

УДК 617-089-844

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-3-44-52

А. В. СВЕТЛИКОВ^{1,2}, Г. Г. ХУБУЛАВА³, А. И. ЕРМАКОВ²,
Л. Б. ГАЙКОВАЯ², В. С. ГУРЕВИЧ^{1, 2, 4}

Динамика функциональной активности тромбоцитов после эндопротезирования аневризм брюшной аорты

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Клиническая больница № 122 имени Л. Г. Соколова» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 194291, Россия, Санкт-Петербург, пр. Культуры, д. 4

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47

³ Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9

e-mail: asvetlikov@mail.ru

Статья поступила в редакцию 22.04.19; принята к печати 26.07.19

Резюме

Цель работы – изучение влияния эндопротезирования (ЭП) аневризм брюшной аорты (АБА) на функциональную активность тромбоцитов, выраженную экспрессии гликопротеиновых IIb/IIIa-рецепторов и в уровне экспрессии Р-селектина по сравнению с этими показателями при не требующих оперативного лечения малых аневризмах (МА) с размером до 50 мм.

Материал и методы. Определение тромбоцитарной активности анализировали по изменению экспрессии гликопротеиновых (GP) IIb/IIIa-рецепторов и уровня экспрессии Р-селектина. Циркулирующие эндотелиальные клетки (ЦЭК) подсчитывали проточной цитометрией. Для анализа субпопуляций моноцитов использовали тест с реагентами CD14-FITC/CD16-PE/HLADR-PC5/CD45-PC7. Исследования проводили в образцах крови пациентов до ЭП, в течение 4 недель и через 18 месяцев после операции в сравнении с пациентами с МА, не требующими оперативного лечения.

Результаты. Выявлено достоверное ($p < 0,05$) снижение содержания Р-селектина на поверхности вне индукции АДФ у пациентов с БА брюшной аорты по сравнению с группой пациентов с малыми аневризмами (МА). Такая же статистически значимая ($p = 0,04$) разница обнаружена и в экспрессии IIb/IIIa-рецепторов у пациентов с БА и МА. Выявлено достоверное увеличение ($p = 0,02$) экспрессии IIb/IIIa-рецепторов у пациентов в отдаленном послеоперационном периоде. Имеется положительная корреляционная связь между маркером Р-селектина (CD62-стимулированный АДФ) и количеством ЦЭК.

Выводы. Полученные данные указывают на взаимосвязь между тяжестью патологического процесса и степенью функциональной активности тромбоцитов у пациентов с АБА. Обнаружено влияние эндопротезирования аневризмы брюшной аорты на эти показатели и их взаимосвязь с дисфункцией эндотелия. Полученные данные создают возможности для разработки новых направлений в лечении аневризматической болезни и профилактики послеоперационных осложнений.

Ключевые слова: аневризма брюшной аорты, функциональную активность тромбоцитов, Р-селектин, гликопротеиновые (GP) IIb/IIIa-рецепторы, эндопротезирование аневризмы, патогенез аневризмы брюшной аорты

Для цитирования: Светликов А. В., Хубулава Г. Г., Ермаков А. И., Гайковая Л. Б., Гуревич В. С. Динамика функциональной активности тромбоцитов после эндопротезирования аневризм брюшной аорты. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2019;18(3):44–52. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-3-44-52.

UDC 617-089-844

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-3-44-52

A. V. SVETLIKOV^{1,2}, G. G. KHUBULAVA³, A. I. ERMAKOV²,
L. B. GAIKOVAYA², V. S. GUREVICH^{1, 2, 4}

Dynamics of platelets functional activity data in patients after infrarenal aortic aneurysm stentgrafting

¹ L. G. Sokolov Clinical Hospital № 122 of the Federal Medical Biological Agency of the Russian Federation, Russia, St. Petersburg

4 prospekt Kul'tury, St. Petersburg, Russia, 194291

² North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Russia, St. Petersburg

47 Piskarevskii street, St. Petersburg, Russia, 195067

³ Military Medical Academy named after S. M. Kirov, Russia, St. Petersburg

6 Akademiva Lebedeva street, St. Petersburg, Russia, 194044

⁴ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Saint-Petersburg State University», Russia, St. Petersburg

7/9 Universitetskaya embankment, St. Petersburg, Russia, 199034

e-mail: asvetlikov@mail.ru

Received 22.04.19; accepted 26.07.19

Summary

It is known that hemostatic, immune and autoimmune reactions can play a role in the development and progression of abdominal aortic aneurysms (AAA), including the activation of platelets and CEC. However the role of those in pathogenesis of AAA remains unclear.

The aim of this study was to study the influence of EVAR on functional activity of platelets and number of circulating endothelial cells (CEC) in comparison with small abdominal aortic aneurysms – AAA (less than 5 cm).

Material and methods. Platelets activity has been analyzed due to the assessment of quantity of GP IIb/IIIa receptors and expression of P-selectin. CD14-FITC/CD16-PE/HLADR-PC5/CD45-PC7 has been used to assess the monocytes activity. CEC were counted by flow cytometry in blood samples of patients before EVAR, within 4 weeks and in 18 months after the operation in comparison with non-operated patients due to small diameter AAA. Markers (CD146 + CD45) were used to identify CEC.

Results. The amount of P-selectin, CD62 in patients with small aneurysms (SAAA) in comparison of aneurysms more the 5 cm (BAAA), has been increased ($p < 0,05$). There was the statistically significant difference in amount of GP IIb/IIIa in SAAA and BAAA ($p = 0,04$). The number of monocytes were less in SAAA. Positive correlation between CEC and monocytes and between the size of aneurysms in BAAA before the operation have been revealed. We found the positive correlation between CEC number and P-selectin (CD62), in patients at early postoperative period. The significant difference ($p = 0,02$) (GP) IIb/IIIa receptors in patients before and at late postoperative period has been found.

Conclusion. The change in the quantitative characteristics of CEC, platelets and monocytes during the growth of AAA confirms the idea about the activation of innate immunity as an important pathogenetic link in the development of this disease, closely associated with the destruction of the vascular wall and, in particular, of its endothelial lining. The obtained data partly explain the unsatisfactory long-term results of the EVAR and provide an opportunity for developing new approaches for prevention of postoperative complications and the treatment of AAA.

Keywords: aneurysm of abdominal aorta (AAA), EVAR, circulating endothelial cells, GP IIb/IIIa receptors and expression of P-selectin pathogenesis of AAA

For citation: Svetlikov A. V., Ermakov A. I., Gaikovaya L. B., Khubulava G. G., Gurevich V. S. Dynamics of platelets functional activity data in patients after infrarenal aortic aneurysm stentgrafting. Regional hemodynamics and microcirculation. 2019;18(3):44–52. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-3-44-52. (In Russ.).

