

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 612.111.7:615.835.3

DOI 10.23648/UMBJ.2018.30.13984

АГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ И ЭЛАСТИЧНОСТЬ МЕМБРАНЫ ТРОМБОЦИТА ПРИ ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ

В.И. Рузов¹, Э.Н. Алтынбаева¹, М.Н. Горячая¹, Б.Б. Костишко¹,
О.Л. Арямкина¹, Л.Т. Низамова¹, Н.Т. Тагирова²

¹ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия;

²ГУЗ «Ульяновский областной клинический госпиталь ветеранов войн», г. Ульяновск, Россия

e-mail: viruzov@yandex.ru

Цель работы – оценить характер изменений упруговязкостных свойств мембраны тромбоцита при гипербарической оксигенотерапии у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС).

Материалы и методы. Обследовано 24 пациента со стабильной стенокардией II–III ФК в возрасте 52,9±11,5 года, соотношение мужчин и женщин 2:1. Исследовалось состояние спонтанной и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, эластические свойства тромбоцитов по параметрам упруговязкостных свойств методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) клеточной мембраны тромбоцита человека при применении 5-дневного курса гипербарической оксигенации (ГБО) в режиме 1,2АТА по 40 мин в комплексной терапии ИБС.

Результаты. При ИБС диагностируются нормаагрегация (42 %) и нарушения тромбоцитарного звена гемостаза – гиперагрегация (33 %) и гипоагрегация (25 %). Применение курса ГБО-терапии у пациентов с повышенной агрегацией тромбоцитов сопровождалось снижением модуля упругости, что свидетельствует о повышении эластичности мембраны. Показатели упругости, рассчитанные по модулю Юнга, после курса лечения методом ГБО достоверно уменьшались у мужчин и увеличивались у женщин.

Выводы. Разработка на основе АСМ методики оценки функциональной активности тромбоцитов позволит выявлять структурную модификацию поверхности мембраны клетки на самых ранних этапах их активации.

Ключевые слова: гипербарическая оксигенация, атомно-силовая микроскопия, агрегация тромбоцитов.

Введение. Известно, что состояние мембраны определяет реологические свойства клеток крови, а изменения молекулярной организации мембраны тромбоцитов можно рассматривать в качестве патогенетического звена тромбоцитарного каскада. Структурная модификация липидного компонента клеточных мембран проявляется конформацией встроенных в них белков [1, 2], а результатом структурной модификации фосфолипидного компонента мембраны тромбоцитов является повышение микровязкости липидной фазы.

В настоящее время доказана важнейшая роль гомеостаза, в т.ч. тромбоцитарного звена, в патогенезе ишемической болезни сердца (ИБС) [3–5]. Активация тромбоцитов является ключевым звеном патогенеза не только хронического процесса, но и острых коронарных синдромов и во многом определяет выраженность нарушений коронарного кровотока и перегрузки миокарда [6–9].

В клинической практике для коррекции ишемических и гипоксических состояний широкое применение находит лечение мето-

дом гипербарической оксигенации (ГБО) [10], механизм действия которой заключается в увеличении кислородной емкости крови за счет дополнительного растворения кислорода в плазме в результате повышения парциального давления кислорода во вдыхаемой газовой смеси вследствие увеличения общего барометрического давления внешней среды обитания. Незначительное пресыщение тканей организма воздушной средой при гипербарии вызывает легко компенсируемую гипокоагуляцию в результате медленного образования тромбопластина и тромбина, а также снижения его активности. При воздействии гипербарического кислорода снижаются коагуляционные свойства крови, уменьшаются агрегаты тромбоцитов при их исходном повышении, количество тромбоцитов в периферической крови [11]. Однако характер ультраструктурных изменений тромбоцитов изучен недостаточно, а имеющиеся данные носят противоречивый характер. В качестве рабочей гипотезы было предположено, что изменения эластичности мембраны влияют на процессы агрегации тромбоцитов, которые состоят из структурных белков, определяющих механические свойства мембраны. При снижении эластичности и вязкости клеточной мембраны повышается показатель модуля Юнга, что отражается на ее жесткости [12].

Цель исследования. Оценить характер изменений упруговязкостных свойств мембраны тромбоцита при гипербарической оксигенотерапии у пациентов с ишемической болезнью сердца.

Материалы и методы. Обследовано 24 пациента со стабильной стенокардией II–III ФК в возрасте $52,9 \pm 11,5$ года (соотношение мужчин и женщин 2:1), находящихся на стационарном лечении в ГУЗ «Ульяновский областной клинический госпиталь ветеранов войн» в 2016–2017 гг. Диагноз верифицировался на основании стандартных критериев с применением всего комплекса лабораторных и инструментальных методов исследования. Все больные находились на стандартной базисной терапии с использованием бета-блокаторов, статинов, ингибиторов АПФ, аспирина в среднетерапевтических дозировках.

