

Особливості змін морфології тромбоцитів у хворих на гострий коронарний синдром без елевації сегмента ST з біохімічно доведеною аспіринорезистентністю

К.М. Амосова, Н.В. Нетяженко, Г.І. Мішанич, Л.О. Стеченко,
Т.П. Куфтирева, В.Р. Костів

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ

КЛЮЧОВІ СЛОВА: тромбоцит, ультраструктура, гострий коронарний синдром, аспірино-резистентність

Тромбоцит – без'ядерна сферична клітина, яка безпосередньо бере участь у формуванні первинного тромбоцитарного корока в зоні пошкодження судини за рахунок адгезії і подальшої агрегації [3, 29]. В основі антиагрегантної дії ацетилсаліцилової кислоти (АСК) лежить властивість інгібувати циклооксигеназу-1 (ЦОГ-1) у тромбоцитах. ЦОГ-1 (простагландинсинтаза) каталізує трансформацію арахідонової кислоти (АК) у нестабільну проміжну форму простагландинів (ПГ), а саме ПГ₂ тромбоксансинтазу, котра згодом діє на ПГ₂ з метою утворення тромбоксану, який індукуює агрегацію тромбоцитів [2, 3, 10, 11]. Поняття аспіринорезистентності (АР) стало відомим протягом останніх 15 років [15, 19, 20, 22]. Недостатність інгібування ЦОГ-1 під час лікування АСК прийнято вважати найбільш інформативним критерієм АР [12, 24].

Попри зростаючий інтерес до АР, досі нез'ясованими залишаються визначення, критерії встановлення та причини виникнення АР. Дослідження, спрямовані на з'ясування механізму остаточної гіперреактивності тромбоцитів за умов лікування АСК, присвячені, головним чином, вивченню ролі генного поліморфізму [13], взаємодії АСК з іншими медикаментозними препаратами, зокрема нестероїдними протизапальними засобами [24–26, 28].

У той же час немає повідомлень про дослідження структури тромбоцитів у таких хворих, яка напряму пов'язана з їхньою функціональною активністю. Вивчаючи стан поверхневої мембрани тромбоцита та його органел, можна відшукати відповіді на багато запитань стосовно причин та

механізмів відсутності антитромбоцитарної дії АСК, що і спонукає до більш детального аналізу в цьому напрямку.

Мета роботи – визначити особливості змін морфології тромбоцитів за даними електронної мікроскопії у хворих з гострим коронарним синдромом без елевації сегмента ST з біохімічно доведеною аспіринорезистентністю.

Матеріал і методи

Обстежено 140 хворих з гострим коронарним синдромом (ГКС) без елевації сегмента ST, госпіталізованих з 1 січня 2006 до 1 січня 2007 р. у інфарктні відділення Олександрівської клінічної лікарні м. Києва, які систематично (не менше 5 разів на тиждень) приймали протягом останніх 6 міс (у середньому (1,2±2,0) року) АСК у дозі 75–160 мг/добу (середня доза (108±12) мг/добу) з метою первинної або вторинної профілактики виникнення серцево-судинних подій [16, 27]. Оцінювали АР (критерії див. нижче) відповідно до рекомендацій інших авторів [13, 15, 23, 24] за допомогою результатів оцінки агрегації тромбоцитів з індуктором АК (методику описано нижче).

Діагноз ГКС без елевації сегмента ST встановлювали відповідно до рекомендацій Європейського товариства кардіологів (ЄТК, 2003) [1, 6, 7, 9].

Критеріями виключення були наявність стійкої елевації сегмента ST або гостре виникнення повної блокади лівої ніжки пучка Гіса на ЕКГ, гострої лівошлуночкової серцевої недостатності (СН), ознак хронічної СН ІІБ–ІІІ стадії за класи-

фікацією М.Д. Стражеска і В.Х. Василенка, фракції викиду лівого шлуночка нижче 45 %, вроджених та набутих вад серця, міокардиту, кардіоміопатій, перикардиту, артеріальної легеневої гіпертензії, а також тяжкого цукрового діабету 1-го та 2-го типу, тяжких хронічних захворювань нирок та печінки із порушенням їх функцій та інших тяжких супутніх захворювань, що, вірогідно, зменшують тривалість життя протягом наступних 12 міс.

