

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCH

УДК 616.1:616.876

© Коллектив авторов, 2012

### СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ СРЕДИ УЧАСТНИКОВ ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС – ФОКУС НА ТРОМБОЦИТЫ CARDIOVASCULAR DISEASE IN LIQUIDATORS OF CONSEQUENCES AT CHERNOBYL ATOMIC POWER STATION – FOCUS ON PLATELETS

Л.А. Авдушкина<sup>1</sup>, Н.В. Бычкова<sup>1</sup>, Т.В. Вавилова<sup>1,2</sup>, Н.Н. Зыбина<sup>1</sup>L.A. Avdushkina<sup>1</sup>, N.V. Bychkova<sup>1</sup>, T.V. Vavilova<sup>1,2</sup>, N.N. Zyбина<sup>1</sup><sup>1</sup> *Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова  
МЧС России, Санкт-Петербург*<sup>2</sup> *Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург*<sup>1</sup> *Russian Center of Emergency and Radiation Medicine named after A.M. Nikiforov The Ministry  
of Russian Federation for Civil Defense, Emergencies and Elimination of Consequences  
of Natural Disasters, Saint-Petersburg*<sup>2</sup> *North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg*

Контакт: Л.А. Авдушкина, e-mail: gemostazspb@gmail.com.

Исследована функциональная активность тромбоцитов у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС с сердечно-сосудистыми заболеваниями с использованием оптической агрегатометрии, тромбоэластометрии и оценкой экспрессии Р-селектина на тромбоцитах методом проточной цитометрии. Выявлены закономерности изменений в соответствии со степенью риска сердечнососудистых осложнений и проводимой терапией.

**Ключевые слова:** ликвидаторы последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции, сердечно-сосудистые заболевания, Р-селектин, тромбоэластометрия, агрегация тромбоцитов.

Platelet activity in liquidators of consequences at Chernobyl atomic power station with cardiovascular disease depends of risks and complex pharmacological therapy. P-selectin expression on platelet surface seems to be the most informative to show platelet activity at glance.

**Key words:** liquidators of consequences at Chernobyl atomic power station, cardiovascular disease, P-selectin, thromboelastometry, platelet aggregation.

**Введение.** Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают ведущее место в структуре заболеваемости, инвалидности и смертности у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС в отдаленном после аварии периоде [4]. К 2009 г. заболевания сердечно-сосудистой системы были выявлены у каждого третьего ликвидатора. Распространенность ССЗ среди ликвидаторов в целом в 4 раза превышает показатели контрольной группы того же возраста. За 1987–2003 гг. зарегистрированная заболеваемость выросла более чем в 3 раза [1]. Сердечно-сосудистые заболевания тесным образом сопряжены с нарушениями в системе свертывания крови.

При этом артериальная патология и острые ишемические события в различных бассейнах во многом определяются состоянием тромбоцитов. Хорошо известна и широко используется в клинической практике польза антиагрегантной терапии в предотвращении таких событий. Вопрос лабораторной оценки состояния тромбоцитарной функции на фоне использования лекарств, снижающих агрегацию, окончательно не решен. С этой точки зрения, интерес исследователей вызывают молекулярные методы оценки, которые позволяют разобраться в тонких механизмах активации и сделать это наиболее деликатно, не возбуждая тромбоциты на преаналитическом

этапе. В ряду других методов исследований оценка Р-селектина на поверхности тромбоцитов методом проточной цитометрии представляет интерес у больных с ССЗ [3].

Систематизированные исследования по оценке состояния тромбоцитарной функции у ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС в отдаленные сроки не проводились, и данные по этому вопросу в литературе отсутствуют. Не описана связь состояния гемостаза у данной группы больных с системными рисками сердечно-сосудистых осложнений.

**Цель исследования** — изучить тромбоцитарную активность у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС различными методами и оценить её связь с риском осложнений сердечно-сосудистых заболеваний.

