

---

# ОСТРЫЙ ИНФАРКТ МИОКАРДА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.127-005.8:616.155.2:616.15-008.6-36

DOI: 10.15275/kreatkard.2016.03.01

## Хемилюминесценция тромбоцитов и эндотелиальная дисфункция у пациентов с острым инфарктом миокарда

*Е.В. Рыжкова<sup>1</sup>, Н.Б. Рязанкина<sup>1</sup>, А.М. Лебедева<sup>1</sup>, Т.М. Албакова<sup>1</sup>, Р.М. Албакова<sup>1</sup>,  
З.А. Габбасов<sup>2</sup>, В.В. Коган-Ясный<sup>3</sup>, А.В. Шпектор<sup>1</sup>, Е.Ю. Васильева<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Кафедра кардиологии, ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; ул. Делегатская, 20, стр. 1, Москва, 127473, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России; ул. 3-я Черепковская, 15А, Москва, 121552, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Независимый исследователь

Рыжкова Евгения Викторовна, аспирант, e-mail: everburning@yandex.ru;

Рязанкина Надежда Борисовна, канд. мед. наук, науч. сотр., кардиолог;

Лебедева Анна Михайловна, науч. сотр., кардиолог;

Албакова Тамара Магометбашировна, аспирант;

Албакова Роза Магометбашировна, аспирант;

Габбасов Зуфар Ахнафович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр.;

Коган-Ясный Виктор Валентинович, канд. хим. наук, независимый исследователь;

Шпектор Александр Вадимович, доктор мед. наук, профессор, заведующий кафедрой;

Васильева Елена Юрьевна, доктор мед. наук, профессор, руководитель Центра атеротромбоза

**Цель.** Ранее было продемонстрировано, что у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) тромбоциты способны вырабатывать активные формы кислорода (АФК). Усиленная люминолом хемилюминесценция отражает образование АФК. Целью нашего исследования было оценить эндотелиальную функцию в зависимости от уровня усиленной люминолом хемилюминесценции тромбоцитов (УЛХТ), стимулированной фактором, активирующим тромбоциты (ФАТ), у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) и у здоровых добровольцев.

**Материал и методы.** В исследование мы включили 50 пациентов с ОИМ и 18 здоровых добровольцев без ИБС. У пациентов и здоровых добровольцев оценивали УЛХТ. С целью оценки эндотелиальной дисфункции определяли эндотелийзависимую вазодилатацию плечевой артерии (ЭЗВД). В качестве маркера системного воспаления измеряли уровень С-реактивного белка высокочувствительным методом (вчСРБ).

**Результаты.** В группе пациентов с ОИМ в 1-е сутки госпитализации была выявлена обратная корреляция средней силы между уровнем стимулированной ФАТ УЛХТ и уровнем ЭЗВД плечевой артерии (коэффициент корреляции Спирмена  $\rho = -0,44$ ;  $p = 0,001$ ). В группе здоровых добровольцев достоверной корреляции между уровнем УЛХТ и ЭЗВД плечевой артерии выявлено не было.

**Выводы.** У пациентов в 1-е сутки от развития ОИМ выявлена обратная корреляционная связь между уровнем стимулированной ФАТ УЛХТ, отражающей процесс образования активных форм кислорода тромбоцитами, и ЭЗВД плечевой артерии, характеризующей функцию эндотелия.

**Ключевые слова:** тромбоциты; хемилюминесценция; эндотелиальная дисфункция; инфаркт миокарда.

## Platelet chemiluminescence and endothelial dysfunction in patients with acute myocardial infarction

*E.V. Ryzhkova<sup>1</sup>, N.B. Ryazankina<sup>1</sup>, A.M. Lebedeva<sup>1</sup>, T.M. Albakova<sup>1</sup>, R.M. Albakova<sup>1</sup>,  
Z.A. Gabbasov<sup>2</sup>, V.V. Kogan-Yasnyy<sup>3</sup>, A.V. Shpektor<sup>1</sup>, E.Yu. Vasilieva<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Department of Cardiology of Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov of Ministry of Health of the Russian Federation; Delegatskaya ulitsa, 20, stroenie 1, Moscow, 127473, Russian Federation;

<sup>2</sup>Research Institute of Clinical Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex of Ministry of Health of the Russian Federation; ulitsa 3-ya Cherepkovskaya, 15a, Moscow, 121552, Russian Federation;