За результатами визначення агрегації тромбоцитів з АК (методику наведено нижче) АР було встановлено у 15 (10,7 %) хворих. Методом випадкового вибору ми виокремили 5 хворих з АР (1-ша група) та 5 пацієнтів без АР (2-га група), у яких вивчали ультраструктуру тромбоцитів. Групи були порівнянні за віком (відповідно $(56,3 \pm 5,1)$ та $(55,4 \pm 4,9)$ року), співвідношенням статей (60 % чоловіків та 40 % жінок), кількістю тромбоцитів (відповідно $256,2 \pm 2,5$ та $260,3 \pm 2,4$), чинниками серцево-судинного ризику (всі $P > 0,05$).

Контрольну групу становили 5 практично здорових донорів. Всім хворим згідно з рекомендаціями ЄТК (2003) [1, 6, 7, 9] було призначено лікування, яке включало нефракційний або низькомолекулярний гепарин, аспірин у навантажувальній дозі 325 мг і в подальшому 75–150 мг, β -адреноблокатори, статини, нітрати та інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту (81,3 % хворих).

Резистентність та чутливість до АСК встановлювали, визначаючи агрегаційну здатність тромбоцитів за допомогою АК.

Методика дослідження агрегації та ультраструктури тромбоцитів

У 10 пацієнтів, госпіталізованих з приводу розвитку ГКС, у першу добу визначали кількість тромбоцитів у венозній крові та їх агрегацію на лазерному приладі – аналізаторі агрегації агрегометрії Solar (Республіка Білорусь) для оцінки біохімічної АР.

Показники агрегації тромбоцитів оцінювали в багатій на тромбоцити плазмі (БгТП), яку отримували шляхом центрифугування цільної крові з цитратом натрію протягом 10 хв при 1000 об./хв. Принцип методу заснований на реєстрації змін оптичної щільності у БгТП до та після введення в неї як індуктора агрегації АК («Ренам», Росія) у концентрації 0,5 мг/мл при постійному перемішуванні магнітною мішалкою зі швидкістю 900 об./хв та температурі 37 °С. У першу добу

після госпіталізації зранку натще, після попередньої навантажувальної дози АСК, після додавання АК оцінювали ступінь агрегації. За даними Р.А. Gum та співавторів [13, 15, 23, 24], критерієм біохімічної АР вважали збільшення ступеня та швидкості агрегації після додавання АК у концентрації 0,5 мг/мл на 20 % і більше від вихідного рівня (тобто, при спонтанній агрегації).

На 2-гу–3-тю добу від моменту госпіталізації пацієнтам з ГКС та особам контрольної групи було виконано електронно-мікроскопічне дослідження тромбоцитів венозної крові за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа «ПЕМ-125 К». Тромбоцити були виділені за умов виконання таких послідовних етапів. Забір крові виконували без джгута пункцією ліктьової вени одноразовою голкою безпосередньо у фіксатор у співвідношенні 1:1. Наступним кроком були фіксація цільної крові глутаральдегідом низької концентрації (0,1–1 %) із цитратом натрію і центрифугування збагаченої тромбоцитами цитратної плазми з подальшим виділенням тромбоцитів з їх додатковою фіксацією в більш концентрованому розчині глутаральдегіду (2–6 %) [5, 17, 18].

Визначали морфометричні показники тромбоцитів, такі як середня площа тромбоцитів, об'ємна щільність глікогену, об'ємна щільність всіх гранул, числова щільність всіх гранул та їх середня площа. У кожного хворого було використано для аналізу в середньому $5,0 \pm 1,2$ тромбоцита. За площею тромбоцити були розподілені на дрібні (0,2–14,2 мкм²), середні (14,3–42,2 мкм²) та великі (42,2–70,2 мкм²) [2, 3].

Морфометричний аналіз матеріалу проведено за допомогою спеціально розробленої комп'ютерної програми «Органела» на напівавтоматичному пристрої для обробки графічних зображень.

Для оцінки достовірності розбіжностей між середніми величинами використовували непараметричні критерії: для пов'язаних сукупностей – критерій Вілкоксона, для незалежних – Манна–Уїтні. Достовірність розходжень частот ознак визначали за допомогою альтернативного варіювання.