Введение

Тромбоциты, один из основных компонентов системы гемостаза, одновременно играют важную роль в процессах ангиогенеза и реализации иммунологических реакций. Однако адекватный контроль функциональной активности тромбоцитов является в настоящее время нерешенной проблемой клинической лабораторной диагностики [1].

Цитометрический анализ с использованием различных флуоресцентных красителей и специфических антител позволяет оценить образование тромбоцитарных и тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов, экспрессирование рецепторов на поверхности тромбоцитов и их активацию. Это те показатели, которые напрямую связаны с гиперагрегацией тромбоцитов [2, 3].

Рекомендации Американской ассоциации торакальных хирургов (АССР, 2012 г.) не предусматривают лабораторный мониторинг антиагрегантной терапии [4]. Вместе с тем изучение молекулярных маркеров изменений функциональной активности тромбоцитов, несомненно, является чрезвычайно полезным для понимания патогенеза и поиска новых подходов для предотвращения до- и послеоперационных осложнений аневризм брюшной аорты (АБА).

В исследовании M. F. Abdelhamid et al. [5] у 25 пациентов, со средним возрастом 76,9 года, подвергшихся эндопротезированию АБА (средний диаметр – 6,9 см), были оценены уровень протромбинового фрагмента (PF 1+2), активность ингибитора активатора плаз-

миногена (РАI), активатора тканевого плазминогена (t-PA), растворимые Р- и Е-селектины и высокочувствительный С-реактивный белок (hsCRP), измеренные до, через 24 ч, через 1, 6 и 12 месяцев после операции. Наблюдался значительный рост растворимого Р- и Е-селектина после вмешательства, который поддерживался в течение 12 месяцев. Данные показывают, что протромботический, гипофибринолитический диатез, связанный с АБА, нормализуется через 12 месяцев после операции эндопротезирования АБА. Наблюдаемые изменения после проведения открытой операции или эндопротезирования могут объяснять высокий уровень периоперационных тромботических осложнений. Исследование [6] 33 пациентов после планового эндопротезирования АБА показало развитие послеоперационной тромбоцитопении в раннем периоде, с последующим тромбоцитозом и гиперфибриногенемией в течение нескольких недель с риском тромботический осложнений.

Р-селектин

Р-селектин (другие обозначения в литературе – CD62P, Granule Membrane Protein 140 (GMP-140)) является белком α-гранул тромбоцитов, который перераспределяется в плазматическую мембрану при активации и дегрануляции тромбоцитов. Было установлено, что синтез Р-селектина происходит в эндотелиальных клетках. Данный белок также локализуется в мегакариocyтах и тельцах Вайбеля –

Паладе эндотелиальных клеток [7]. В исследовании пациентов с тяжелой тромбоцитопенией наличие в их плазме крови Р-селектина позволяет предположить, что эндотелий также участвует в продуцировании Р-селектина [8].

В исследовании E. Amaoutoglou et al. [9] был произведен анализ 50 пациентов, подвергшихся эндоваскулярному протезированию АБА. Был произведен анализ количества тромбоцитов и их активации (CD62P-CD36), количества лейкоцитов и высокочувствительного С-реактивного белка до операции в 1-й и 3-й послеоперационные дни. Максимальный диаметр аневризмы аорты был единственным фактором, который существенно коррелировал со значениями CD62P. Послеоперационные значения CD36 достоверно коррелировали с общим объемом аневризмы.

В исследовании Giovanni et al. [10] было показано, что увеличение уровня растворимого Р-селектина может способствовать развитию окислительных процессов, приводящих к эндотелиальной дисфункции и стойкой активации тромбоцитов. Авторы считают, что Р-селектин может выступать маркером эндотелиальной дисфункции у пациентов с гиперхолестеринемией. Таким образом, Р-селектин играет значительную роль в агрегации тромбоцитов и взаимодействии тромбоцитов и лейкоцитов, что является важным механизмом в развитии артериального тромбоза.

Интегрин бета-3

Интегрин бета-3 (CD61) является мембранным белком, гликопротеином из надсемейства интегринов, компонент гликопротеина IIb/IIIa (интегрин α IIb β 3), обеспечивающего агрегацию тромбоцитов. Интегрины представляют собой белки клеточной поверхности, состоящие из α - и β -цепи. Интегрин β 3 встречается вместе с цепью α IIb в тромбоцитах. Данные интегрины участвуют в клеточной адгезии, а также в клеточной передаче сигналов [11]. Рецептор фибриногена, гликопротеин IIb/IIIa (интегрин α IIb β 3), является наиболее распространенным гликопротеином тромбоцитов. Образование связи между тромбоцитом и фибриногеном требует активации интегрин α IIb β 3 через конформационные изменения, который индуцируется большинством агонистов тромбоцитов [12].

Уровни Р-селектина и интегрин β 3 являются наиболее достоверными показателями активности тромбоцитов при АБА.

Так, например, в исследовании M. F. Abdelhamid et al. [5] установлено, что значительное повышение уровня Р-селектина происходит через 1 месяц после операции эндопротезирования брюшной аорты и держится на высоком уровне через 6 месяцев. Пациенты с ишемической болезнью сердца и те, кто принимал антиагрегационные препараты до операции, имели значительно более низкие уровни Р-селектина.

В другом смоделированном на мышах эксперименте [13] установлено, что дефицит Р-селектина ослабляет образование аневризмы аорты. Это было связано с притуплением воспалительного ответа и сохранением целостности стенки сосуда.

В нашем исследовании оценивалось количество циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК)

и моноцитов периферической крови, которые являются прямыми клеточными маркерами повреждения и ремоделирования эндотелия [14], так же как и Р-селектин, который участвует в артериальном тромбогенезе [15, 16] и способствует развитию окислительных процессов, приводящих к эндотелиальной дисфункции и стойкой активации тромбоцитов.

Целью работы являлось изучение влияния эндопротезирования АБА на функциональную активность тромбоцитов, выраженную в экспрессии гликопротеиновых (GP) IIb/IIIa-рецепторов и уровня экспрессии Р-селектина до и после индукции АДФ, у пациентов в до- и послеоперационные периоды в сравнении с пациентами, не требующими хирургического пособия малой аневризмы (МА), которые находились на амбулаторном наблюдении и консервативном лечении. В качестве дополнительных показателей эндотелиальной дисфункции использовали количество ЦЭК и моноцитов венозной крови. Показания к операции по поводу АБА соответствовали Национальным рекомендациям по ведению пациентов с аневризмами брюшной аорты 2016 г. [17]. Сравнительный анализ подлежащих операции пациентов с большой аневризмой (БА) (более 50 мм) и пациентов с МА (менее 50 мм), у которых консервативное лечение, по современным представлениям, является предпочтительным, имеет принципиальное значение в связи с необходимостью поиска новых, более точных и объективных критериев показаний к операции и обоснованием антиагрегационной фармакотерапии.

