P. 2430–2435.
24. Regulation of CD40L and CD62P surface expression upon GP IIb/IIIa blockade of platelets from stable coronary artery disease patients/ A.B. Chandler, Earhart A.D., H.E. Speich// Thrombosis Research. – 2010. – Vol. 125. – P. 44–52.

Відомості про авторів:

Колесник М.Ю., аспірант кафедри пропедевтики внутрішніх хвороб ЗДМУ.

Абрамов А.В., д.м.н., зав. ЦНДЛ ЗДМУ, професор кафедри патологічної фізіології ЗДМУ.

Сиволап В.В., д.м.н., професор, зав. кафедри пропедевтики внутрішніх хвороб ЗДМУ.

Адреса для листування: Колесник Михайло Юрійович. 69035, м. Запоріжжя, вул. Сталеварів, 34, кафедра пропедевтики внутрішніх хвороб, тел. (067)-619-03-17, E-mail: zsmumk@gmail.com

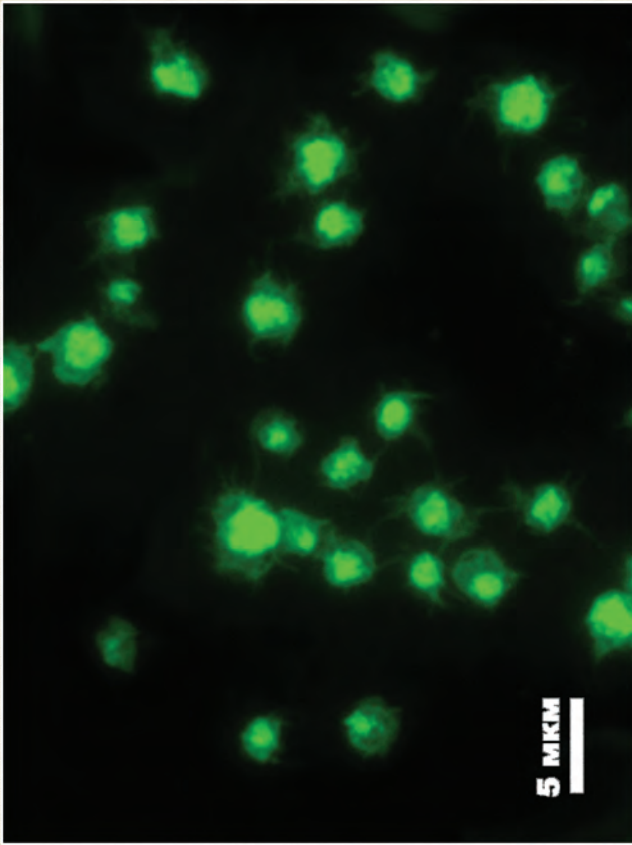


Рис. 1.

Рис. 1. Тромбоцити, реакція непрямой імунофлюоресценції з моноклональними антитілами до CD61 (трансмембранного ІІІа-глікопротеїнового рецептора) у практично здорової особи. Об. х 100.

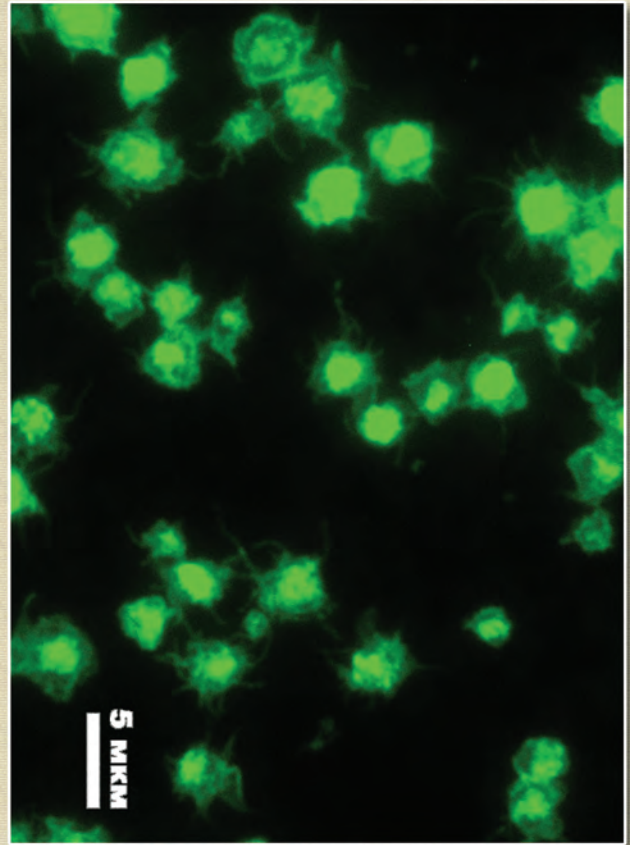


Рис. 2.