<sup>3</sup>Independent researcher

Ryzhkova Evgeniya Viktorovna, Postgraduate, e-mail: everburning@yandex.ru;

Ryazankina Nadezhda Borisovna, MD, PhD, Research Associate, Cardiologist;

Lebedeva Anna Mikhailovna, Research Associate, Cardiologist;

Albakova Tamara Magometbashirovna, Postgraduate;

Albakova Roza Magometbashirovna, Postgraduate;

Gabbasov Zufar Akhnafovich, MD, PhD, Leading Research Associate;

Kogan-Yasnyy Viktor Valentinovich, Candidate of Chemical Sciences, Independent Researcher;

Shpektor Aleksandr Vadimovich, MD, DM, Professor, Chief of Department;

Vasilieva Elena Yur'evna, MD, DM, Professor, Chief of Center of Atherothrombosis

**Objective.** Previously it was demonstrated that in patients with coronary artery disease (CAD) platelets are potent reactive oxygen species (ROS) producers. Luminol-enhanced chemiluminescence (LEC) can detect ROS generated by platelets. The aim of this study was to evaluate endothelial function and platelets' ROS production in acute myocardial infarction (AMI).

**Material and methods.** 50 AMI patients and 18 patients without CAD were enrolled in the study. In patients we measured luminol-enhanced chemiluminescence (LEC). Endothelial function was assessed by means of flow-mediated dilation (FMD) test. The plasma level of the high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) was estimated as the marker of systemic inflammation.

**Results.** In AMI patients on the first day of admission we found a moderate negative correlation between levels of LEC and FMD (Spearman  $\rho = -0,44$ ;  $p = 0,001$ ). In patients without CAD, no significant correlations between levels of LEC, FMD, and hsCRP were revealed.

**Conclusions.** In our study we showed that in AMI patients on the first day of admission ROS production by platelets as evaluated from LEC is associated with severity of endothelial dysfunction.

**Keywords:** platelets; chemiluminescence; endothelial dysfunction; myocardial infarction.

---

## Введение

Воспалительные процессы играют важную роль в развитии атеросклероза [1, 2]. Воспаление приводит к активации эндотелия и последующей эндотелиальной дисфункции, развитие которой в свою очередь ухудшает прогноз у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) [3, 4]. Первыми на повреждение эндотелиального слоя реагируют тромбоциты. Помимо очевидной роли тромбоцитов в процессах гемостаза, большое внимание в настоящее время уделяют их провоспалительному действию [5, 6]. Провоспалительный эффект тромбоцитов реализуется за счет разнообразных механизмов. Один из них – выделение активированными тромбоцитами провоспалительных цитокинов, содержащихся в тромбоцитарных гранулах, таких как: тромбоцитарный фактор 4 (PF4, CXCL4), макрофагальный белок воспаления 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ , CCL3), RANTES (CCL5), нейт-

рофил-активирующий белок 2 (NAP-2, CXCL7), интерлейкин 8 (IL-8), CD40 лиганд (CD40L) и P-селектин (CD62P) и т. д., которые участвуют в привлечении и активации лейкоцитов. Помимо этого тромбоциты способны образовывать агрегаты с нейтрофилами и моноцитами, что стимулирует провоспалительный ответ и позволяет модулировать функции всех субпопуляций лейкоцитов [7, 8].

В ряде исследований было обнаружено, что в активированных тромбоцитах повышается синтез активных форм кислорода (АФК). Усиленная люминолом хемилуминесценция позволяет оценить образование АФК в тромбоцитах. Вырабатываемые АФК могут выполнять роль вторичных мессенджеров и регулировать функцию тромбоцитов [9, 10]. В наших предыдущих работах была продемонстрирована *in vitro* возможность усиленной люминолом хемилуминесценции тромбоцитов (УЛХТ),

стимулированной фактором, активирующим тромбоциты (ФАТ) [10, 11].

Учитывая, что увеличение продукции АФК и снижение уровня NO являются одними из главных молекулярных механизмов, приводящих к развитию эндотелиальной дисфункции, целью нашего исследования было оценить эндотелиальную функцию в зависимости от уровня усиленной люминолом хемилюминесценции тромбоцитов, стимулированной фактором, активирующим тромбоциты, у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) и у здоровых добровольцев.