В связи с этими задачами настоящей работы были следующие:

- 1) провести сравнительную оценку показателей функциональной активности тромбоцитов, выраженной в количестве IIb/IIIa-рецепторов, и уровня экспрессии Р-селектина, количества моноцитов и ЦЭК у пациентов с БА и МА брюшной аорты;
- 2) провести анализ динамики показателей количества моноцитов и ЦЭК у пациентов до и после операции эндопротезирования АБА;
- 3) провести анализ показателей активности тромбоцитов до и после операции эндопротезирования АБА.

Материал и методы исследования

Обследованные пациенты были распределены на 4 группы. Группа 1 – пациенты с БА до операции; группа 2 – пациенты с БА в ранний послеоперационный период; группа 3 – пациенты с БА в поздний послеоперационный период; группа 4 – пациенты с МА. Ранний послеоперационный период – от 2 до 4 недель после операции. Поздний послеоперационный период – через 18 месяцев после операции.

Выделение данных групп пациентов обусловлено необходимостью выявить влияние эндопротезирования АБА на функциональную активность тромбоцитов в сравнении с пациентами с МА, которым, по современным критериям, операция не показана и рекомендовано динамическое наблюдение за состоянием диаметра АБА.

Определение тромбоцитарной активности анализировали по изменению относительного количества

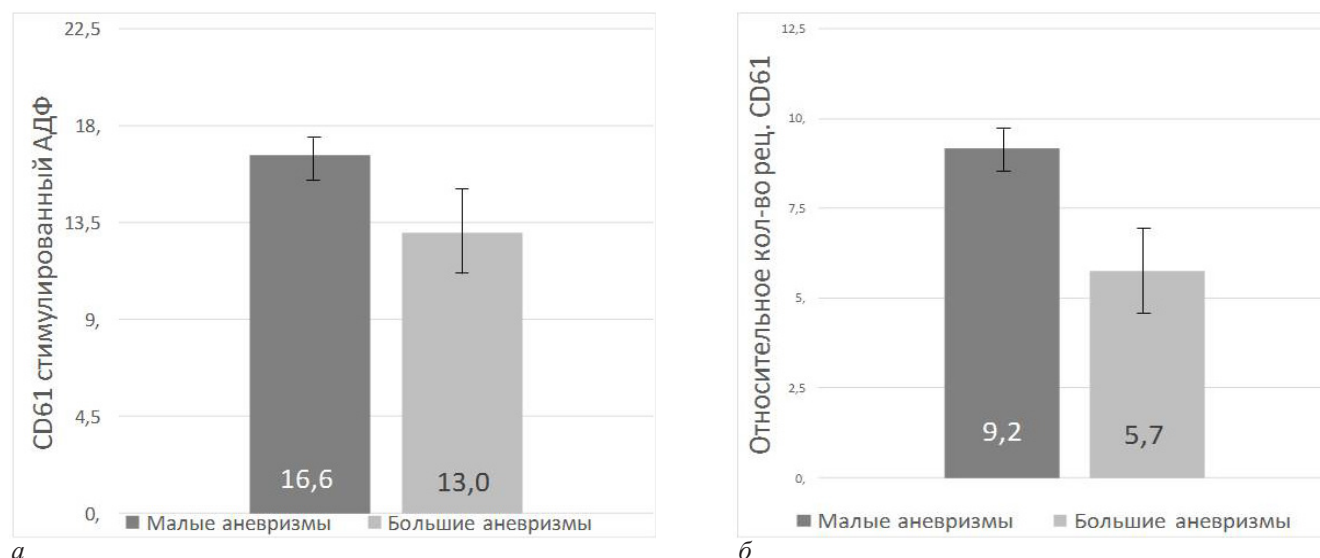


Рис. 1. Уровень экспрессии (MFI) IIa/ IIIb-рецепторов у пациентов с малыми (n=21) и большими (n=8) аневризмами: а – стимулированные АДФ CD61, MFI; б – относительное количество рецепторов CD61, MFI

Fig. 1. The content of GP IIa/ IIIb receptors in patients with small (n=21) and large aneurysms: а – stimulated ADF CD61; б – relative number of receptors CD61

гликопротеиновых (GP) IIb/IIIa-рецепторов и уровня экспрессии Р-селектина. Измерения проводили с использованием флуоресцентномеченных моноклональных антител CD61-FITC и CD62P-PE, специфичных к субъединице GP IIIa-гликопротеина GP IIb/IIIa и к Р-селектину соответственно, на проточном цитометре CYTOMICS FC 500 (*Beckman Coulter*, США). Прирост относительного количества гликопротеиновых (GP) IIb/IIIa-рецепторов на поверхности активированных тромбоцитов рассчитывался, как разница между экспрессией GP-IIb/IIIa (CD61) в присутствии и отсутствии активации индуктором АДФ. Оценку уровня Р-селектина на поверхности тромбоцитов также учитывали до и после активации 20 мкмоль/л АДФ по экспрессии CD62P.

Определение количества ЦЭК в периферической крови осуществляли с использованием меченных флуорохромами моноклональных антител к поверхностным маркерам клеток: CD 146-PE (*Beckman Coulter*, США) в качестве маркера для ЦЭК и CD45-PC5 (*Beckman Coulter*, США) в качестве панлейкоцитарного маркера. Для исследования использовали цельную венозную кровь, взятую натощак в утренние часы из локтевой вены в стерильные вакуумные пробирки, содержащие 100 мкл 0,5 М ЭДТА (pH 8,0) в качестве антикоагулянта.

Определение абсолютного количества моноцитов. Для анализа субпопуляции моноцитов использовали тест с реагентами CD14-FITC/CD16-PE/HLADR-PC5/CD45-PC7 на проточном цитометре CYTOMICS FC 500 (*Beckman Coulter*, США).

Методы статистического анализа. Полученные данные при нормальном распределении анализировали как параметрические величины и описывали средними величинами и средними ошибками. Для сравнения выборок с различными дисперсиями использовали двухвыборочный t-тест. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции по Спирмену. Расчеты и графические построения выполнены в пакетах статистических программ «Microsoft Excel 2010» и «IBM Statistics SPSS 22».

