

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У БОЛЬНЫХ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ХОЛЕСТЕРИНА В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСАХ

С.А. Уразгильдеева, Л.В. Шатилина, В.И. Иванов, Н.И. Казеннова, В.С. Гуревич

НИИ кардиологии МЗ РФ лаборатория атеросклероза г. Санкт-Петербург

В большинстве случаев ишемическая болезнь сердца (ИБС) обусловлена атеросклеротическим поражением коронарных артерий. Лишь в 10 % случаев ишемия миокарда возникает вследствие спазма или анатомических аномалий сосудов сердца. В настоящее время установлено, что в патогенезе атеросклероза, наряду с нарушениями липидного обмена, участвуют и иммунные механизмы. Согласно аутоиммунной теории атеросклероза существенная роль в развитии заболевания принадлежит иммунным комплексам липопротеид — антитело, в состав которых в качестве антигена входят липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) (2). Возможной причиной приобретения ЛПНП аутоантигенных свойств является их модификация в ходе свободно-радикальных реакций (9,11). Помимо собственно атерогенного действия иммунные комплексы в повышенных концентрациях могут способствовать прогрессированию атеросклероза и утяжелению его клинических проявлений за счет влияния на реологические свойства крови и изменения функциональной активности тромбоцитов (8,12). Целью исследования послужило изучение содержания холестерина (ХС) в циркулирующих иммунных комплексах (ЦИК), уровня липидов, интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и функциональной активности тромбоцитов у больных ИБС со стенозированными и неизменными коронарными артериями.

Материалы и методы

Обследовано 24 больных ИБС мужчин в возрасте от 39 до 59 лет. По результатам коронарографического исследования больные разделены на две группы. В 7 случаях стенозов коронарных артерий не определялось, в 17 — выявлены поражения от 1 до 4 основных коронарных артерий, включая основной ствол левой коронарной артерии, переднюю межжелудочковую, огибающую и правую коронарную артерии. Для оценки выраженности изменений в коронарных артериях учитывалось число пораженных артерий, локализация стеноза (дистальное или проксимальное поражение), наличие диффузного поражения и коллатералей. В качестве интегрального показателя выраженности обструктивного поражения рассчитывался обструкционный индекс — ОИ (6). Стеноз до 25% просвета сосуда оценивался в 1 балл, стеноз до 50 % — 2 балла, стеноз до 75 % — 3 балла, до 99 % или субокклюзия — 4 балла, окклюзия артерии — 5 баллов. Суммарное поражение всех артерий в баллах составляло ОИ. При поражении основного ствола левой коронарной артерии (ЛКА) баллы удваивались.

В группу сравнения вошли 13 мужчин в возрасте от 23 до 37 лет (средний возраст 31,7 (1,2 года), у которых по результатам обследования не выявлено заболеваний сердечно-сосудистой системы.

В качестве объекта исследования использовалась цельная кровь, сыворотка и плазма крови обследуемых. Забор крови для исследования осуществлялся утром после 14-часового голодания.

Цельная кровь забиралась в пластиковые пробирки с цитратом натрия в качестве антикоагулянта в соотношении 1 : 9 и в сухие стеклянные пробирки для получения сыворотки. Полученная в ходе центрифугирования (30 минут при 2000 g) сыворотка тестировалась на наличие гемоглобина для исключения гемолиза.

Для выделения иммунных комплексов использовали методику осаждения раствором полиэтиленгликоля-6000 (ПЭГ), предложенную E.Szondy (13). К сыворотке добавляли равный объем 5% раствора ПЭГ-6000 (фирмы Ferak) в фосфатно — буферной смеси (рН= 7,20). После инкубации в течение 30 минут в ледяной бане с последующим центрифугированием (20 минут при 2000 g) полученный осадок трижды отмывали 2,5 % раствором ПЭГ, растворяли в 0,5 мл медиал-верналового буфера (рН= 7,50). С целью гомогенизации осадок подвергали ультразвуковой дезинтеграции на установке УЗДН-1 при частоте 22 кГц в течение 2 с. В полученном растворе определяли содержание холестерина с помощью реагентов фирмы «Boehringer Mannheim GmbH», затем производили перерасчет на 1 мл сыворотки.

Уровень общего ХС, триглицеридов (ТГ), ХС липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП) в сыворотке крови определяли при помощи реагентов фирмы «Boehringer Mannheim GmbH». Расчет содержания ХС липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП) осуществляли по формуле M.Friedwald (7). Коэффициент атерогенности (КА) рассчитывался по формуле, предложенной А.Н. Климовым (1).