Пациенты дополнительно проходили курсы ГБО на барокамерах БЛКС 301М, 303МК (Россия) в режиме 1,2АТА. Проводилось 5 сеансов с длительностью воздействия 40 мин ежедневно.

Для исследования тромбоцитарного звена гемостаза забор крови (до и после курса ГБО-терапии) производился натощак из вены, при этом за сутки до проведения исследования исключалось употребление больными кофеиносодержащих и алкогольных напитков, жирных, острых, пряных блюд, специй и чеснока, курение, ограничивались физические и психоэмоциональные нагрузки. Кровь у пациента для исследования получалась самотеком из локтевой вены через иглу 19G непосредственно в пластиковую пробирку с антикоагулянтом (3,2 % цитрат натрия) в соотношении 1:9. Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы кровь центрифугировалась при 1000 об/мин в течение 18 мин.

У всех пациентов до и после 5-дневного курса ГБО исследовалась спонтанная и АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов при помощи 2-канального лазерного анализатора «Биола LA-230-2» (Россия) методом световой агрегометрии. Функциональное состояние тромбоцитов при оценке спонтанной и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов расценивалось как гиперагрегация, гипоагрегация и нормагрегация, в связи с чем пациенты были рандомизированы на три группы: первая – пациенты с гиперагрегацией, вторая – с гипоагрегацией, третья – с нормагрегацией.

Упруговязкостные свойства клеточной мембраны тромбоцитов изучались методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) сканирующим зондовым микроскопом Solver P47-PRO (Nt-MDT, Россия) в контактном режиме с использованием кантилевера типа PNP-DB. С помощью модуля изометрического сжатия мембраны (модуль Юнга) с использованием модели Герца, характеризующего способность клетки к деформациям, возникающим при взаимодействии мембраны с вершиной микроскопического зонда, оценивалось состояние мембраны тромбоцитов [13].

Фактический материал обрабатывался при помощи пакета Statistics 10.0. В связи с малыми группами применялись непараметрические методы статистической обработки.

Результаты. Изучая исходные параметры тромбоцитарного звена гемостаза по оценке спонтанной и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, установили, что более чем в половине случаев (58 %) у больных ИБС диагностируются нарушения тромбоцитарного звена гемостаза в виде гипер- (33 %),

гипоагрегации (25 %) и менее чем в половине случаев (42 %) – нормагрегации.

Изучение влияния 5-дневного курса ГБО показало недостоверные изменения спонтанной агрегации тромбоцитов (табл. 1) в виде тенденции к снижению средних показателей. Одновременно отмечалась аналогичная направленность изменений при 0,1 и 1 мкмоль/л концентрации АДФ-индуцированной агрегации и увеличение показателей при концентрации 5,0 мкмоль/л АДФ.

Таблица 1

Сравнительная оценка показателей агрегации и упругости тромбоцитов до и после лечения методом ГБО ($M \pm Sd$)

Показатель	До ГБО	После ГБО	Критерий достоверности p
Спонтанная агрегация, отн. ед.	1,39 $\pm$ 0,44	1,20 $\pm$ 0,14	>0,05
Спонтанная агрегация у мужчин, отн. ед.	1,46 $\pm$ 0,47	1,20 $\pm$ 0,14	>0,05
Спонтанная агрегация у женщин, отн. ед.	1,16 $\pm$ 0,30	1,20 $\pm$ 0,17	>0,05
0,1 АДФ-индуцированная агрегация, отн. ед.	1,63 $\pm$ 0,45	1,57 $\pm$ 0,64	>0,05
1,0 АДФ-индуцированная агрегация, отн. ед.	3,42 $\pm$ 1,74	2,53 $\pm$ 1,58	>0,05
5,0 АДФ-индуцированная агрегация, %	36,61 $\pm$ 18,15	39,46 $\pm$ 14,3	>0,05
Модуль Юнга, МПа	0,78 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,22	<0,05
Модуль Юнга при гиперагрегации, МПа	0,84 $\pm$ 0,19	0,42 $\pm$ 0,16	<0,05
Модуль Юнга при гипоагрегации, МПа	0,74 $\pm$ 0,22	0,74 $\pm$ 0,04	>0,05
Модуль Юнга при нормагрегации, МПа	0,71 $\pm$ 0,20	0,63 $\pm$ 0,24	>0,05
Модуль Юнга у мужчин, МПа	0,78 $\pm$ 0,21	0,54 $\pm$ 0,15	<0,05
Модуль Юнга у женщин, МПа	0,79 $\pm$ 0,16	0,85 $\pm$ 0,26	>0,05

Гендерная оценка средних значений спонтанной агрегации и модуля упругости до ГБО у мужчин и женщин не выявила значимых отличий ($p > 0,05$). Однако, учитывая малую выборку пациентов женского пола, сделать окончательные выводы не представляется возможным.