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительная оценка показателей функциональной активности тромбоцитов, количества ЦЭК и моноцитов у оперированных пациентов с БА и неоперированных пациентов с МА брюшной аорты

Обнаружена статистически значимая ($p=0,04$) разница в показателях содержания количества гликопротеиновых (GP) IIb/IIIa-рецепторов у пациентов с БА (13,0±2,04 MFI), выраженного в экспрессии CD61 на поверхности активированных АДФ тромбоцитах, и МА (16,6±0,66 MFI) соответственно, и статистически незначимая разница в показателях экспрессии гликопротеиновых IIb/IIIa-рецепторов на поверхности тромбоцитов вне индукции АДФ при БА (5,75±1,59 MFI) и МА (9,16±0,71 MFI) (рис. 1).

Полученные данные исследования отражены в таблице.

Выявлено достоверное ($p<0,05$) увеличение количества экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов после индукции АДФ у пациентов с МА (19,74±3,06, %) по сравнению с группой пациентов с БА (7,47±2,99, %). Также наблюдается достоверный ($p<0,05$), более чем в 2 раза, высокий показатель экспрессии Р-селектина на тромбоцитах вне индукции АДФ при МА (6,88±2,77, %) по сравнению с БА (16,60±2,38, %) (рис. 2).

Выявлена статистически значимая ($p=0,02$) разница в количестве моноцитов. Содержание моноцитов снижено в группе пациентов с БА (559,30±46,93 кл/мкл) по сравнению с группой МА (736,80±58,92 кл/мкл) (рис. 3).

Выявлена положительная корреляция между количеством ЦЭК и моноцитов в группе пациентов с БА в дооперационном периоде (рис. 4).

Сравнительная оценка показателей ЦЭК, моноцитов, функциональной активности тромбоцитов в динамике у пациентов до и после операции эндопротезирования

Количество тромбоцитов в дооперационном периоде составляло 199,43±13,68 ($\times 10^9$) и раннем послеоперационном периоде 169,57±14,82 ($\times 10^9$).

Сравнительная оценка функциональной активности тромбоцитов, показателей ЦЭК и моноцитов у пациентов с большими и малыми аневризмами брюшной аорты

Comparative evaluation of platelets functional activity, level of CEC and monocytes in patients with large and small infrarenal aortic aneurysms

	Группа пациентов			
	1-я – с БА до операции (n=18)	2-я – с БА в ранний послеоперационный период (n=14)	3-я – с БА в поздний послеоперационный период (n=17)	4-я – с МА (n= 28)
Размер аневризм, мм (M±m)	60,7±2,76 (50,0–90,0)	58,6±2,79 (50,0–90,0)	58,8±1,52 (51,0–82,0)	36,7±1,09 (28,0–47,0)
Количество ЦЭК (кл/300000 лейкоцитов) (M±m)	25,8±5,74 (4–76)	22,4±4,17 (7–71)	13,1±2,81 (2–52)	17,6±1,52 (5–34)
Абсолютное число моноцитов (кл/мкл)	559,30±46,93 (149,52–891,46)	798,04±80,16 (414,70–1548,72)	648,36±50,96 (327,50–1127,84)	736,80±58,92 (336,96–1751,80)
Показатели CD61-рецепторов, стимулированных АДФ (M±m), MFI	13,0±2,04 (4,2–21,9)	12,2±2,92 (3,2–23,1)	15,2±1,03 (7,1–22,3)	15,3±0,66 (9,0–21,3)
Относительное количество рецепторов CD61 до индукции АДФ, MFI	5,75±1,59 (1,14–12,98)	5,86±1,81 (2,78–14,50)	8,78±1,01 (2,26–13,78)	9,16±0,71 (2,15–16,21)
Показатели CD62, стимулированные АДФ (M±m), %	7,47±2,99 (2,46–18,53)	3,81±1,93 (0,20–11,77)	4,28±2,23 (0,06–34,62)	19,74±3,06 (0,42±59,38)
Условное количество рецепторов CD62 до индукции АДФ, %	6,88±2,77 (0,02–18,06)	3,65±1,86 (0,09–11,25)	4,05±2,17 (0,01–33,57)	16,60±2,38 (0,37–40,02)

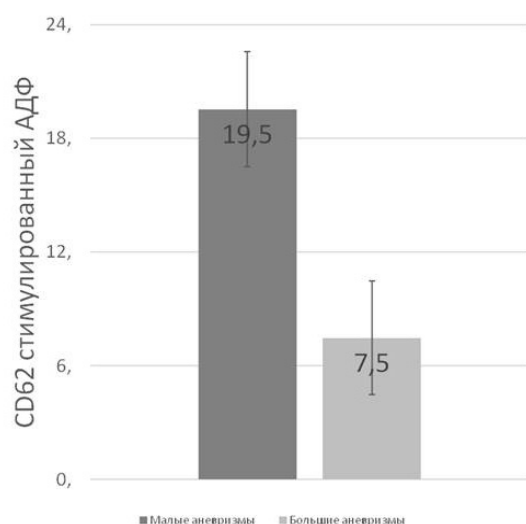
Выявлена статистически значимая ($p=0,02$) разница в содержании моноцитов. Количество моноцитов снижены в группе пациентов с БА ($559,30\pm46,93$ кл/мкл) по сравнению с группой МА ($736,80\pm58,92$ кл/мкл) (рис. 3).

Выявлена положительная корреляция между показателями количества ЦЭК и моноцитов в группе пациентов с БА в дооперационном периоде (рис. 4).

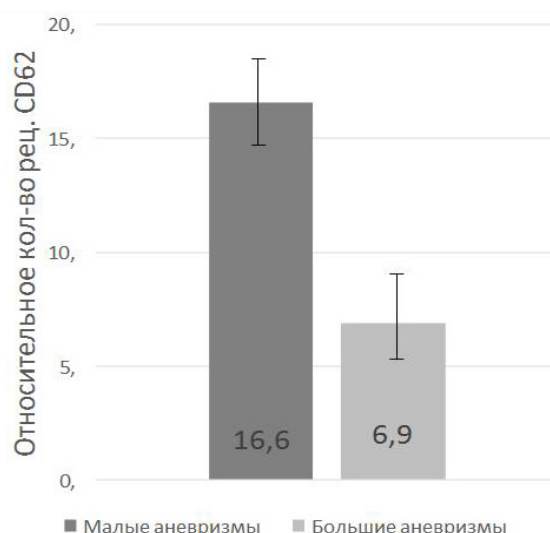
Имелась тенденция к снижению показателей тромбоцитов после операции эндопротезирования, но данное снижение не имеет статистической значимости на фоне проводимой антиагрегатной терапии. Корреляция между количеством тромбоцитов и размером аневризм отсутствует. Также отсутствует кор-

реляция между количеством тромбоцитов и показателями гликопротеиновых (GP) IIb/IIIa-рецепторов и уровня экспрессии Р-селектина. Выявлена положительная корреляционная связь между количеством ЦЭК экспрессией Р-селектина на поверхности АДФ-активированных тромбоцитов, а также с экспрессией Р-селектина на поверхности АДФ-активированных тромбоцитов, относительным количеством данных рецепторов у пациентов в ранний послеоперационный период (рис. 5), однако показатель $p=0,087$, что свидетельствует о недостаточной статистической значимости этой связи.

