

НЕРВНЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК 616.831–005.1–07:616.155.25

Оригинальная статья

АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ: КЛИНИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ПАРАМЕТРЫ ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА У ПАЦИЕНТОВ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ

В. В. Голдобин — ГБОУ ВПО Северо-Западный ГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, кафедра невропатологии, доцент, кандидат медицинских наук; **Е. Г. Ключева** — ГБОУ ВПО Северо-Западный ГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, кафедра невропатологии, профессор, доктор медицинских наук; **П. М. Асадуллаева** — ГБОУ ВПО Северо-Западный ГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, аспирант кафедры невропатологии; **Т. В. Вавилова** — ГБОУ ВПО Северо-Западный ГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, кафедра клинической лабораторной диагностики, профессор, доктор медицинских наук; **О. В. Сироткина** — ГБОУ ВПО Северо-Западный ГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, кафедра клинической лабораторной диагностики, доцент, доктор биологических наук; **А. Б. Ласковец** — ГБОУ ВПО Северо-Западный ГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, врач клинко-диагностической лаборатории.

ATHEROTHROMBOTIC STROKE: CLINICAL DATA AND PARAMETERS OF PLATELET HAEMOSTASIS IN PATIENTS IN ACUTE STAGE

V. V. Goldobin — North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Department of Neuropathology, Assistant Professor, Candidate of Medical Science; **E. G. Klocheva** — North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Department of Neuropathology, Professor, Doctor of Medical Science; **P. M. Asadullaeva** — North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Department of Neuropathology, Post-graduate; **T. V. Vavilova** — North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Department of Clinical Laboratory Investigation, Professor, Doctor of Medical Science; **O. V. Sirotkina** — North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Department of Clinical Laboratory Investigation, Assistant Professor, Doctor of Biological Science; **A. B. Laskovets** — North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Clinical Diagnostic Laboratory, Physician.

Дата поступления — 21.03.2012 г.

Дата принятия в печать — 29.11.2012 г.

Голдобин В. В., Ключева Е. Г., Асадуллаева П. М., Вавилова Т. В., Сироткина О. В., Ласковец А. Б. Атеротромботический инсульт: клинические показатели и параметры тромбоцитарного гемостаза у пациентов в остром периоде // Саратовский научно-медицинский журнал. 2012. Т. 8, № 4. С. 954–957.

Цель: изучение клинических данных и показателей тромбоцитарного гемостаза у пациентов с атеротромботическим инсультом для совершенствования вторичной профилактики. **Материал и методы.** Обследованы: 41 пациент (26 (63,4%) мужчин, 15 (36,6%) женщин, средний возраст 66,0±9,4 года) и 18 здоровых лиц контрольной группы. Выполнялся стандартный неврологический осмотр, оценка состояния в баллах по шкале инсульта Американского национального института здоровья и шкале Ранкина, исследование клинического анализа крови, аденозиндифосфат индуцированной агрегометрии и проточной цитометрии, молекулярно-генетический анализ мутации гена Iba. Методом проточной цитометрии в основной группе выявлена активация тромбоцитарного звена гемостаза. **Результаты.** Показана неинформативность стандартной агрегометрии для оценки активации тромбоцитов у пациентов с атеротромботическим инсультом. В основной группе наблюдалась корреляция экспрессии рецепторов к фактору Виллебранда на тромбоците с баллом по шкале инсульта Американского национального института при выписке. Мутация гена рецептора 1ba у пациентов с инсультом встречалась чаще, чем у здоровых лиц. **Заключение.** Выявленные изменения предполагают возможность индивидуализации назначения антиагрегантных препаратов данным больным.

Ключевые слова: атеротромботический инсульт, рецепторы тромбоцитов, проточная цитометрия, P-селектин.

Goldobin V. V., Klocheva E. G., Asadullaeva P. M., Vavilova T. V., Sirotkina O. V., Laskovets A. B. Atherothrombotic stroke: clinical data and parameters of platelet haemostasis in patients in acute stage // Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2012. Vol. 8, № 4. P. 954–957.