Об интенсивности перекисного окисления липидов судили по образованию свободных радикалов, определяемых методом индуцированной хемилюминесценции по значению величины светосуммы свечения (S_{хл}) при добавлении к 0,1 мл сыворотки 0,2 мл 2 % раствора перекиси водорода, 0,4 мл 0,01 мМ раствора сульфата железа и 0,4 мл фосфатного буфера (3).

Определение активности СОД выполняли по методу M.Nishikimi (10), основанному на способности фермента ингибировать восстановление нитросинего тетразолия (НСТ) в присутствии НАД-Н и феназинметасульфата.

Определение индуцированной агрегации тромбоцитов в цельной крови осуществлялось с использованием импедансного агрегометра АИ-300 (СПб). При проведении анализа к 650 мкл цельной крови добавляли в качестве индуктора агрегации 60 мкл раствора аденозиндифосфата (конечная концентрация АДФ в пробе 5 мкмоль/л). По зарегистрированным агрегатограммам рассчитывалась максимальная амплитуда агрегации (А) в Ом.

Статистическая обработка результатов выполнялась на с использованием стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows, v.5.0; Statgraphics, v.7.0; Micro Cal Origin, v.2.8).

Результаты и обсуждение

У больных ИБС со стенозированными коронарными артериями по сравнению с пациентами с неизменными по данным

Таблица 1.

СОДЕРЖАНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСАХ, ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА, ИНТЕНСИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, АМПЛИТУДА АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ИБС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ИЗМЕНЕНИЙ В КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЯХ

| Показатель | Группа лиц без ССЗ | Больные ИБС со стенозами коронарных артерий | Р | Больные ИБС с неизменными коронарными артериями | р | Р' |
|-------------------------------|--------------------|---|---------|---|-------|---------|
| ХС-ЦИК, мг/дл | 2,02±0,43 | 5,68±1,20 | <0,05 | 2,81±0,70 | >0,05 | <0,05 |
| Общ.ХС, мг/дл | 202,9±14,01 | 237,9±11,16 | >0,05 | 215,6±15,6 | >0,05 | >0,05 |
| ХС ЛПВП, мг/дл | 43,35±2,26 | 32,15±2,31 | <0,0005 | 49,73±6,05 | >0,05 | <0,0005 |
| ХС ЛПНП, мг/дл | 129,4±12,84 | 158,08±9,94 | >0,05 | 134,04±11,8 | >0,05 | >0,05 |
| ТГ, мг/дл | 150,5±18,33 | 238,2±32,6 | <0,05 | 139,9±15,03 | >0,05 | >0,05 |
| КА | 3,66±0,44 | 6,94±0,65 | <0,0005 | 3,70±0,62 | >0,05 | <0,001 |
| S _{хл} , тыс.имп/30с | 26,66±2,44 | 33,25±1,61 | <0,005 | 28,39±3,70 | >0,05 | >0,05 |
| СОД, усл.ед/мл пл.мин | 1,73±0,17 | 1,16±0,10 | <0,0005 | 1,67±0,27 | >0,05 | <0,005 |

р — достоверность отличия от группы лиц без ССЗ,
Р' — достоверность отличия между подгруппами больных ИБС

Таблица 2

СОДЕРЖАНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСАХ, ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА, ИНТЕНСИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, АМПЛИТУДА АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ИБС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЧИСЛА ПОРАЖЕННЫХ АРТЕРИЙ

| Показатель | Группа лиц без ССЗ | Больные ИБС со стенозами 1-3 коронарных артерий | Р | Больные ИБС со стенозом основного ствола ЛКА | р | Р' |
|-------------------------------|--------------------|---|--------|--|---------|-------|
| ХС-ЦИК, мг/дл | 2,02±0,43 | 6,42±1,50 | <0,05 | 3,30±0,93 | >0,05 | >0,05 |
| Общ.ХС, мг/дл | 202,9±14,01 | 225,8±11,06 | >0,05 | 277,0 ±23,78 | <0,05 | <0,05 |
| ХС ЛПВП, мг/дл | 43,35±2,26 | 32,55±2,97 | <0,001 | 30,85±2,44 | <0,0005 | >0,05 |
| ХС ЛПНП, мг/дл | 129,4±12,84 | 146,19±9,88 | >0,05 | 196,78±17,83 | <0,05 | <0,05 |
| ТГ, мг/дл | 150,5±18,33 | 235,6±42,62 | >0,05 | 246,8±21,06 | <0,05 | >0,05 |
| КА | 3,66±0,44 | 6,64±0,83 | <0,001 | 7,95±0,26 | <0,0005 | >0,05 |
| S _{хл} , тыс.имп/30с | 26,66±2,44 | 33,87±1,84 | <0,05 | 31,25±3,58 | >0,05 | >0,05 |
| СОД, усл.ед/мл пл.мин | 1,73±0,17 | 1,21±0,12 | <0,001 | 1,03±0,08 | <0,05 | >0,05 |
| А, Ом | 2,11±0,33 | 3,46±0,53 | <0,05 | 5,03±1,02 | <0,005 | >0,05 |