В динамике количества моноцитов имеется статистически значимое ($p=0,01$) увеличение этого показателя в раннем послеоперационном периоде по



а



б

Рис. 2. Содержание Р-селектина в крови пациентов с малыми (n=21) и большими (n=8) аневризмами: а – стимулированные АДФ CD62, %; б – относительное количество рецепторов CD62, %

Fig. 2. Content of P-selectin in patients with large and small aneurysms: а – stimulated ADF CD62; б – relative number of receptors CD62

сравнению с дооперационными значениями. Статистически достоверной разницы содержания моноцитов в отдаленном послеоперационном периоде нет, однако имеется тенденция к его снижению (рис. 6).

Корреляционной зависимости между размерами аневризмы и показателем активированных тромбоцитов не было выявлено ни в одной из 3 групп.

Выявлена значимая ($p=0,02$) разница в экспрессии гликопротеиновых (GP) IIb/IIIa-рецепторов у пациентов в отдаленном послеоперационном и дооперационном периодах ($8,78 \pm 0,71$ MFI и $5,74 \pm 1,59$ MFI соответственно) (рис. 7).

Статистически значимой разницы между показателями содержания активированных АДФ тромбоцитов (CD62-стимулированных АДФ) нет, однако дооперационные значения ($7,47 \pm 2,99$ %) выше по сравнению с ранними ($3,82 \pm 1,93$ %) и отсроченными ($4,28 \pm 2,23$ %) послеоперационными показателями (рис. 8, а). Разница в относительном содержании данных рецепторов в разных периодах статистически незначима, однако дооперационные цифры выше, чем в раннем послеоперационном периоде ($6,87 \pm 2,77$ % по сравнению с $3,65 \pm 1,86$ %) (рис. 8, б).

Обнаруженная корреляционная зависимость между количеством ЦЭК и моноцитов свидетельствует о взаимосвязи между степенью эндотелиальной дисфункции и количественным показателем моноцитов, которые играют центральную роль в патогенезе деструкции эндотелиальной стенки [19]. Более низкие показатели моноцитов в группе пациентов с БА до операции по сравнению с группой пациентов с МА также свидетельствуют о более выраженной инфильтрации данными клетками пораженного участка сосуда и степени патологического процесса у пациентов с АБА. Достоверное увеличение количества моноцитов крови в раннем послеоперационном периоде свидетельствует о снижении активности патологического процесса и выключении аневризматически измененного участка брюшной аорты из активного кровотока. В отдаленном послеоперационном периоде наблюдается тенденция

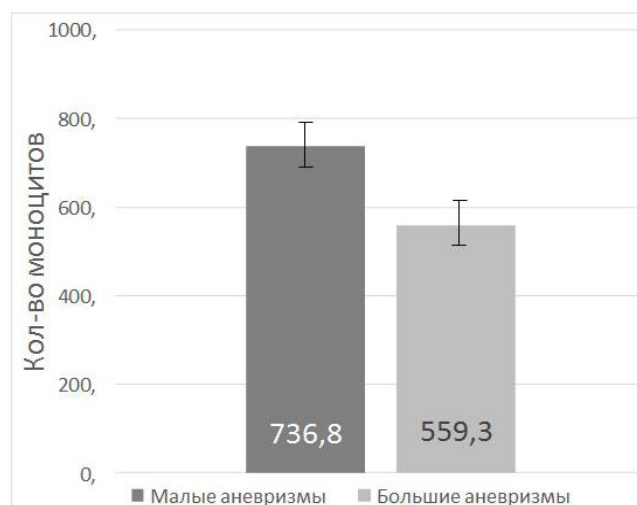


Рис. 3. Количество моноцитов (кл/мкл) в крови пациентов с малыми (n=27) и большими (n=18) аневризмами

Fig. 3. Number of monocytes in patients with large (n=18) and small (n=27) aneurysms

к увеличению показателя моноцитов периферической крови и одновременное снижение ЦЭК, что свидетельствует о том, что метод эндопротезирования АБА обеспечивает эффективное выключение участка аневризмы из кровотока. Этот факт подтверждает предпочтительность методики EVAR и его благоприятный прогноз в отношении влияния аневризмы на состояние гомеостаза пациентов в отдаленном периоде.

Выявленная связь между количеством ЦЭК и уровнем тромбоцитов, экспрессирующих маркер активации тромбоцитов Р-селектин, подтверждает прямую взаимосвязь между степенью эндотелиальной дисфункции и функциональной активности тромбоцитов. Значительно более низкие показатели Р-селектина и количества гликопротеиновых (GP) рецепторов IIb/IIIa в группе пациентов с БА по сравнению с группой МА указывают на зависимость степени активности тромбоцитов от тяжести патологического процесса. Эндотелиальная дисфункция

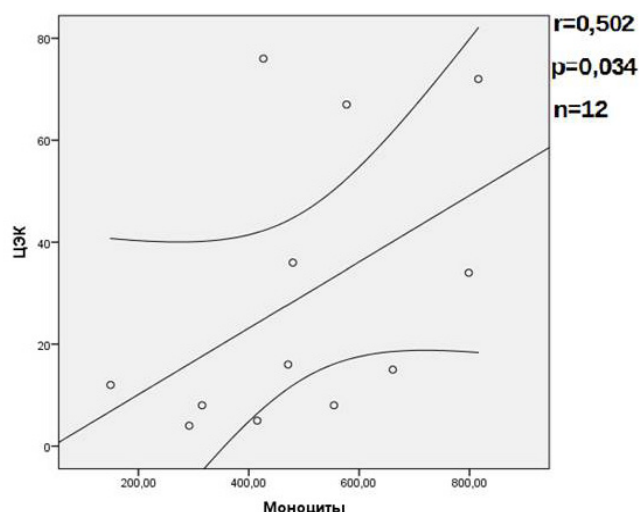


Рис. 4. Корреляция между количеством моноцитов (кл/мкл) и ЦЭК (кл/300000 лейкоцитов) у пациентов с большой аневризмой до операции