The aim of the study was the investigation of clinical data and platelet haemostasis parameters in patients with atherothrombotic stroke for secondary prophylaxis improvement. **Materials and Methods.** 41 patient: 26 (63,4%) males, 15 (36,6%) females, mean age 66,0±9,4 years and 18 healthy person were examined. Neurological examination was performed, patient condition was estimated with National Institute of Health Stroke Scale and Rankin scale. The set of investigation included clinical blood analysis, adenosinediphosphate-induced agregometry, flow-cytometry, molecular genetic analysis of gene Iba. **Results.** There was platelet activation in patients with atherothrombotic stroke according to flow-cytometry data. The conventional optic agregometry was not helpful for revealing of platelet activation. The expression of 1ba receptors correlated with the point of National Institute of Health Stroke Scale at discharge. The incidence of Iba gene mutation was higher in patients with atherothrombotic stroke comparing with control group. **Conclusions.** The revealed data predispose to the possibility of individual administration of antiagregant therapy in such patients.

Key words: atherothrombotic stroke, platelet receptors, flow cytometry, P-selectin.

Введение. Церебральный инсульт является одной из наиболее важных медико-социальных проблем, что обусловлено высокой летальностью и инвалидизацией пациентов [1]. Важной проблемой

является повторное развитие инсультов в течение пяти лет у 16–42% больных [2]. До настоящего времени механизмы развития ишемического инсульта окончательно не ясны. Определяющую роль в патогенезе атеротромботического инсульта (АТИ) играет взаимодействие тромбоцитов и эндотелия сосудистой стенки [3]. Вследствие этого важной составляющей вторичной профилактики АТИ является назначение антитромбоцитарных препаратов.

Ответственный автор — Голдобин Виталий Витальевич.
Адрес: 188645, Ленинградская обл., г. Всеволожск, ул. Центральная, 7, кв. 12.
Тел.: +79013016653.
E-mail: vgoldobin@inbox.ru

Цель: изучение клинических данных и показателей тромбоцитарного гемостаза у пациентов с АТИ для совершенствования вторичной профилактики.

Методы. В остром периоде АТИ обследовали 41 пациента: мужчин 26 (63,4%), женщин 15 (36,6%), средний возраст $66,0 \pm 9,4$ года, проходивших обследование и лечение в клинике неврологии Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова и Городской больницы святой преподобномученицы Елизаветы. Диагноз «АТИ» был подтвержден данными компьютерной томографии (КТ) головного мозга (рис. 1). На момент обследования 40 пациентов принимали препараты ацетилсалициловой кислоты, 1 пациент — клопидогрель.

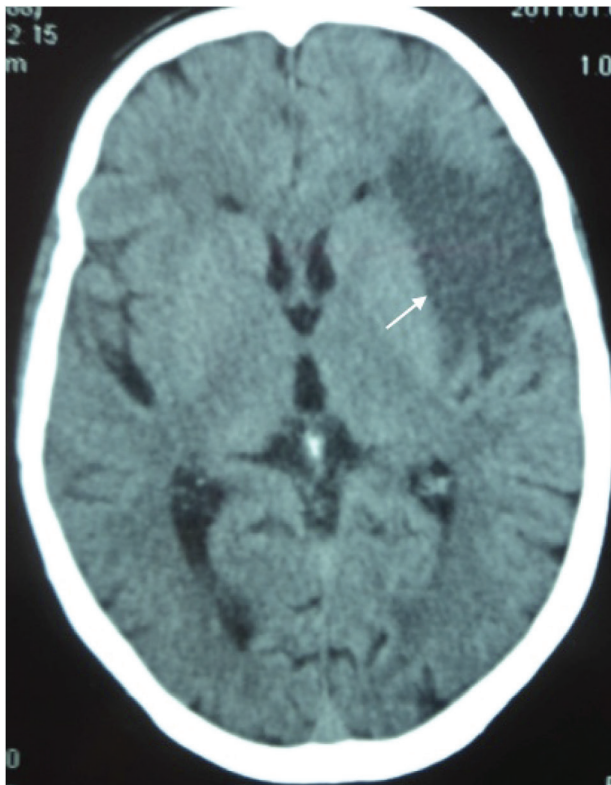


Рис. 1. КТ головного мозга пациента Н. (стрелкой указан очаг АТИ)

В исследование не включали пациентов с кардиоэмболическим вариантом инсульта, а также больных с хронической почечной недостаточностью на гемодиализе, больных с идиопатической тромбоцитемией, острым коронарным синдромом, так как активация тромбоцитов при данных состояниях доказана. Кроме того, исключались пациенты, принимающие антидепрессанты из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина, поскольку у больных, длительно принимающих данные препараты, отмечается снижение агрегации тромбоцитов. В качестве контрольной группы были обследованы 18 человек, не имеющих клинических признаков сосудистой патологии головного мозга.