Результати та їх обговорення

Ступінь спонтанної та після додавання АК агрегації тромбоцитів у 5 хворих з ГКС, не чутливих до дії АСК, становив відповідно $(34,9 \pm 2,6)$ і $(55,6 \pm 3,3)$ % ($P < 0,05$), у 5 хворих з ГКС, чутливих до дії АСК, – відповідно $(26,4 \pm 1,2)$ та

Таблиця

Морфометричні показники тромбоцитів у обстежених хворих на ГКС

Показник	Величина показника (M±m) в групах		
	контрольний (n=5)	1-й (n=5)	2-й (n=5)
Середня площа тромбоцитів, мкм ²	26,80±1,26	21,65±1,06**	16,86±1,23**°
Середня площа всіх гранул, мкм ²	0,75±0,02	0,61±0,02**	0,63±0,02**
Об'ємна щільність всіх гранул, %	18,52±0,90	18,68±0,79	23,84±1,74**°
Чисельна щільність всіх гранул × 10 ⁻² /мкм ³	13,31±0,92	19,80±0,93**	14,31±1,15°
Об'ємна щільність глікогену, %	8,44±1,21	7,36±1,08*	7,75±2,16

Примітка. Різниця показників достовірна порівняно з такими у хворих контрольної групи: * – P<0,05; ** – P<0,001; ° – у хворих 1-ї групи (P<0,001).

(29,5±2,1) % (P>0,05), у 5 здорових добровольців – (10,1±0,3) та (12,4±1,0) % (P>0,05).

Результати морфометричного дослідження тромбоцитів у хворих з АР порівняно з групою контролю та у хворих групи без АР наведено у таблиці. Тромбоцити у хворих з АР відрізнялися від таких у пацієнтів без неї більшою площею (P<0,05), яка, однак, була достовірно меншою, ніж у здорових.

Такі результати пов'язані зі зникненням тромбоцитів великих розмірів і збільшенням кількості малих клітин у групі аспіриночутливих хворих порівняно з хворими з АР (P<0,05) (рисунок).

Чисельна щільність усіх гранул у тромбоцитах пацієнтів з АР була достовірно більшою, ніж у групі аспіриночутливих пацієнтів та донорів (P<0,001). При цьому не спостерігали збільшення об'ємної щільності гранул за рахунок зниження величини середньої площі до (0,61±0,02) мкм². У той же час, збільшення об'ємної щільності гранул хворих у 2-й групі порівняно з такою у контрольній та у 1-й групі (P<0,001) відбувалося на тлі зменшення середньої площі гранул (всі P<0,001).

У літературі трапляються окремі посилання щодо негативного впливу терапії АСК на тромбо-

цитопоез [14]. Ми виявили, що у групі аспіриночутливих хворих відсутність великих за розмірами тромбоцитів не було, це свідчить про пригнічення тромбоцитопоезу на етапі їх формування з мегакаріоцитів або формування самих мегакаріоцитів. Можливо, цей ефект АСК може бути передумовою настання такого ускладнення, як кровотечі.

У хворих з АР кількість великих за розмірами молодих форм тромбоцитів була значно меншою, ніж у осіб контрольної групи (P<0,05), проте їх наявність у периферичній крові свідчить про підвищену адгезивну та агрегаційну здатність тромбоцитів. Так, можливою причиною частішого настання повторних ішемічних подій у групі хворих з АР [24, 26, 28] може бути не лише відсутність взаємодії АСК з тромбоцитами, а й наявність великих за розмірами тромбоцитів, які за умов порушення цілісності судини (наприклад при ГКС) і різкого викиду адреналіну можуть призвести до прискореного та зростаючого процесу тромбоцитотворення.

У тромбоцитах виділяють три види органел зберігання: α-гранули, електронно-щільні тільця (δ-гранули) та лізосоми (γ-гранули), з яких при впливі різноманітних стимуляторів вивільнюються основні компоненти, що беруть участь у тромбоцитотворенні. Так, наприклад, в α-гранулах зберігається до 30 різноманітних білків, серед яких V фактор згортання крові, фактор Віл-лебранда, фібриноген тощо, участь яких полягає не лише в адгезивній дії та моделюванні тромбоцитів, а і в плазмовому гемостазі, вазоактивній дії, імунних ефектах. У щільних тільцях зберігаються субстанції, які викликають переважно судинні реакції та агрегацію тромбоцитів: аденілові нуклеотиди (АТФ, АДФ, АМФ, цАМФ та ін.), серотонін, адреналін, гістамін, Ca²⁺ тощо. У лізосомах зберігаються гідролітичні ферменти.