### Материал и методы

В исследование мы включили 50 пациентов, поступивших в отделение кардиореанимации ГКБ им. И.В. Давыдовского в связи с развитием ОИМ. Диагноз ОИМ выставляли согласно критериям Третьего универсального определения инфаркта миокарда [12]. Все пациенты получали стандартную терапию, включая двойную антиагрегантную терапию (ацетилсалициловую кислоту в нагрузочной дозе 250–300 мг с переходом на поддерживающую дозу 100–125 мг, а также клопидогрел в нагрузочной дозе 600 мг с переходом на поддерживающую дозу 75 мг или тикагрелор 180 мг нагрузочной дозы с переходом на 90 мг 2 раза в день), статины (аторвастатин в дозе 40–80 мг). В 1-е сутки от момента поступления у пациентов оценивалась УЛХТ, агрегационная способность тромбоцитов, определялась эндотелийзависимая вазодилатация плечевой артерии (ЭЗВД) с целью определения эндотелиальной дисфункции. Повторно оценивалась функция тромбоцитов и эндотелия на 7-е сутки госпитализации у 25 пациентов и через 1 мес после госпитализации у 14 пациентов.

Восемнадцать добровольцев без ИБС, без признаков воспаления и/или тромбообразования были включены в группу контроля. От всех участников, включенных в исследование, было получено информированное согласие.

Измерение стимулированной ФАТ УЛХТ производили на хемолуминометре «Sirius» производства Titertek-Berthold (Германия). Оценивали УЛХТ в плазме, обогащенной тромбоцитами. Плазма была получена в ходе центрифугирования цитратной крови (кровь/цитрат натрия 9:1). Измерение УЛХТ проводили в течение 10 мин после добавления к плазме, обогащенной тромбоцитами, раствора ФАТ. УЛХТ измеряли в относительных световых единицах (relative light unit – RLU). Более подробное описание этапов проведения измерения ФАТ-стимулированной УЛХТ опубликовано нами ранее [10, 11].

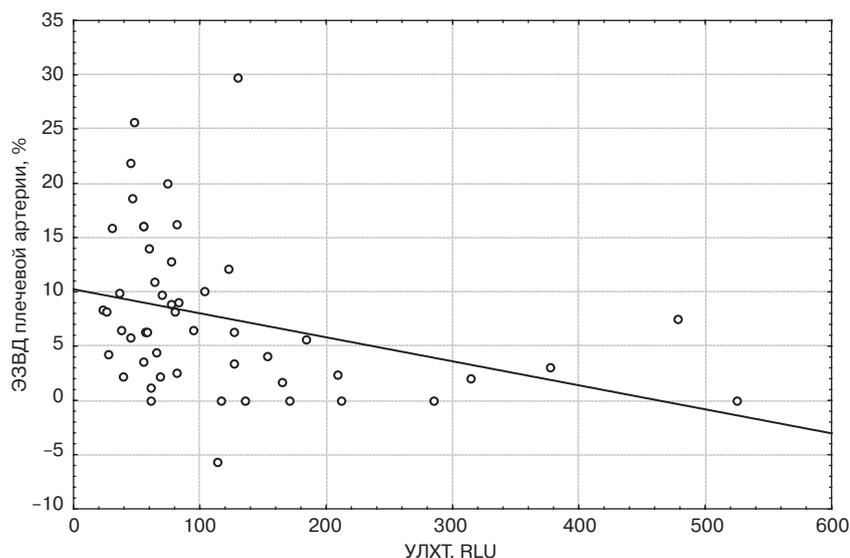
Функция тромбоцитов у пациентов с ОИМ оценивали с помощью оптической агрегометрии, для чего использовали четырехканальный агрегометр «БИОЛА». Определяли спонтанную и индуцированную 0,1, 1 и 5 мкМ АДФ агрегацию тромбоцитов. Также в обеих группах определяли уровень С-реактивного белка высокочувствительным методом (вчСРБ).

Функцию эндотелия оценивали с помощью теста ЭЗВД плечевой артерии. В положении лежа с помощью УЗИ в М-режиме определяли диаметр плечевой артерии. Затем проводили инфляции манжеты тонометра как минимум на 50 мм рт. ст. выше исходного систолического давления исследуемого. Через 5 мин производили дефляцию манжеты тонометра, после чего в течение 1 мин повторно измеряли диаметр плечевой артерии. Далее рассчитывали процент ЭЗВД плечевой артерии [13].

### Результаты

В группе пациентов с ОИМ в 1-е сутки госпитализации была выявлена обратная корреляция средней силы между уровнем стимулированной ФАТ УЛХТ и уровнем ЭЗВД плечевой артерии (коэффициент корреляции Спирмена  $\rho = -0,44$ ;  $p = 0,001$ ) (см. рисунок).