Рис. 2. Тромбоцити, реакція непрямой імунофлюоресценції з моноклональними антитілами до CD62P (трансмембранного Р-селектину) у практично здорової особи. Об. х 100.

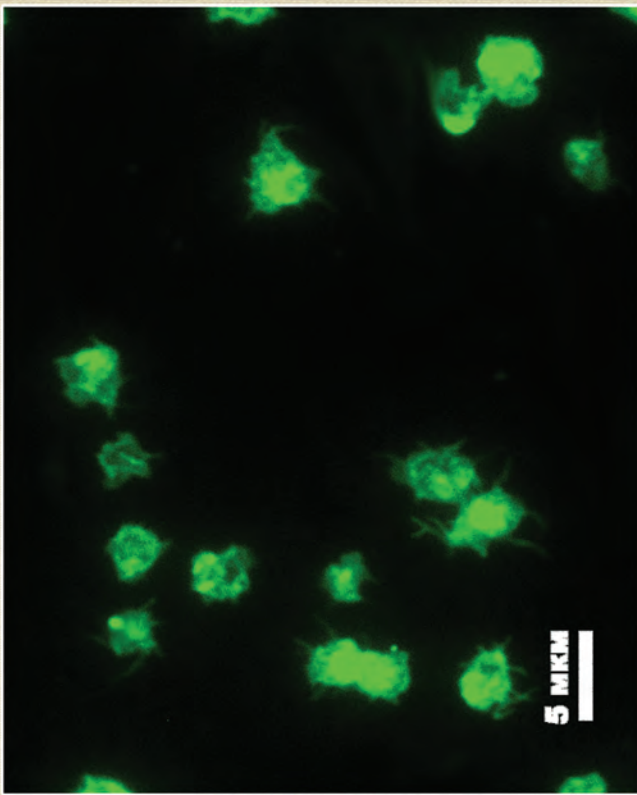


Рис. 3.

Рис. 3. Тромбоцити, реакція непрямой імунофлюоресценції з моноклональними антитілами до CD61 (трансмембранного ІІІа-глікопротеїнового рецептора) у хворого на ХСН із ЦД. Об. х 100.

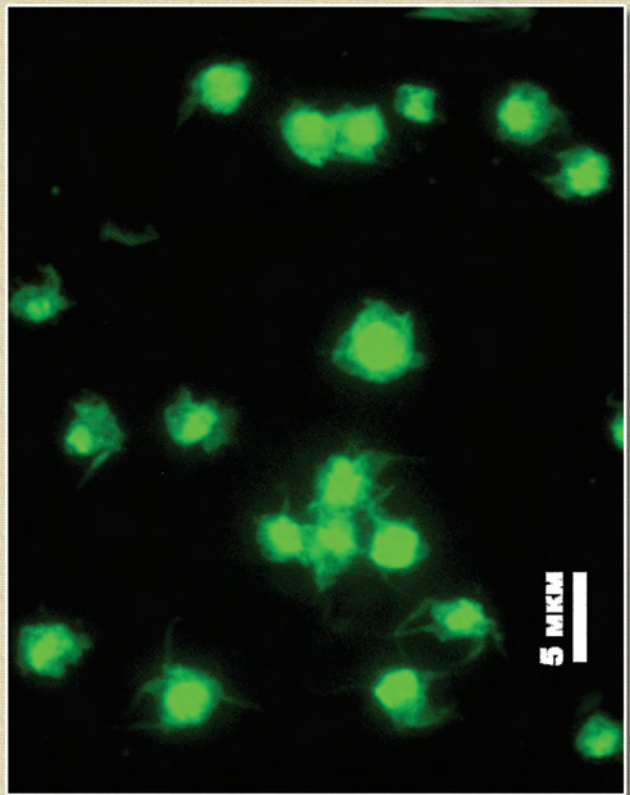


Рис. 4.

Рис. 4. Тромбоцити, реакція непрямой імунофлюоресценції з моноклональними антитілами до CD62P (трансмембранного Р-селектину) у хворого на ХСН із ЦД. Об. х 100.

(Рис. 1-4 до статті М.Ю. Колесника, А.В. Абрамова, В.В. Сиволапа «Новий підхід до оцінки морфології тромбоцитів та експресії їх рецепторів...» С. 39-46)