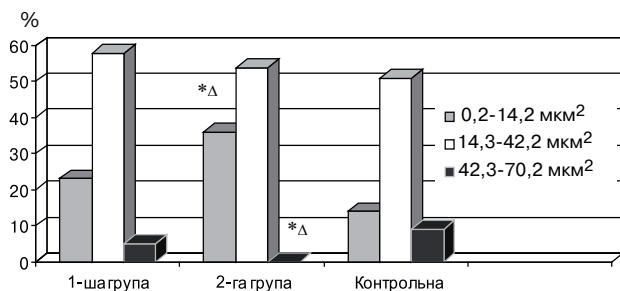


Рисунок. Розподіл тромбоцитів за площею. Різниця показників достовірна: * – порівняно з такими у контрольній групі, Δ – у 1-й групі (P<0,05).

Зростання чисельної щільності всіх гранул у тромбоцитах хворих з АР, порівняно як з 1-ю, так і з контрольною групою ($P < 0,05$), при значному зменшенні їх об'єму, можливо, свідчить про посилення стимуляції мегакаріоцитарного росту з вивільненням молодих форм, яким, окрім великих розмірів, описаних вище, притаманне зростання кількості гранул у цитоплазмі. Це може сприяти збільшенню активності пластинок. При цьому в випадку чутливих до АСК пацієнтів зростала не кількість гранул в тромбоциті, а їх об'єм, що, можливо, зумовлено здатністю АСК пригнічувати вивільнення вмісту органел.

Зниження об'ємної щільності глікогену в тромбоцитах хворих 1-ї групи може свідчити про його активне витрачання під час реакції викиду, ретракції згустка, активному мембранному транспорті, агрегації, тобто реакціях, що потребують витрат енергії.

Таким чином, тромбоцити хворих з аспіринорезистентністю порівняно з такими у аспіриночутливих хворих, мають більшу середню площу, чисельну щільність гранул при меншій об'ємній щільності останніх, що може бути пов'язано з меншим пригніченням ацетилсаліциловою кислотою тромбоцитопоезу та підвищеною функціональною активністю тромбоцитів.

Література

- Амосова Е.Н. Новые стандарты тромболитической, антикоагулянтной и антиагрегантной терапии инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST по обе стороны Атлантики // Серце і судини. – 2009. – № 2. – С. 4-11.
- Вашкинель В.К., Петров М.Н. Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. – Л.: Наука, 1982. – 88 с.
- Вашкинель В.К., Петров М.Н., Алмазов В.А., Сафронников Л.В. Электронно-гистохимическое и морфофункциональное исследование тромбоцитов человека после приема ацетилсалициловой кислоты // Пробл. гематол. и переливания крови. – 1981. – № 9. – С. 40-44.
- Долгов В.В., Свиринов П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. – М., 2005. – Р. 227.
- Коваленко В.Н., Гавриш А.С., Гулая Н.М. и др. Ультраструктура тромбоцитов и дисфункция NO-системы у больных с ревматоидным артритом // Укр. мед. часопис. – 2001. – № 3. – С. 129-132.
- Нетяженко В.З. Гострий коронарний синдром. Діагностичні заходи та алгоритми лікування // Клінічна фармакологія, фізіологія, біохімія. – 2-ге вид., доп. – Ч. 1. – К., 2009. – С. 191.
- Шумаков В.А. Сучасні рекомендації з лікування гострого коронарного синдрому без елевачії сегмента ST // Укр. кардіол. журн. – 2008. – Додаток № 2. – С. 13-17.
- Antithrombotic Trialist's Collaborations. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for preven-

tion death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients // Brit. Med. J. – 2002. – № 324. – P. 71-86.