Данная корреляция отсутствовала при повторной оценке показателей уровня УЛХТ и ЭЗВД на 7-е сутки и через 1 мес



Усиленная люминолом хемилюминесценция тромбоцитов (УЛХТ) и эндотелиальная функция у пациентов в первые сутки ОИМ

**Усиленная люминолом хемилюминесценция тромбоцитов, агрегационная функция тромбоцитов и вЧСРБ в разные сроки острого инфаркта миокарда**

Показатель	Коэффициент корреляции Спирмена	<i>p</i>
<i>Корреляция между хемилюминесценцией и агрегацией тромбоцитов, спонтанной и индуцированной АДФ в различной концентрации</i>		
<i>в 1-е сутки ОИМ</i>		
Спонтанная	-0,238128	0,161946
0,1 мкМ АДФ	-0,200114	0,425937
1 мкМ АДФ	0,096946	0,579565
5 мкМ АДФ	0,062129	0,718870
<i>на 7-е сутки ОИМ</i>		
Спонтанная	-0,194004	0,426125
0,1 мкМ АДФ	-0,215769	0,478953
1 мкМ АДФ	-0,100061	0,712349
5 мкМ АДФ	-0,114227	0,651763
<i>через 1 мес после ОИМ</i>		
Спонтанная	0,176163	0,583919
0,1 мкМ АДФ	0,437954	0,154455
1 мкМ АДФ	0,189305	0,555686
5 мкМ АДФ	0,091389	0,777584
<i>Корреляция между хемилюминесценцией и вЧСРБ в различные временные интервалы после ОИМ</i>		
1-е сутки ОИМ	0,105319	0,553318
7-е сутки ОИМ	0,293389	0,237361
Через 1 мес после ОИМ	0,490990	0,263194

от момента госпитализации ( $\rho = -0,17$ ,  $p = 0,42$  и  $\rho = 0,21$ ,  $p = 0,51$  соответственно), сходные результаты были получены в группе контроля ( $\rho = 0,68$ ,  $p = 0,50$ ). Достоверной корреляции между уровнем УЛХТ и уровнем агрегационной активности тромбоцитов и вЧСРБ не было выявлено ни в одной из групп (см. таблицу).

**Обсуждение**

При ОИМ вследствие повреждения миокарда происходит высвобождение различных факторов, включая цитокины, экзосомы и микровезикулы. Кроме того, поврежденные клетки вырабатывают АФК: супероксид анион, синглетный кислород, перекись водорода и гидроксильные радикалы.

В сердечно-сосудистой системе АФК участвуют в регуляции эндотелиальной функции, сосудистого тонуса и сосудистой целостности, а также они играют важную роль в развитии патологических процессов, таких как воспаление, гипертрофия, пролиферация, апоптоз, фиброз, эндотелиальная дисфункция и т. д.

Активные формы кислорода – продукты клеточного метаболизма, вырабатываемые при снижении уровня кислорода. Изначально предполагалось, что они вызывают клеточное повреждение, однако на сегодняшний день также выявлена их роль в осуществлении важных физиологических функций, например, в активации факторов транскрипции, генов, отвечающих за иммунную защиту, а также в регуляции ионных транспортных систем.

Механизмы, лежащие в основе повреждения сосудистой системы АФК, включают активацию редоксчувствительных сигнальных путей. Эндотелиальная дисфункция, развитие которой предшествует многим сердечно-сосудистым заболеваниям, развивается в основном за счет снижения биодоступности NO и оксидативного стресса. Этим процессам способствуют снижение экспрессии/активности NO-синтазы, диссоциация NO-синтазы и повышенная активность NOX в эндотелиальных клетках (продуцирующие АФК НАДФН-оксидазы). Энзимными источниками активных форм кислорода в эндотелиальных клетках являются NO-синтаза (разъединенная на 2 субъединицы), ксантиноксидоредуктаза, митохондриальные дыхательные ферменты и НАДФН-оксидаза [14–17].

В тромбоцитах АФК вырабатываются при активации глутатионовой системы, а также при метаболизме арахидоновой кислоты и фосфоинозитидов. Вырабатываемые тромбоцитами активные формы кислорода могут выполнять роль вторичных мессенджеров и регулировать функцию тромбоцитов [9–11, 18].