Комплексное исследование включало: клинико-неврологическое обследование, а также инструментальное и лабораторное исследования. На каждого больного заполнялась специально разработанная карта.

Неврологический осмотр выполнялся по стандартной методике. Проводилась также оценка состояния пациентов на момент поступления и при

выписке в баллах по общепринятым шкалам. Шкала инсульта Американского национального института здоровья (NIHSS) характеризует основные функции, нарушающиеся при церебральном инсульте [4]. Шкала Ранкина позволяет оценить степень зависимости в повседневной жизни и функциональную независимость [5, 6].

Лабораторное исследование включало клинический анализ крови при поступлении и на 10-й день от развития ЛИ, а также аденозиндифосфат- (АДФ-) индуцированную агрегатометрию и проточную цитометрию на 10-й день от развития инсульта. Венозную кровь забирали в утреннее время, натощак. В условиях процедурного кабинета под венозным жгутом проводилась венепункция локтевой вены иглой 21G со свободным током крови через вакутейнер в вакуумные полипропиленовые пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта K_2 и K_3 соль этилдиаминтетрауксусной кислоты (для гематологического анализа) и 3,8% цитрата натрия (для агрегатометрии и проточной цитометрии). Выполнение клинического анализа крови с подсчетом количества тромбоцитов осуществляли кондуктометрическим методом на автоматических гематологических анализаторах «Beckman Coulter LH 500» и «MaxM» (США). Показатель среднего объема тромбоцитов (MPV) рассчитывался прибором автоматически из гистограммы тромбоцитов.

АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали фотометрическим методом на агрегометре «SOLAR» (Беларусь). Концентрация индуктора составляла 2,5 мкМ, 5 мкМ (АДФ производства «Sigma-Aldrich», США). Результат оценивали по изменению степени светопропускания в точке максимума, а также по скорости агрегации через 30 с после добавления АДФ. Перед исследованием на проточном цитометре проводили центрифугирование полученной крови при 1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре для получения плазмы, богатой тромбоцитами (БТП). Плазму, обедненную тромбоцитами (ОТП), получали путем центрифугирования БТП при 3000 об/мин в течение 15 мин. ОТП использовали для разведения БТП до 300 тысяч кл/мкл, если это было необходимо, а также калибровки агрегометра на уровень $T=100\%$. Содержание GP IIb/IIIa и GP Iba на поверхности тромбоцитов, а также число клеток, экспрессирующих P-селектин, определяли на проточном цитометре «CYTOMICS FC 500» («Beckman Coulter», США). Использовались флуоресцентно меченные моноклональные антитела CD61-FITC, VM16d-FITC и CD62P-PE. Количество GP IIb/IIIa и GP Iba на поверхности тромбоцитов до и после индукции 10 мкМ АДФ оценивали по показателю средней интенсивности флуоресценции. Экспрессию P-селектина на поверхности тромбоцитов оценивали как процент клеток, меченных CD62P-PE до и после индукции 10 мкМ АДФ. Математически рассчитывались параметры:

- 1) $\Delta GP IIb/IIIa$, который показывает увеличение в % количества рецепторов GP IIb/IIIa на поверхности тромбоцитов после индукции АДФ;
- 2) ΔP -селектина, показывающий увеличение % тромбоцитов, экспрессирующих P-селектин после индукции АДФ.

Молекулярно-генетическое исследование включало выявление точечной мутации гена тромбоцитарного гликопротеида 1ba, локализованного в 13-м локусе короткого плеча 17 хромосомы (с.3550C>T — замена С на Т в 3550 позиции). Наличие данной

миссенс-мутации приводит к замене триптофана на метионин в 145-м положении аминокислотной последовательности белка (Thr145Met), в результате чего изменяется функциональная активность рецептора к фактору Виллебранда, что предрасполагает к тромбообразованию и увеличивает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний почти в 3 раза [7].

Дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) выделяли из лейкоцитов крови стандартным фенолхлороформным методом. Лизис клеток проводили по методу Канкеля с использованием реактивов фирмы «Хеликон» (Россия). Выход ДНК составлял 40–50 мкг ДНК из 500 мкл цельной крови. Для идентификации однонуклеотидных замен использовали амплификацию соответствующего участка гена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом. Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик» (термостат программируемый четырехканальный для проведения ПЦР-анализа ТП4-ПЦР-01 — «Терцик» ТУ 9452-001-46482062-98, НПФ «ДНК-Технология», Россия) при помощи термостабильной высокопроцессивной рекомбинантной Taq ДНК полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва). В результате реакции получали фрагмент 587 п.н., который подвергался ферментативному расщеплению с помощью рестриктазы *Hin* 11 (1 ед.) в рестрикционном буфере. Продукт рестрикционного анализа электрофоретически разделяли при 30 мА (150В) в геле в трис-боратном буфере. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете после окрашивания бромистым этидием. В случае нормального аллельного варианта (Thr) определялись фрагменты 270 п.н., 201 п.н. и 1163 п.н., при мутации образуются фрагменты 386 п.н. и 201 п.н. (Met).

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ Statistica 6,0 for Windows (StatSoft Inc.). Проверка нормальности распределения проводилась по критерию Шапиро — Уилка. Для проверки гипотезы о равенстве средних для двух групп использовались параметрические (t-Стьюдента для независимых выборок; t-Стьюдента для связанных выборок) или непараметрические (Манна — Уитни, Вилкоксона) критерии. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Клиническая картина у пациентов основной группы представлена на рис. 2.

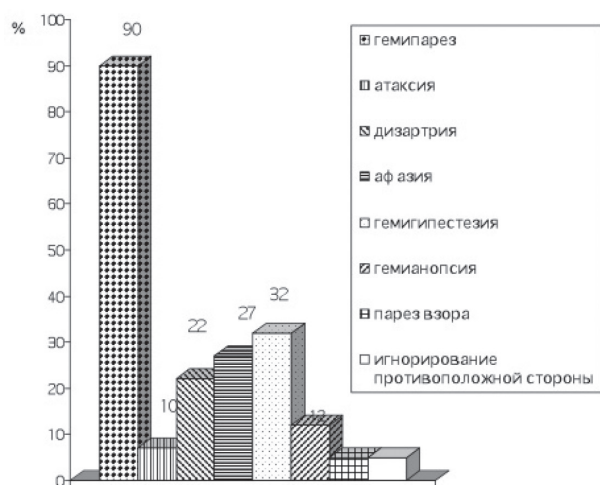


Рис. 2. Клинические синдромы у пациентов основной группы

Показатель шкалы Ранкина при поступлении составил $3,2 \pm 1,0$ балла, а при выписке $2,1 \pm 0,8$ балла. Результат NIHSS при поступлении был равен $8,9 \pm 4,2$ балла, при выписке $4,3 \pm 2,5$ балла. Наблюдалось значимое уменьшение баллов указанных шкал за время госпитализации ($p < 0,05$), что свидетельствовало об улучшении состояния пациентов.

Уровень тромбоцитов у больных с АТИ при поступлении был равен $223,7 \pm 59,3 \times 10^9/\text{л}$, на 10-й день от начала заболевания $227,7 \pm 65,3 \times 10^9/\text{л}$. MPV при поступлении был $10,0 \pm 1,1$ фл, на 10-й день от начала заболевания $8,6 \pm 1,1$ фл.

Результаты агрегометрии представлены в таблице. Наблюдалась достоверно более высокая скорость агрегации тромбоцитов на стимуляцию 2,5 мкмоль АДФ у лиц контрольной группы ($p < 0,05$), в то время как при стимуляции 5 мкмоль АДФ значимого различия не выявлено. Полученные результаты меньших значений агрегации тромбоцитов у пациентов с АТИ, вероятно, связаны с действием постоянной антиагрегантной терапии.

Показатели агрегометрии у пациентов с АТИ и в контрольной группе

Обследуемые	2,5 АДФ		5 АДФ	
	степень, %	скорость, %/мин	степень, %	скорость, %/мин
Пациенты с АТИ	$58,4 \pm 27,1$	$24,8 \pm 10,0^*$	$69,7 \pm 38,9$	$27,0 \pm 12,7$
Контрольная группа	$70,5 \pm 23,8$	$31,8 \pm 13,9^*$	$67,6 \pm 20,9$	$32,6 \pm 19,0$

Примечание: * — $p < 0,05$.