- Antman E.M., Hand M., Armstrong P.W. et al. 2008 focused update of the ACC/AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines // Circulation. – 2008. – Vol. 117. – P. 296-329.
- Clauser S., Cramer-Bordé E. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders // Semin. Thromb. Hemost. – 2009. – № 35 (2). – P. 213-223.
- Collet J.P., Montalescot G. Platelet function testing and implication for clinical practice // J. Cardiovasc Pharmacol Ther. – 2009. – Vol. 14 (3). – P. 157-169.
- Gorog D.A., Sweeny J.M., Fuster V. Antiplatelet drug 'resistance'. Part 2: Laboratory resistance to antiplatelet drugs—fact or artifact? // Nat. Rev. Cardiol. – 2009. – Vol. 6 (5). – P. 365-373.
- Grotemeyer K.H., Scharafinski H.W., Husstedt I.W. Two-year follow up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients // Thromb. Res. – 2003. – № 71. – P. 397-403.
- Grotemeyer K.H. Effects of acetylsalicylic acid in stroke patients. Evidence of nonresponders in a subpopulation of treated patients // Thromb. Res. – 2006. – № 57. – P. 465-469.
- Gum P.A., Kottke-Marchant K., Poggio E.D. et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease // Amer. J. Cardiol. – 2001. – № 88. – P. 230-235.
- Hirsh J. Guidelines for Antithrombotic Therapy. – 8th ed. – Hamilton, 2008. – 180 p.
- Jastrow H., Weber A.A. Physiology and pathophysiology. Fundamentals of platelet pharmacology // Pharm. Unserer Zeit. – 2009. – № 38 (4). – P. 302-304.
- Joseph R., Riddle J.M., Welch K.M., D'Andrea G. Platelet ultrastructure and secretion in acute ischemic stroke // Stroke. – 1989. – № 20. – P. 1316-1319.
- Kasotakis G., Pipinos I.I., Lynch T.G. Aspirin resistance: Current evidence and clinical implications // J. Vasc. Surg. – 2009. – Vol. 50 (6). – P. 1500-1510.
- Kumar A., Kao J. Platelet resistance to antiplatelet drugs // Recent Pat Cardiovasc. Drug Discov. – 2009. – Vol. 4 (2). – P. 98-108.
- Kurth T., Glynn R.J., Walker A.M. et al. Inhibition of clinical benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal anti-inflammatory drugs // Circulation. – 2003. – № 108. – P. 1191-1195.
- Lancaster G.I., Srinivasan J., Jain H. Aspirin resistance: an update // Curr. Atheroscler. Rep. – 2009. – Vol. 11 (2). – P. 105-110.
- Mani H., Lindhoff-Last E. Diagnosis, causes, relevance of a complex phenomenon. Resistance to aspirin and clopidogrel // Pharm. Unserer Zeit. – 2009. – Vol. 38 (4). – P. 342-350.
- Me Kee S.A., Jane D.C., Deliangiris E.N. Aspirin resistance in cardiovascular disease: a review of prevalence mechanism, and clinical significance // Thromb. Haemost. – 2002. – Vol. 88. – P. 711-715.
- Nagamatsu Y. et al. The differential effects of aspirin on platelets, leucocytes and vascular endothelium in vitro model of thrombus formation // Clin. Lab. Haem. – 1999. – Vol. 21. – P. 33-40.
- Patrino C. Aspirin resistance: definition, mechanism and clinical read-outs // J. Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 1. – P. 1710-1713
- Quinn M.J., Aronov H.D., Califf R.M. et al. Aspirin dose and six-month outcome after an acute coronary syndrome // J. Amer. Coll. Cardiol. – 2004. – № 43. – P. 972-978.
- Tantry U.S., Mahla E., Gurbel P.A. Aspirin resistance // Prog. Cardiovasc. Dis. – 2009. – Vol. 52 (2). – P. 141-152.
- Watso S.P., Authi K.S. Platelets. – Oxford, 1996. – 370 p.

Particularities of the platelet morphology in patients with acute coronary syndrome without ST segment elevation with biochemical proven aspirin resistance

K.M. Amosova, N.V. Netyazhenko, G.I. Mishanych, L.O. Stechenko, T.P. Kuftyreva, V.R. Kostiv

The purpose of the study was to define of the particularities of the morphology of platelets according to electron microscopy in patients with acute coronary syndrome without ST segment elevation with biochemical aspirin resistance. Among 140 patients with ACS without ST segment elevation after the determination of platelet aggregation with arachidonic acid (AA) aspirin resistance (AR) was determined in 15 patients (10.7 %). Ultrastructure of platelets was studied in randomly selected 5 patients with and 5 without AR. Methods included the assessment of resistance and sensitivity to aspirin by identifying aggregation ability of platelets. We determined morphometric platelet parameters, such as average area of platelet glycogen volume density, volume density of granules, numerical density of granules and their average area. It was established that platelets of patients with AR compared with those of aspirin-sensitive patients had more average area, numerical density of granules at a lower volume density of the latter, which may be associated with less inhibition of thrombocytopoiesis and increased functional activity of platelets.