Оценка изменений упруговязкостных свойств мембраны тромбоцитов в зависимости от их агрегационной активности показала, что применение курса ГБО-терапии у пациентов с повышенной агрегацией тромбоци-

тов сопровождалось достоверным снижением модуля упругости, что свидетельствует о повышении эластичности мембраны. У пациентов с нормагрегацией тромбоцитов после лечения методом гипербарической оксигенации отмечалась тенденция к снижению показателя упругости их мембраны. При гипоагрегации наблюдалось полное отсутствие динамики модуля Юнга.

При сравнении активности спонтанной агрегации тромбоцитов до и после 5-дневного курса ГБО выявлено недостоверное сниже-

ние показателей агрегации ($p > 0,05$) на фоне снижения модуля Юнга ($p < 0,05$).

Представляет интерес реакция спонтанной активации тромбоцитов у мужчин и женщин. Применение ГБО сопровождалось разнонаправленными изменениями в виде незначительного уменьшения агрегационной активности у мужчин ($p > 0,05$) и ее увеличения у женщин ($p > 0,05$). Показатели упругости (модуль Юнга) у пациентов со спонтанной агрегационной активностью после курса ГБО достоверно уменьшались у мужчин ($0,78 \pm 0,21$ vs $0,54 \pm 0,15$ МПа, $p < 0,05$) и увеличивались у женщин ($0,79 \pm 0,16$ vs $0,85 \pm 0,26$ МПа, $p > 0,05$), что может свидетельствовать о повышении жесткости мембраны у женщин ($p < 0,05$).

Обсуждение. Изменения функционально-метаболического состояния тромбоцитов, возникающие при ГБО, характеризовались снижением модуля упругости у мужчин с исходно повышенной спонтанной агрегацией. У пациентов с нормальной и сниженной функцией тромбоцитов достоверных изменений мембранной активности не наблюдалось, что, очевидно, связано с меньшей интенсификацией свободнорадикального окисления (СРО) липидов. Известно, что увеличение интенсивности СРО мембранно-форменных элементов крови сопровождается нарастанием активности фосфолипазы 2А, которая является мощным усилителем влияния свободнорадикальных процессов на компоненты биомембраны липидной природы и агрегацию тромбоцитов [14]. Известно, что накопление активных форм кислорода, вызывая окислительную модификацию белковых липидных молекул, нарушает структуру мембраны клетки. Мембранно-патологические процессы, в частности активация перекисного окисления липидов в клетках, в конечном итоге приводят к нарушению их целостности, что проявляется в их функциональной несостоятельности [15].

Одним из возможных механизмов влияния ГБО может являться активизация антиоксидативных ферментов, которые блокируют вызываемое перекисным окислением липидов изменение мембраны.

Исходя из вышеизложенного можно предположить, что ГБО выступает в качестве фактора, детерминирующего изменения мембраны тромбоцитов только при повышенной жесткости.

Логично предположить, что изменения эластичности мембраны сопровождаются изменениями в т.ч. рецепторного аппарата, определяющего процессы агрегации тромбоцитов, состоящих из белков, большинство из которых входят в состав цитоскелета и являются одновременно структурными белками, определяющими механические свойства мембраны.

Заключение. Результаты данного исследования демонстрируют, что гипербарическая оксигенация способствует повышению эластичности мембраны активированных тромбоцитов у мужчин, страдающих ИБС, а модуль упругости мембраны может быть использован в качестве маркера эффективности ГБО. Разработка на основе АСМ методики оценки функциональной активности тромбоцитов позволит обнаруживать структурную модификацию поверхности мембраны клетки на самых ранних этапах их активации. Рассматривая модуль упругости в качестве потенциального маркера патологического процесса, АСМ-диагностика даст возможность не только выявлять заболевание на ранних сроках развития, но и отслеживать эффективность коррекции в динамике [16]. Полученные результаты могут быть обоснованы целесообразности применения ГБО в указанных режимах для коррекции гиперреактивности тромбоцитов и тем самым расширения показаний для использования данного метода.