Количество рецепторов IIb/IIIa на тромбоците до активации АДФ составило $7,0 \pm 1,7$; после активации $7,9 \pm 1,8$. Коэффициент изменения количества рецепторов IIb/IIIa на тромбоците (Δ IIb/IIIa) был равен $10,3 \pm 4,8\%$, что не отличалось от показателей в контрольной группе $9,8 \pm 2,1\%$. Известно, что количество рецепторов IIb/IIIa является генетически детерминированным и мало изменяется под воздействием экзо- и эндогенных факторов.

Тромбоциты, экспрессирующие Р-селектин, до стимуляции АДФ составляли $5,1 \pm 4,3\%$, после стимуляции $35,6 \pm 17,3\%$. Коэффициент изменения % тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин (Δ Р-селектина), был равен $82,4 \pm 17,5\%$, что достоверно больше значения Δ Р-селектина в контрольной группе — $61,5 \pm 8,0\%$ ($p < 0,05$). Более высокое значение Δ Р-селектина у пациентов с АТИ свидетельствовало о более высокой активности тромбоцитов у пациентов данной группы. Таким образом, у пациентов с АТИ наблюдалось несоответствие данных стандартной агрегометрии, указывающей на меньшую агрегацию тромбоцитов при стимуляции низкими дозами АДФ, и результатов проточной цитометрии, свидетельствующей о более высокой активности тромбоцитов.

Достоверного различия количества рецепторов 1ba на тромбоците в основной и контрольной группах не наблюдалось (соответственно $4,0 \pm 1,3$ и $3,8 \pm 1,7$; $p > 0,05$). Однако при корреляционном анализе в основной группе наблюдалась прямая достоверная корреляция экспрессии рецепторов к 1ba и балла по NIHSS при выписке ($p < 0,05$), что указывало на худшее восстановление пациентов с более высоким уровнем экспрессии фактора Виллебранда. При

молекулярно-генетическом исследовании мутантная аллель в основной группе выявлялась чаще, чем в контрольной, однако достоверного различия не наблюдалось ($p > 0,05$).

Обсуждение. Высокая агрегационная способность тромбоцитов является одним из факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. «Золотым стандартом» для анализа активности тромбоцитов признан оптический метод. Однако недостатком данной методики является зависимость оптических характеристик от нетромбоцитарных причин: липидемии, протеинемии. Кроме того, в процессе подготовки к исследованию *in vitro* происходит изменение активности тромбоцитов. В основе метода проточной цитометрии заложена высокоспецифичная реакция антиген-антитела, что, возможно, позволяет отражать ситуацию *in vivo* более адекватно, по сравнению с оптической агрегометрией.

Мутация гена с.3550C>T рецептора 1b α на тромбоците предполагает функциональную перестройку и более высокоактивное состояние рецепторного белка. Указанная мутация часто наблюдается совместно с различным числом tandemных повторов гена 1b α , определяющим длину активной «ножки» субъединицы 1b. Большая длина ножки обеспечивает более эффективное связывание с тромбоцитом. В нашем исследовании мы определяли мутацию с.3550C>T в изолированном состоянии. Частота возникновения мутации была выше, чем в контрольной группе, но не достигла значимого уровня, что, вероятно, связано с недостаточно большим числом наблюдений.

В доступной нам литературе не встретилось данных об экспрессии рецепторов к фактору Виллебранда на тромбоците у пациентов с АТИ. Тромбообразование определяется взаимодействием фактора Виллебранда со специфическими рецепторами клеток крови, в первую очередь тромбоцитов. Уровень фактора Виллебранда в крови у пациентов с АТИ значительно повышен в остром и в раннем восстановительном периодах [8, 9]. Мы наблюдали прямую значимую корреляцию уровня 1b α -рецепторов с клиническими данными, что, возможно, отражает ухудшение восстановления пациентов с повышенным образованием комплекса «фактора Виллебранда — рецептор к фактору Виллебранда — IX-V».

Перспективным направлением у данных пациентов могут стать препараты, блокирующие рецептор к фактору Виллебранда или комплекс фактор Виллебранда — рецептор к фактору Виллебранда.

Выводы:

1. Метод стандартной агрегометрии недостаточно информативен для оценки активации тромбоцитов у больных с атеротромботическим инсультом.

2. Метод проточной цитометрии позволяет выявить активацию тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов с атеротромботическим инсультом.