Fig. 4. Correlation between number of monocytes (10^9) and CEC (CEC/300000 leukocytes)

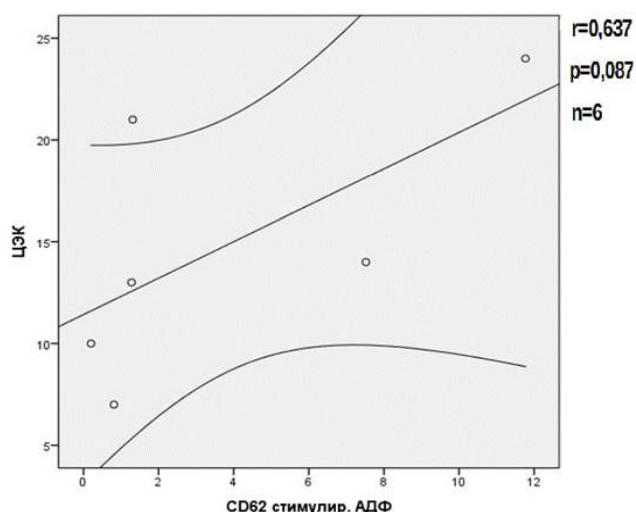


Рис. 5. Корреляция между показателем Р-селектина (% стимулированных АДФ CD62) и ЦЭК (ЦЭК/300000 лейкоцитов) в ранний послеоперационный период (n=6)

Fig. 5. Correlation between level of P-selectin (% stimulated CD62) and CEC (CEC/300000 leukocytes) in early postoperative period (n=6)

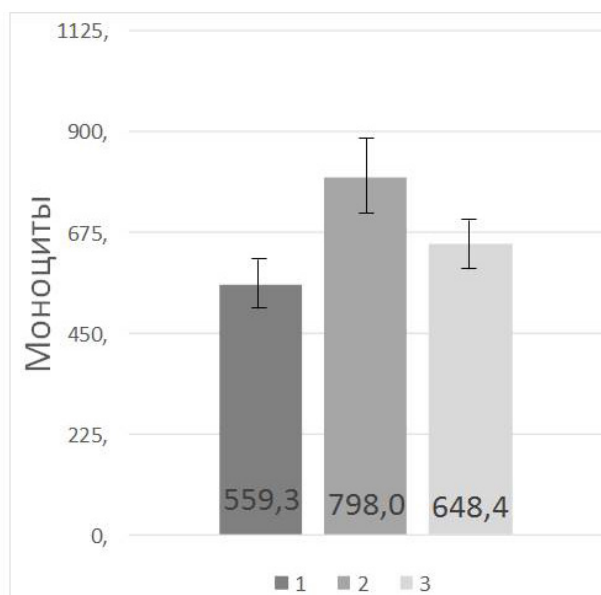


Рис. 6. Содержание моноцитов (кл/мкл) в крови пациентов с большой аневризмой до операции (n=18) эндоваскулярного протезирования (1), в ранний (n=14) послеоперационный (2) и в отдаленный (n=23) (3) послеоперационный периоды

Fig. 6. Content of CEC, Monocytes on patients with large aneurysm before operation (n=18), early (n=14) and late (n=23) postoperative period

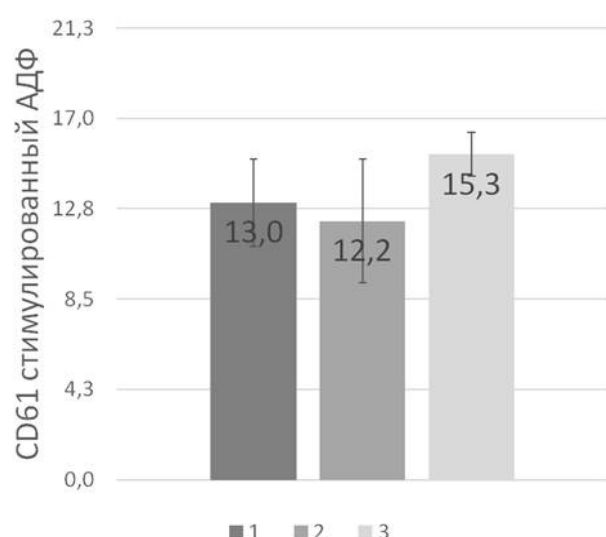
закономерно приводит к изменению лабораторных показателей функциональной активности тромбоцитов. В исследовании А. А. Milne et al. [18] выдвинуто предположение, что низкий уровень количества тромбоцитов у пациентов с АБА может указывать на усиленное разрушение тромбоцитов, что, скорее всего, связано с их активацией внутри аневризмы. В данной работе мы придерживаемся мнения о том, что снижение количества активированных тромбоцитов в группе БА связано с их активацией в пораженном участке брюшной аорты и отражает активность патологического процесса в стенке сосуда.

В раннем и отдаленном послеоперационных периодах наблюдается снижение количества ЦЭК, но уровень функциональной активности тромбоцитов по экспрессии гликопротеиновых (GP) рецепторов IIb/IIIa имеет тенденцию к незначительному приросту после проведения эндопротезирования аорты. Это указывает на то, что проведение эндоваскулярного протезирования АБА существенно не влияет на агрегационную способность тромбоцитов.

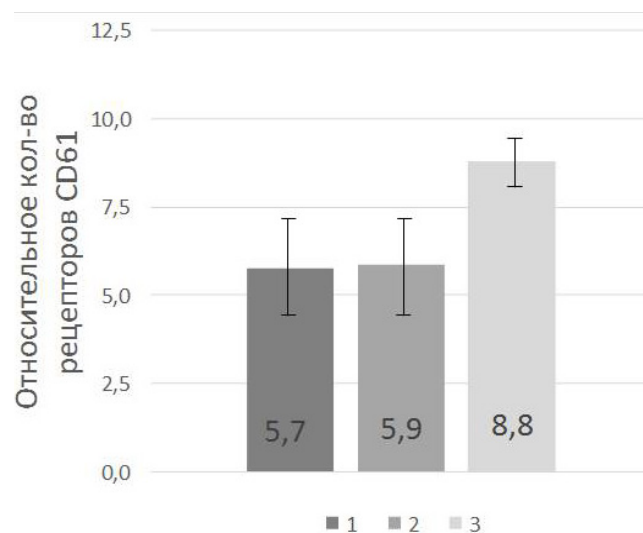
В нашем исследовании показано, что уровень Р-селектина на поверхности тромбоцитов имеет статистически незначимую тенденцию к снижению с последующим ростом в отдаленном послеоперационном периоде. Это можно связать с ослаблением воспалительного ответа и стабилизацией целостности стенки сосуда. Так, ранее в исследовании [19] установлено, что низкие показатели уровня Р-селектина на поверхности тромбоцитов снижают вероятность прогрессирования аневризмы. Таким образом, наши данные еще раз подтверждают предпочтительность методики EVAR для восстановления процессов гомеостаза у пациентов с большими АБА.