**Материалы и методы.** В исследование включено 180 человек (мужчины): 74 ликвидатора последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции (далее по тексту — ликвидаторы) в возрасте от 42 до 78 лет (средний возраст составил  $60,0 \pm 8,5$  лет), страдающие сердечно-сосудистыми заболеваниями (ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, цереброваскулярная болезнь) более 10 лет, и 106 практически здоровых мужчин без тромбозов в анамнезе, не принимающих лекарственные препараты, влияющие на активность тромбоцитов, в возрасте от 34 до 61 года, средний возраст составил  $50,3 \pm 3,8$  лет. В исследования не были включены пациенты с выраженными нарушениями функции почек и печени, перенесшие эпизоды острых тромботических состояний за последние 6 месяцев, с онкологическими заболеваниями и принимающие антикоагулянты. Пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями были разделены на подгруппы в зависимости от степени суммарного риска сердечно-сосудистых осложнений (ССО) и смерти от них. Оценка суммарного сердечно-сосудистого риска проводилась согласно критериям, предложенным Всероссийским научным обществом кардиологов (Диагностика и лечение артериальной гипертензии, 3-й пересмотр, 2008) [2]. Таким образом, из 74 ликвидаторов 22 пациента (29%) имели средний риск (риск ССО 2), 17 (22,9%) — высокий риск (риск ССО 3) и 35 пациентов (47,3%) — очень высокий риск (риск ССО 4). Большинство пациентов находилось на медикаментозной терапии. Так, среди пациентов группы риска ССО 2 13,6% получали антигипертензивную терапию, 4,5% — гиполипидемическую терапию. Пациенты групп риска ССО 3 и ССО 4 чаще получали антигипертензивную и антиагрегантную терапию — 17,6% и 71,4%, 5,9% и 40,0% соответственно. Препараты, нормализующие липидный спектр, присутствовали в группе риска ССО 4 только у 2,9% больных.

Функциональную активность тромбоцитов оценивали с помощью лазерного агрегометра «Биола» (Россия). В богатой тромбоцитами плазме была исследована не индуцированная

активаторами (спонтанная) и индуцированная агрегационная способность тромбоцитов. В качестве индукторов агрегации тромбоцитов применяли растворы в конечной концентрации: АДФ (5,0 мкМ/мл и 1,25 мкМ/мл) и адреналин (5,0 мкг/мл), ООО «Технология Стандарт», Россия. Результат оценивали по среднему размеру агрегатов тромбоцитов (Т, Ед) и скорости агрегации (V, Ед/мин). Относительное количество тромбоцитов, экспрессирующих на своей поверхности Р-селектин, определяли методом проточной цитометрии на анализаторе «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», США) с использованием флуоресцентно меченных моноклональных антител CD61-FITC и CD62P-PE («Beckman Coulter», США). Данный метод был выбран в качестве стандартизованного и в наименьшей степени подверженного вариационности преаналитического этапа. Для интегральной оценки свертывания, включая тромбоцитарную активность, были изучены показатели тромбоэластометрии («ROTEM®» Pentapharm GmbH, Германия): начало реакции (СТ, с), время формирования сгустка фиксированной плотности (CFT, с), скорость образования сгустка (угол альфа), плотность сгустка (MCF, мм) в тестах NATEM (коагуляция без индуктора), INTEM (индуцированная коагуляция с участием тромбоцитов) и FIBTEM (индуцированная коагуляция без тромбоцитов). Исследование проводили в цельной крови, стабилизированной 3,8% раствором лимоннокислого натрия.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета программ «Statistica 6.0» и использованием W-критерия Шапиро — Уилкса, U-критерия Манна — Уитни, точного критерия Фишера, коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Данные представлены в виде медианы и 25% и 75% процентиля (Me [25%; 75%]).

**Результаты и обсуждение.** Анализ функциональной активности тромбоцитов выявил достоверное увеличение относительного количества тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, в исследуемой группе в сравнении со здоровыми донорами 10,4% [6,3; 15,9] и 6,4% [4,3; 8,2] соответственно ( $p < 0,001$ ); у 42,8% пациентов отмечалось превышение верхней границы референтного интервала. Сопоставимые результаты были получены с помощью оптической агрегометрии: у 39,4% пациентов была выявлена спонтанная агрегация тромбоцитов или повышенная способность тромбоцитов образовывать агрегаты малого размера в ответ на перемешивание без дополнительного добавления индуктора *in vitro*. Степень не индуцированной агрегации тромбоцитов была достоверно выше, чем у здоровых доноров: 1,47 [1,23; 1,80] и 1,15 [1,01; 1,28], соответственно ( $p < 0,001$ ). Результаты АДФ- и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов в исследуемой группе находились в пределах референтного интервала и не отличались от здоровых доноров.