3. Экспрессия рецепторов к фактору Виллебранда на тромбоците может иметь прогностическое значение для течения инсульта.

3. Мутация гена рецептора 1b α с.3550C>T на тромбоците у больных с атеротромботическим инсультом наблюдается чаще, чем у здоровых лиц.

Конфликт интересов. В результатах работы нет коммерческой заинтересованности отдельных физических и/или юридических лиц, в рукописи отсутствуют описания объектов патентного или любого другого вида права (кроме авторского).

Библиографический список

1. Гусев Е. И., Скворцова В. И., Стаховская Л. В. Эпидемиология инсульта в России // Журн. неврологии и психиатрии. Прилож.: Инсульт. 2003. С. 4–9.
2. Суслина З. А., Пирадов М. А. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика. М.: МЕДпресс-информ, 2008. 88 с.
3. Суслина З. А., Танашиян М. М., Ионова В. Г. Ишемический инсульт: кровь, сосудистая стенка, антитромботическая терапия. М: Медицинская книга. 2005.
4. Measurement of acute cerebral infarction: a clinical examination scale / T. Brott, H. P. Adams, C. P. Olinger [et al.] // Stroke. 1989. Vol. 20, №7. P. 864–870.
5. Bonita R., Beaglehole R. Modification of Rankin Scale: recovery of motor function after stroke // Stroke. 1988. Vol. 19, № 12. P. 1497–1500.
6. Rankin J. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60 // Scott. Med. J. 1957. Vol. 2, № 5. P. 200–215.
7. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease / R. Gonzalez-Conejero, M. L. Lozano, J. Rivera [et al.] // Blood. 1998. Vol. 92, № 8. P. 2771–2776.
8. Шимохина Н. Ю., Петрова М. М., Савченко А. А. Состояние гемостаза, метаболическая активность тромбоцитов и прогнозирование повторных цереброваскулярных осложнений тромботического характера у сердечно-сосудистых больных в остром периоде ишемического инсульта // Клинико-лабораторный консилиум. 2010. Т. 33–34, № 2–3. С. 102–106.
9. Endothelial markers and adhesion molecules in acute ischemic stroke — sequential change and differences in stroke subtype / K. Kozuka, T. Kohriyama, E. Nomura [et al.] // Atherosclerosis. 2002. Vol. 161, № 1. P. 161–168.

Translit

1. Gusev E. I., Skvortsova V. I., Stahovskaja L. V. Jepidemiologija insul'ta v Rossii // Zhurn. nevrologii i psihiatrii. Prilozht.: Insul't. 2003. S. 4–9.
2. Suslina Z. A., Piradov M. A. Insul't: diagnostika, lechenie, profilaktika. M.: MEDpress-inform, 2008. 88 s.
3. Suslina Z. A., Tanashjan M. M., Ionova V. G. Ishemicheskij insul't: krov', sosudistaja stenka, antitromboticheskaja terapija. M: Medicinskaja kniga. 2005.
4. Measurement of acute cerebral infarction: a clinical examination scale / T. Brott, H. P. Adams, C. P. Olinger [et al.] // Stroke. 1989. Vol. 20, №7. P. 864–870.
5. Bonita R., Beaglehole R. Modification of Rankin Scale: recovery of motor function after stroke // Stroke. 1988. Vol. 19, № 12. P. 1497–1500.
6. Rankin J. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60 // Scott. Med. J. 1957. Vol. 2, № 5. P. 200–215.
7. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease / R. Gonzalez-Conejero, M. L. Lozano, J. Rivera [et al.] // Blood. 1998. Vol. 92, № 8. P. 2771–2776.
8. Shimohina N. Ju., Petrova M. M., Savchenko A. A. Sostojanie gemostaza, metabolicheskaja aktivnost' trombotocitov i prognozirovanie povtornyh cerebrovaskuljarnyh oslozhnenij tromboticheskogo haraktera u serdechno-sosudistyh bol'nyh v ostrom periode ishemicheskogo insul'ta // Kliniko-laboratornyj konsilium. 2010. T. 33–34, № 2–3. S. 102–106.
9. Endothelial markers and adhesion molecules in acute ischemic stroke — sequential change and differences in stroke subtype / K. Kozuka, T. Kohriyama, E. Nomura [et al.] // Atherosclerosis. 2002. Vol. 161, № 1. P. 161–168.