Литература

1. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции: пер. с англ. Москва: Мир; 1997. 624.
2. Древаль В.И. Изменения липидного и белкового компонентов плазматических мембран при перекисном окислении липидов. Биохимия. 1986; 51 (9): 1562–1569.
3. Задюченко В.С. Изменения тромбоцитарного звена гемостаза у больных ишемической болезнью сердца. Кардиология. 1989; (10): 51–54.

4. Никитина Н.М. Состояние антитромбогенной активности сосудистой стенки у больных стабильной стенокардией. Взаимосвязь с гемореологическими нарушениями. Тромбоз, гемостаз и реология. 2002; (2): 33–37.
5. Salomaa V. Association of fibrinolytic parameters with early atherosclerosis. The AR-IC study. Atherosclerosis risk in communities study. Circulation. 1995; 91 (2): 284–290.
6. Зубаилов Д.А. Функции и диагностическое значение микровезикул в крови. Клиническая гемостазиология и реология в сердечно-сосудистой хирургии: материалы 2-й Всероссийской (с международным участием) научной конференции. Москва; 2005: 109–110.
7. Шалаев С.В. Рекомендации по антитромбоцитарным вмешательствам в лечении и профилактике острых коронарных синдромов. Актуальные проблемы гемостазиологии и эндотелиологии: сб. науч. тр. Омский научный вестник (прил.). 2003; 3 (24): 49–55.
8. Kamath S. Platelet activation: assessment and quantification. Eur. Heart J. 2001; 22 (17): 1561–1571.
9. Karim S. Cyclo-oxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. J. Biol.Chem. 1996; 271 (20): 12042–12048.
10. Mathieu D. Handbook of hyperbaric medicine. Springer Netherlands; 2006. 720.
11. Байдин С.А., Граменицкий А.Б., Рубинчик Б.А., ред. Руководство по гипербарической медицине. Москва: Медицина; 2008. 560.
12. Bukharaev A.A., Mozhanova A.A., Nurgazizov N.I., Ovchinnikov D.V. Measuring local elastic properties of cell surfaces and soft materials in liquid by AFM. Physics of low-dimensional structures. 2003: 31–38.
13. Быков И.В. Развитие и автоматизация методов измерения рельефа и локальных свойств биологических объектов в атомно-силовой микроскопии: дис. ... канд. физ.-мат. наук. Москва; 2010.
14. Пьянов М.В. Роль оксидативного стресса в нарушении функционально-метаболического состояния форменных элементов крови при эндотоксикозе: дис. ... канд. биол. наук. Москва; 2011.
15. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. Москва: Наука/Интерпериодика; 2001. 343.
16. Мороз В.В., Черныш А.М., Яминский А.В., Козлова Е.К., Киселев Г.А., Филонов А.С., Богущевич М.А., Гудкова О.Е. Перспективы применения методов атомно-силовой микроскопии в реаниматологии. Общая реаниматология. 2008; (4): 51–54.

AGGREGATION ACTIVITY AND ELASTICITY OF THROMBOCYTE MEMBRANE UNDER HYPERBARIC OXYGENATION

V.I. Ruzov¹, E.N. Altynbaeva¹, M.N. Goryachaya¹, B.B. Kostishko¹,
O.L. Aryamkina¹, L.T. Nizamova¹, N.T. Tagirova²

¹Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia;

²Ulyanovsk Regional Clinical Hospital for War Veterans, Ulyanovsk, Russia

e-mail: viruzov@yandex.ru

The aim of the work is to evaluate the changes in the elastic properties of the platelet membrane under hyperbaric oxygen therapy in patients with ischemic heart disease (IHD).

Materials and Methods. The authors examined twenty-four patients with stable angina (functional classes II – III), aged 52.9±11.5; male-to-female ratio was 2:1. They also examined spontaneous and ADP-induced platelet aggregation and the elastic properties of platelets by means of the atomic-force microscopy (AFM) of the human platelet cell membrane, using a 5-day course of hyperbaric oxygenation therapy (HOT) at 1.2ATA, 40 min. daily in complex IHD therapy.

Results. Patients with IHD demonstrate normal aggregation (42 %), platelet abnormalities in hemostasis, i.e. hyperaggregation (33 %) and hypoaggregation (25 %). The use of HOT in patients with increased platelet aggregation was accompanied by a decrease in the elastic modulus, which indicated the increase in membrane elasticity. The elastic indices after HOT, calculated according to Young's modulus, significantly decreased in men and increased in women.

Conclusion. The development of the AFM-based technique for evaluating functional activity of platelets allows us to detect a structural modification of the cell membrane surface at the earliest stages of their activation.

Keywords: hyperbaric oxygenation, atomic force microscopy, platelet aggregation.