По мере прогрессирования заболевания и нарастания рисков ССО количество тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин на поверхности, увеличивалось, то есть возрастала доля активированных клеток (табл. 1). У пациентов с риском ССО 2 и риском ССО 3 результаты измерения экспрессии Р-селектина достоверно отличались от группы здоровых доноров, а гиперактивность тромбоцитов встречалась у 47,6% и у 73,3% обследованных соответственно. Однако у пациентов с риском ССО 4 количество тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин на поверхности, находилось в пределах референтного интервала, а достоверных различий со здоровыми донорами получено не было, но в сравнении с группой риска ССО 3 эти различия были достоверны. По результатам оптической агрегатометрии во всех группах риска отмечалась спонтанная активация тромбоцитов, существенно более высокая, чем у здоровых лиц.

Показатели индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов групп риска ССО 2 и 3 были сопоставимы с группой здоровых доноров, в то время как у пациентов группы риска ССО 4 было отмечено достоверное снижение скорости агрегации тромбоцитов на всех индукторах

в различных концентрациях в сравнении как со здоровыми донорами, так и с группой риска ССО 3, а также – снижение степени агрегации тромбоцитов при АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (5,0 мкМ/мл).

Анализ тромбоцитарных показателей в зависимости от проводимой терапии показал достоверное увеличение количества тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, и увеличение скорости образования агрегатов тромбоцитов при адреналин-индуцированной агрегации в группе пациентов, не получавших не только антиагрегантную, но и антигипертензивную терапию, в сравнении с ликвидаторами, получавшими соответствующую терапию (табл. 2).

При анализе результатов тромбоэластометрии у ликвидаторов отмечено достоверное укорочение показателя СТ (154,5 [144,5; 165,0] против 171,0 [163,0; 180,0] у здоровых лиц), характеризующего невидимую фазу свертывания в присутствии тромбоцитов, тогда как в тесте без тромбоцитов различия не выявлялись. Эта тенденция достоверно сохранялась у пациентов с наибольшим сосудистым риском (табл. 3) и у пациентов, не получавших антигипертензивную терапию (табл. 4).

Таблица 1

*Лабораторные показатели тромбоцитарной активности в зависимости от рисков сердечно-сосудистых осложнений (Ме [25%; 75%])*

Показатель	Здоровые доноры (n = 106)	Ликвидаторы (n = 74)		
		Риск ССО 2 (n = 22)	Риск ССО 3 (n = 17)	Риск ССО 4 (n = 35)
Количество тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, %	6,45 [4,3; 8,2]	11,1** [9,0; 17,5]	13,2** [8,3; 25,7]	8,1§ [5,7; 12,5]
<i>Неиндуцированная агрегация тромбоцитов</i>				
Т, Ед	1,15 [1,01; 1,28]	1,38** [1,13; 1,74]	1,47** [1,22; 1,85]	1,48** [1,31; 1,70]
<i>АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов (5,0 мкМ/мл)</i>				
Т, Ед	10,0 [8,5; 11,8]	10,3 [9,9; 11,3]	11,6 [10,0; 13,8]	8,6§§ [7,8; 10,8]
V, Ед/мин	23,0 [19,3; 27,6]	23,6 [19,8; 28,4]	25,8 [22,3; 30,3]	20,0§ [16,9; 25,7]
<i>АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов (1,25 мкМ/мл)</i>				
Т, Ед	8,8 [6,2; 11,3]	8,4 [6,7; 10,5]	7,2 [6,4; 11,2]	7,3 [4,8; 9,9]
V, Ед/мин	19,1 [12,9; 26,3]	15,6 [6,8; 25,3]	15,4 [10,8; 25,0]	14,9* [8,1; 18,3]
<i>Адреналин-индуцированная агрегация тромбоцитов (5,0 мкг/мл)</i>				
Т, Ед	9,4 [8,1; 10,9]	10,2 [9,0; 11,8]	9,6 [7,2; 12,0]	8,5 [6,3; 9,6]
V, Ед/мин	11,8 [9,5; 15,2]	15,2 [10,7; 19,0]	15,9 [12,8; 18,6]	11,5§§ [6,7; 15,3]

\* – значимое отличие от здоровых доноров ( $p < 0,01$ );

\*\* – значимое отличие от здоровых доноров ( $p < 0,001$ );

§ – значимое отличие от группы риска ССО 3 ( $p < 0,05$ );

§§ – значимое отличие от группы риска ССО 3 ( $p < 0,001$ ).