Выводы

1. Выявлено достоверное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии содержания Р-селектина, выраженного в показателе CD62-стимулированного АДФ, у пациентов с МА по сравнению с группой пациентов с БА. Обнаружена статистически значимая ($p = 0,04$) разница в экспрессии содержания количества гликопротеиновых (GP) IIb/IIIa-рецепторов у пациентов с БА, выраженного в показателе CD61-стимулированных АДФ, и МА. Это свидетельствует о более высоком показателе активности тромбоцитов в группе пациентов с МА. Кроме того, полученные данные указывают на взаимосвязь между тяжестью патологического процесса и степенью функциональной активности тромбоцитов.



а



б

Рис. 7. Количество гликопротеиновых (GP) IIa/IIIb-рецепторов (MFI) в крови пациентов до операции эндоваскулярного протезирования (n=8) (1), в ранний (n=6) (2) и в отдаленный (n=17) (3) послеоперационный периоды: а – CD61 стимулированный АДФ; б – относительное количество рецепторов CD61

Fig. 7. Level of (GP) IIa/IIIb receptors in patients before stentgrafting (n=8) (1), at early (n=6) (2) and late postoperative period (n=17) (3): а – stimulated ADF CD61; б – relative number of receptors CD61

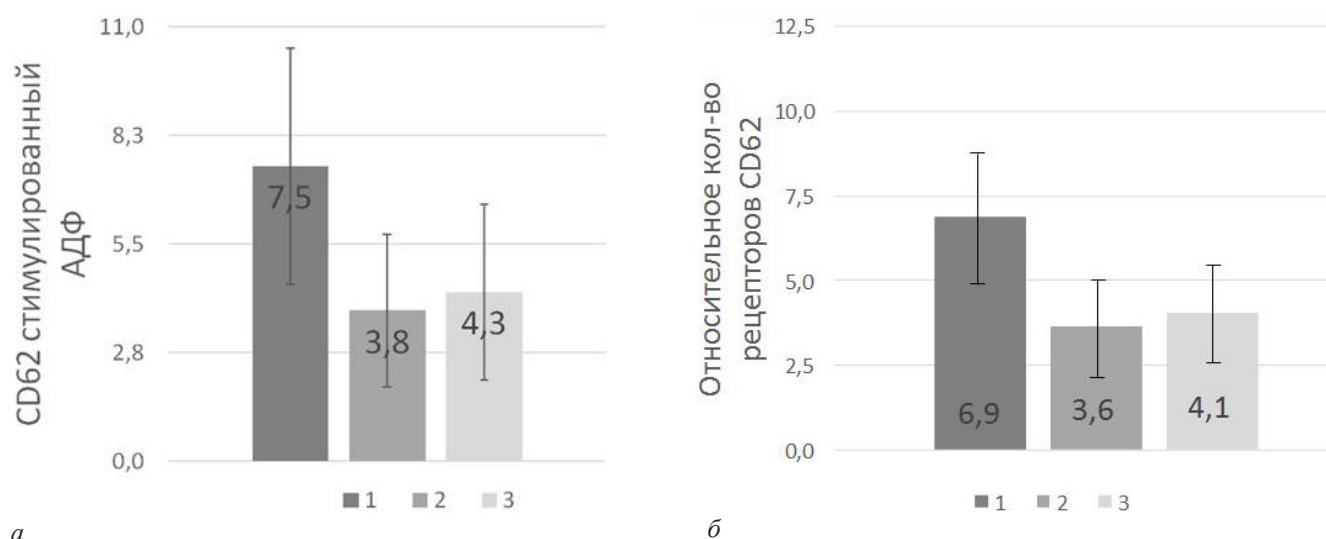


Рис. 8. Содержание Р-селектина (%) в крови пациентов до операции (n=8) эндоваскулярного протезирования (1), в ранний (n=6) (2) и в отдаленный (n=17) послеоперационный периоды (3): а – CD62 стимулированный АДФ; б – относительное количество рецепторов CD62

Fig. 8. Content of P-Selectin receptors in patients before stentgrafting (n=8) (1), at early (n=6) (2) and late postoperative period (n=17) (3): а – stimulated ADF CD62; б – relative number of receptors CD62

2. Выявлена статистически значимая ($p=0,02$) разница в количестве моноцитов. Показатели моноцитов снижены в группе пациентов с БА по сравнению с группой МА. Это может свидетельствовать о выраженной инфильтрации данными клетками пораженного участка сосуда и отражает степень патологического процесса.

3. Выявлена положительная корреляция между показателями количества ЦЭК и моноцитов, а также с размером аневризм в группе пациентов с БА в дооперационном периоде.

4. Имеется положительная корреляционная связь между количеством ЦЭК и маркером Р-селектина (CD62-стимулированный АДФ), а также с относительным количеством данных рецепторов у пациентов в ранний послеоперационный период. Выявлена тенденция к снижению количества ЦЭК, которая достигла статистической значимости ($p=0,03$), практически в 2 раза, между группой пациентов в раннем и позднем послеоперационном периодах. Повидимому, эти изменения отражают степень повреждения участка брюшной аорты и роль эндотелия и субэндотелия в развитии АБА. В динамике моноцитов имеется статистически значимая ($p=0,01$) тенденция к увеличению показателя в раннем послеоперационном периоде по сравнению с дооперационными значениями, имеется тенденция к снижению данного показателя в отдаленном периоде.

Полученные данные об изменениях числа ЦЭК и показателя содержания моноцитов периферической крови в отдаленном послеоперационном периоде может указывать на то, что метод EVAR обеспечивает долгосрочное выключение участка аневризмы из кровотока и снижение риска сердечно-сосудистых событий.