References

1. Gennis R. *Biomembrany: molekulyarnaya struktura i funktsii* [Biomembranes – molecular structure and function]: translated from English. Moscow: Mir; 1997. 624 (in Russian).
2. Dreval' V.I. Izmeneniya lipidnogo i belkovogo komponentov plazmaticheskikh membran pri perekisnom okislenii lipidov [Changes in lipid and protein components of plasma membranes under lipid peroxidation]. *Biokhimiya*. 1986; 51 (9): 1562–1569 (in Russian).
3. Zadorichenko V.S. Izmeneniya trombotsitarnogo zvena gemostaza u bol'nykh ishemicheskoy boleznyu serdtsa [Changes in platelet hemostasis in patients with ischemic heart disease]. *Kardiologiya*. 1989; (10): 51–54 (in Russian).
4. Nikitina N.M. Sostoyanie antitrombogennoy aktivnosti sosudistoy stenki u bol'nykh stabilnoy stenokardiey vzaimosvyaz' s gemoreologicheskimi narusheniyami [The state of vascular wall antithrombogenic activity in patients with stable angina. Interrelation with haemorheological disorders]. *Tromboz gemostaz i reologiya*. 2002; (2): 33–37 (in Russian).
5. Salomaa V. Association of fibrinolytic parameters with early atherosclerosis. The AR-IC study. Atherosclerosis risk in communities study. *Circulation*. 1995; 91 (2): 284–290.
6. Zubairov D.A. Funktsii i diagnosticheskoe znachenie mikrovezikul v krovi [Functions and diagnostic value of microvesicles in blood]. *Klinicheskaya gemostaziologiya i reologiya v serdechno-sosudistoy khirurgii: materialy 2-y Vserossiyskoy (s mezhdunarodnym uchastiem) nauchnoy konferentsii* [Clinical haemostasiology and rheology in cardiovascular surgery: Proceedings of the 2nd All-Russian (with international participation) scientific conference]. Moscow; 2005: 109–110 (in Russian).
7. Shalaev S.V. Rekomendatsii po antitrombotsitarnym vmeshatelstvam v lechenii i profilaktike ostrykh koronarnykh sindromov [Recommendations on antiplatelet interventions in treatment and prevention of acute coronary syndromes]. Aktual'nye problemy gemostaziologii i endotelologii [Topical problems of hemostasiology and endotheliology]: sbornik nauchnykh trudov. *Omskiy nauchnyy vestnik*. 2003; 3 (24): 49–55 (in Russian).
8. Kamath S. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur. Heart J.* 2001; 22 (17): 1561–1571.
9. Karim S. Cyclo-oxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (20): 12042–12048.
10. Mathieu D. *Handbook of hyperbaric medicine*. Springer Netherlands; 2006. 720.
11. Baydin S.A., Gramenitsky A.B., Rubinchik B.A. *Rukovodstvo po giperbaricheskoy meditsine* [Guide to hyperbaric medicine]. Moscow: Meditsina; 2008. 560 (in Russian).
12. Bukharaev A.A., Mozhanova A.A., Nurgazizov N.I., Ovchinnikov D.V. Measuring local elastic properties of cell surfaces and soft materials in liquid by AFM. *Physics of low-dimensional structures*. 2003: 31–38.
13. Bykov I.V. *Razvitie i avtomatizatsiya metodov izmereniya rel'efa i lokal'nykh svoystv biologicheskikh obektov v atomno-silovoy mikroskopii* [Development and automation of methods for measuring the relief and local properties of biological objects in atomic-force microscopy]: dis. kand. fiz.-mat. nauk. Moscow; 2010 (in Russian).
14. Pyanov M.V. *Rol' oksidativnogo stressa v narushenii funktsional'no-metabolicheskogo sostoyaniya formennykh elementov krovi pri endotoksikoze* [The role of oxidative stress in the functional and metabolic state of blood corpuscles in endotoxemia]: dis. kand. biol. nauk. Moscow; 2011 (in Russian).
15. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shchikova E.B. *Okislitel'nyy stress. Biokhimicheskie i patofiziologicheskie aspekty* [Oxidative stress. Biochemical and pathophysiological aspects]. Moscow: Nauka/Interperiodika; 2001. 343 (in Russian).
16. Moroz V.V., Chernysh A.M., Yaminsky A.V., Kozlova E.K., Kiselev G.A., Filonov A.S., Bogushevich M.A., Gudkova O.E. Perspektivy primeneniya metodov atomno-silovoy mikroskopii v reanimatologii [Perspectives of atomic force microscopy in intensive-care medicine]. *Obschaya reanimatologiya*. 2008; (4): 51–54 (in Russian).