Таблица 2

*Влияние антиагрегантной и антигипертензивной терапии на показатели тромбоцитарной активности (Ме [25%; 75%])*

Показатели	Антиагрегантная терапия		Антигипертензивная терапия	
	Да (n = 15)	Нет (n = 58)	Да (n = 31)	Нет (n = 42)
Количество тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, %	7,40 [5,5; 13,9]	11,0* [7,1; 16,4]	7,8 [5,7; 11,0]	11,9* [7,3; 21,6]
<i>Адреналин-индуцированная агрегация тромбоцитов (5,0 мкг/мл)</i>				
T, ЕД	8,8 [5,6; 9,6]	9,5 [7,7; 11,2]	7,9 [6,0; 9,5]	9,8 [8,9; 11,4]
V, ЕД/мин.	11,9 [6,7; 15,7]	14,0* [10,4; 17,7]	9,8 [6,7; 15,3]	15,3** [12,4; 19,6]

\* — значимое отличие между группами ( $p < 0,05$ );

\*\* — значимое отличие между группами ( $p < 0,001$ ).

Таблица 3

*Показатели тромбоэластометрии в зависимости от рисков сердечно-сосудистых осложнений (Ме [25%; 75%])*

Показатель	Здоровые доноры (n = 106)	Риск ССО 2 (n = 22)	Риск ССО 3 (n = 17)	Риск ССО 4 (n = 35)
<i>Индукцированная коагуляция в присутствии тромбоцитов</i>				
СТ	171,0 [163,0; 180,0]	153,0** [139,0; 167,0]	152,0** [146,5; 159,0]	158,0** [148,0; 166,0]
<i>Индукцированная коагуляция без тромбоцитов</i>				
СТ	56,0 [51,0; 61,0]	51,0* [48,0; 55,0]	51,0* [48,0; 57,0]	53,0 [50,0; 58,0]

\* — значимое отличие от здоровых доноров ( $p < 0,05$ );

\*\* — значимое отличие от здоровых доноров ( $p < 0,001$ ).

Таблица 4

*Влияние антиагрегантной и антигипертензивной терапии на показатели тромбоэластометрии (Ме [25%; 75%])*

Показатели	Антиагрегантная терапия		Антигипертензивная терапия	
	Да (n = 15)	Нет (n = 58)	Да (n = 31)	Нет (n = 42)
<i>Индукцированная коагуляция в присутствии тромбоцитов</i>				
СТ, с	159,0 [158,0; 165,0]	153,0* [140,0; 161,0]	159,0 [153,0; 168,0]	148,0** [139,0; 158,0]
CFT, с	71,5 [61,0; 84,0]	72,0 [64,0; 83,0]	74,0 [69,0; 86,0]	69,0* [59,0; 78,0]
<i>Индукцированная коагуляция без тромбоцитов</i>				
СТ, с	57,0 [52,0; 60,0]	51,0* [49,0; 55,0]	53,5 [50,0; 59,0]	51,0 [49,0; 54,0]

\* — значимое отличие от здоровых доноров ( $p < 0,05$ );

\*\* — значимое отличие от здоровых доноров ( $p < 0,001$ ).

Кроме того, у пациентов без антигипертензивной терапии отмечалось укорочение показателя CFT, характеризующего образование фибриновых нитей в тесте с тромбоцитами; в тесте без тромбоцитов различия между группами терялись.

По результатам корреляционного анализа результатов темограммы у пациентов группы риска ССО 2 было установлено, что время образования сгустка фиксированной плотности укорачивается ( $r = -0,50$ ;  $p < 0,05$ ), а скорость образования

сгустка увеличивается ( $r = 0,51$ ;  $p < 0,05$ ) с появлением спонтанной агрегации тромбоцитов в тесте «NATEM».