5. Выявлена значимая ($p=0,02$) разница в экспрессии гликопротеиновых (GP) IIb/IIIa-рецепторов у пациентов в дооперационном и отдаленном послеоперационном периодах. Эти изменения указывают на взаимосвязь между тяжестью патологического

процесса и степенью функциональной активности тромбоцитов у оперированных пациентов и дают возможность в перспективе разрабатывать новые направления в лечении аневризматической болезни.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. ISLH 2008. Sydney, Coagulation / Haemostasis Workshop.
2. Enjeti AK, Lincz LF, Seldon M. Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology. *Semin Thromb Hemost.* 2007;33(8):771–779. Doi: 10.1055/s-2007-1000369.
3. Storey R, Judge H, Heptinstall S. Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y12 receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin. *Thromb. Haemost.* 2002; 88(3):488–494. Doi: 10.1055/s-0037-1613242.
4. Guyatt GH, Akl EA, Crowther M et al. Executive Summary: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2012;141:7S–47S. Doi: 10.1378/chest.141.4.1129a.
5. Abdelhamid MF, Davies RS, Adam DJ, Vohra RK, Bradbury AW. Changes in thrombin generation, fibrinolysis, platelet and endothelial cell activity, and inflammation following endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2012;55(1):41–46. Doi: 10.1016/j.jvs.2011.07.094.
6. Bradbury A, Adam D, Garrioch M, Brittenden J, Gillies T, Ruckley CV. Changes in platelet count, coagulation and fibrinogen associated with elective repair of asymptomatic abdominal aortic aneurysm and aortic reconstruction for occlusive disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997;13(4):375–380. Doi: 10.1016/s1078-5884(97)80079-2.
7. Graff J, Klinkhardt U, Schini-Kerth VB, Harder S, Franz N, Bassus S, Kirchmaier CM. Close relationship between the platelet activation marker CD62 and the granular release of platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Mar;300(3):952–957. Doi: 10.1124/jpet.300.3.952.

8. Semenov AV, Romanov YA, Loktionova SA, Tikhomirov OY, Khachikyan MV, Vasil'ev SA, Mazurov AV. Production of soluble P-selectin by platelets and endothelial cells. *Biochemistry (Mosc)*. 1999;64(11):1326–1335.

9. Arnaoutoglou E, Kouvelos G, Papa N, Karamoutsios A, Bouris V, Vartholomatos G, Matsagkas M. Platelet activation after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *Vascular*. 2016;24(3):287–294. Doi: 10.1177/1708538115596911.

10. Davì G, Romano M, Mezzetti A, Procopio A, Iacobelli S, Antidormi T, Bucciarelli T, Alessandrini P, Cuccurullo F, Bittolo Bon G. Increased Levels of Soluble P-Selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 1998;97:953–957. Doi: 10.1161/01.cir.97.10.953.

11. Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost*. 2013;11(1):2–16. Doi: 10.1111/jth.12045.

12. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:288–300. Doi: 10.1038/nrm2871.

13. Hannawa KK, Cho BS, Sinha I, Roelofs KJ, Myers DD, Wakefield TJ, Stanley JC, Henke PK, Upchurch GR Jr. Attenuation of experimental aortic aneurysm formation in P-selectin knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1085:353–359. Doi: 10.1196/annals.1383.014.

14. Makin AJ, Blann AD, Chung NA, Silverman SH, Lip GYH. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells: Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. *European Heart Journal*. 2004;25(5):371–376. Doi: 10.1016/j.ehj.2003.04.001.

15. Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Murohara T, Imaizumi T. Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(8):1280–1286. Doi: 10.1016/j.jacc.2004.12.071.

16. Министерство Здравоохранения РФ. Национальные рекомендации по ведению пациентов с аневризмами брюшной аорты. 2016. [Ministerstvo Zdravoohraneniya RF. Nacional'nye rekomendacii po vedeniyu pacientov s anevrizmami bryushnoj aorty. 2016. (In Russ.)].

17. Ailawadi G, Eliason JL, Upchurch GR Jr. Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003;38(3):584–588. Doi: 10.1016/s0741-5214(03)00324-0.

18. Milne AA, Adam DJ, Murphy WG, Ruckley CV. Effects of asymptomatic abdominal aortic aneurysm on the soluble coagulation system, platelet count and platelet activation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999;17(5):434–437. Doi: 10.1053/ejvs.1998.0790.

19. Hannawa KK, Cho BS, Sinha I, Roelofs KJ, Myers DD, Wakefield TJ, Stanley JC, Henke PK, Upchurch GR Jr. Attenuation of experimental aortic aneurysm formation in P-selectin

knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1085:353–359. Doi: 10.1196/annals.1383.014.

Информация об авторах

Светликов Алексей Владимирович – канд. мед. наук, доцент, зав. отделением ФГБУЗ «Клиническая больница № 122 им. Л. Г. Соколова» ФМБА РФ, Санкт-Петербург, e-mail: asvetlikov@mail.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8652-8778>.

Хубулава Геннадий Григорьевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. кафедрой клиника хирургии (усовершенствования врачей) им. П. А. Куприянова ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail ggkh07@rambler.ru.

Ермаков Алексей Игоревич – врач центральной клинко-диагностической лаборатории ФГБВОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail Aleksey Ermakov@szgmu.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3435-5881>.

Гайковая Лариса Борисовна – д-р мед. наук, зав. кафедрой биологической и общей химии, зав. центральной клинко-диагностической лабораторией ФГБВОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail Larisa.Gaikovaya@szgmu.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1000-1114>.

Гуревич Виктор Савельевич – д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела ФГБУЗ «Клиническая больница № 122 им. Л. Г. Соколова» ФМБА РФ, Санкт-Петербург, e-mail ater@med122.com.

Authors information

Svetlikov Aleksey V. – MD, PhD, Associate Professor, Chief of Department, L. G. Sokolov Clinical Hospital № 122 of the Federal Medical Biological Agency of the Russian Federation, St. Petersburg, e-mail: asvetlikov@mail.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8652-8778>.

Khubulava Gennadiy G. – MD, PhD, DSc, Professor, Academician of Russian Academy of Sciences, Head Department of Surgery (Education of Doctors), Military Medical Academy named after S. M. Kirov, St. Petersburg, e-mail ggkh07@rambler.ru.

Ermakov Aleksei I. – physician analyst at the Central clinical laboratory department, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, St. Petersburg, e-mail: aleksei.ermakov@szgmu.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3435-5881>.

Gaikovaya Larisa B. – MD, PhD, Professor Department of biological and general chemistry, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, St. Petersburg, e-mail: largaykovaya@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1000-1114>.

Gurevich Victor S. – MD, PhD, DSc, Professor, Head of Department, L. G. Sokolov Clinical Hospital № 122 of the Federal Medical Biological Agency of the Russian Federation, St. Petersburg, e-mail: ater@med122.com.