Согласно полученным в ходе исследования данным, у пациентов в 1-е сутки ОИМ

повышается уровень УЛХТ, что может свидетельствовать о повышенной продукции активных форм кислорода тромбоцитами, при одновременном развитии эндотелиальной дисфункции. И чем выше УЛХТ, тем более выражена у пациента эндотелиальная дисфункция. По результатам нашего исследования, данные показатели не коррелировали с уровнем фонового воспаления, которое оценивалось по уровню вчСРБ. При динамическом наблюдении на 7-е сутки госпитализации у пациентов с ОИМ на фоне проводимого лечения обратная корреляция между уровнем УЛХТ и функцией эндотелия, оцениваемой с помощью теста ЭЗВД плечевой артерии, отсутствовала, что соответствовало результатам, полученным в контрольной группе. Можно предположить, что восстановление функции эндотелия и снижение процессов образования активных форм кислорода у пациентов с ОИМ происходит к 7-м суткам ОИМ.

### **Выводы**

У пациентов в 1-е сутки от развития ОИМ выявлена обратная корреляционная связь между уровнем стимулированной ФАТ УЛХТ, отражающей процесс образования активных форм кислорода тромбоцитами, и ЭЗВД плечевой артерии, характеризующей функцию эндотелия. Данная корреляционная связь отсутствовала на 7-е сутки и через 1 мес от развития ОИМ. Также данная корреляция отсутствовала в группе контроля. Полученные результаты могут быть обусловлены наличием оксидативного стресса и повышенным образованием активных форм кислорода в остром периоде инфаркта миокарда.

### **Конфликт интересов**

Конфликт интересов не заявляется.

### **Благодарность**

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации, договор № 14.В25.31.0016.

Литература/References

1. Mann D., Zipes D., Libby P., Bonow R.O. (eds). Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 10th ed. Saunders-Elsevier; 2014.
2. Gawaz M., Langer H., May A.E. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 2005; 115 (12): 3378–84.
3. Brevetti G., Silvestro A., Schiano V., Chiariello M. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk prediction in peripheral arterial disease: additive value of flow-mediated dilation to ankle-brachial pressure index. *Circulation.* 2003; 108: 2093–8.
4. Halcox J.P., Schenke W.H., Zalos G. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002; 106: 653–8.
5. Herter J.M., Rossaint J., Zarbock A. Platelets in inflammation and immunity. *J. Thromb. Haemost.* 2014; 12 (11): 1764–75.
6. Jenne C.N., Urrutia R., Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int. J. Lab. Hematol.* 2013; 35: 254–61.
7. Ferrer-Acosta Y., González M., Fernández M., Washington A.V. Emerging roles for platelets in inflammation and disease. *J. Infect. Dis. Ther.* 2014; 2: 149.
8. Schrottmaier C., Kral J.B., Badrnya S., Assinger A. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb. Haemost.* 2015; 114 (3): 478–89.
9. Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Prescott S.M., Stafforini D.M. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit. Care Med.* 2002; 30: 294–301.
10. Gabbasov Z., Ivanova O., Kogan-Yasny V., Vasileva E. Aspirin can stimulate luminol-enhanced chemiluminescence of activated. *Platelets.* 2010; 21 (6): 486–9.
11. Gabbasov Z., Ivanova O., Kogan-Yasny V., Ryzhkova E. et al. Activated platelet chemiluminescence and presence of CD45+ platelets in patients with acute myocardial infarction. *Platelets.* 2014; 25 (6): 405–8.
12. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., Simoons M.L., Chaitman B.R., White H.D. et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 2012; 33: 2551–67.
13. Flammer A.J., Anderson T., Celermajer D.S., Creager M.A., Deanfield J., Ganz P. et al. The assessment of endothelial function from research into clinical practice. *Circulation.* 2012; 126: 753–67.
14. Montezano A.C., Touyz R.M. Reactive oxygen species and endothelial function – role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012; 110 (1): 87–94.
15. De Pascali F., Hemann C., Samons K., Chen C.-A., Zweier J.L. Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation. *Biochemistry.* 2014; 53: 3679–88.
16. Touyz R.M., Tabet F., Schiffrin E.L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2003; 30: 860–6.
17. Gutierrez J., Ballinger S.W., Darley-Usmar V.M., Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ. Res.* 2006; 99: 924–32.
18. Wachowicz B., Olas B., Zbikowska H.M., Buczynski A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets.* 2002; 13: 175–82.

Поступила 14.09.2016