Результаты нашего исследования показали, что в популяции ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС с сердечно-сосудистыми заболеваниями имеет место повышенная функциональная активность тромбоцитов, которая выявляется различными лабораторными методами. Наиболее демонстративно это показано при исследовании количества тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин. Этот показатель был увеличен по сравнению с референсными значениями у 42,8% пациентов. Степень этих изменений зависела как от степени риска ССО, так и от характера терапии. Нарастая по мере увеличения риска, количество тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, неожиданно снижалось при ССО 4. Объяснение этого феномена лежит в соотношении развивающихся нарушений гемостаза и проводимой терапии, которая была более активной и комплексной у больных с более высоким сосудистым риском. Так, почти все больные группы ССО 4 получали антигипертензивную и/или антиагрегантную терапию, что приводило к уменьшению активности тромбоцитов. Вместе с тем, у пациентов этой группы способность тромбоцитов к спонтанной агрегации *in vitro* оставалась высокой, как и в других группах риска ССО, в сравнении со здоровыми донорами. Усиленная спонтанная агрегация тромбоцитов, в которую вовлечены наиболее активные кровяные пластинки, отразилась на способности тромбоцитов формировать агрегаты при индукции различными дозами АДФ и адреналина. Уменьшение индуцированной агрегационной активности тромбоцитов у пациентов группы риска ССО 4, вероятно, была обусловлена как проводимой медикаментозной терапией, так и потреблением и устранением из кровотока наиболее активных клеток.

В литературе встречаются противоречивые данные об использовании метода тромбоэластометрии для оценки функциональной активности тромбоцитов [5–7]. Однако использованный нами дифференцированный подход к изучению состояния кровяных пластинок позволил установить, что выявленные изменения таких показателей, как СТ и CFT обусловлены прежде всего высокой тромбоцитарной активностью. Данное положение подтверждается наличием корреляционных связей показателя СТ и угла альфа (скорость образования сгустка) со спонтанной активацией тромбоцитов.

**Заключение.** Таким образом, проведенное исследование показало, что у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС с

сердечно-сосудистыми заболеваниями имеет место закономерное увеличение активности тромбоцитов, которое может быть выявлено различными методами: на клеточном уровне — по увеличению количества тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, на функциональном уровне — по спонтанной агрегации тромбоцитов и параметрам тромбоэластограммы (СТ, CFT). Изменения функциональной активности кровяных пластинок зависят от тяжести и прогрессирования заболевания и могут подвергаться редукции при активной патогенетической терапии.

### Литература

1. Астафьев О.М. Эпидемиологическая характеристика болезней системы кровообращения у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС, проживающих в северо-западном регионе России / О.М. Астафьев, Н.В. Макарова // Метаболические и гемодинамические механизмы развития заболеваний сердца и мозга у участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС в отдаленном периоде / под ред. С.С. Алексанина. — СПб.: Политехника-сервис, 2010. — Раздел I. — 344 с.
2. Всероссийское научное общество кардиологов [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.cardiosite.ru>, вход свободный.
3. Сироткина О.В. Иммунологические методы в оценке функциональной активности тромбоцитов у больных с сердечнососудистыми заболеваниями. / О.В. Сироткина [и др.] // Медицинская иммунология. — 2010. — Т. 12, № 3. — С. 213–218.
4. Шантырь И.И. Эпидемиологическая характеристика состояния здоровья ликвидаторов / И.И. Шантырь [и др.] // Ликвидаторы последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции: патология отдаленного периода и особенности медицинского обеспечения / под ред. С.С. Алексанина. — СПб., 2008. — С. 30–51.
5. McNulty S.E. Platelet concentrate effects on thrombelastography / S.E. McNulty [et al.] // Cardiothoracic Vasc. Anesth. — 1997. — № 11. — P. 828–830.
6. Orlikowski C.E. Thrombelastography in pregnant patients on low-dose aspirin / C.E. Orlikowski, J. Moodley, D.A. Rocke // Lancet. — 1991. — № 338. — P. 1276–1277.
7. Trentalange M. A comparison of thromboelastogram and template bleeding time for the evaluation of platelet function after aspirin ingestion / M. Trentalange, L. Walts // Clinical Anesthesia. — 1991. — № 3. — P. 377–381.