р — достоверность отличия от группы лиц без ССЗ,
Р' — достоверность отличия между подгруппами больных ИБС

ангиографии сосудами обнаружены достоверно более низкий уровень ХС ЛПВП и более высокий коэффициент атерогенности, хотя по уровню общего ХС пациенты достоверно не различались (Табл. 1).

У больных со стенозами коронарных артерий наблюдался достоверно более высокий уровень ХС в ЦИК, чем у пациентов с неизменными коронарными артериями. У них выявлена также выраженная активация свободно-радикального окисления липидов — S_{хл} был достоверно выше, чем у здоровых лиц, но не значимо отличался от больных с неизменными коронарными артериями. Одновременно выявлено снижение активности СОД, при этом последняя у больных со стенозированным коронарным руслом была достоверно ниже, чем при нормальных КА.

Максимальная амплитуда АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в цельной крови у больных ИБС со стенозированными КА 3,88±0,49 Ом и достоверно отличалась от таковой в группе сравнения — 2,11±0,33 Ом (р < 0,05).

При анализе данных у больных ИБС с обструктивным поражением коронарного русла обнаружено, что с увеличением числа пораженных артерий уровень ХС ЦИК снижается, тогда как уровень общего ХС имеет тенденцию к повышению. Минимальным было содержание ХС в ЦИК в случаях, когда наряду со стенозированием трех магистральных сосудов, имелось поражение основного ствола левой коронарной артерии (Рис. 2).

У больных с поражением основного ствола ЛКА содержание общего ХС и ХС ЛПНП было достоверно выше, чем у пациентов без его изменений (Табл. 2). Значимых различий между подгруппами по уровню сво-

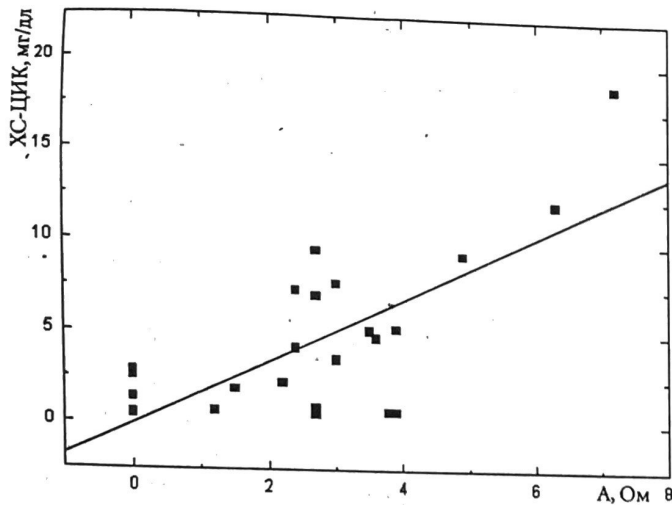


Рисунок 1.

Линейная зависимость между содержанием холестерина в циркулирующих иммунных комплексах и максимальной амплитудой АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных ИБС ($r = 0,716$; $p < 0,0005$)

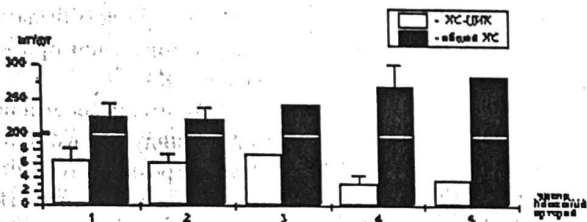


Рисунок 2.

Концентрация общего холестерина и содержание холестерина в циркулирующих иммунных комплексах у больных ИБС в зависимости от числа пораженных артерий

бодных радикалов и активности СОД получено не было. Амплитуда АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных ИБС со стенозами 1-3 коронарных артерий была достоверно выше, чем в группе сравнения. Еще более высоким оказался этот показатель у больных ИБС со стенозами основного ствола ЛКА и составил $5,03 \pm 1,02$ Ом, что более чем вдвое превышает нормальные значения ($p < 0,005$).

Больные ИБС с обструкционным индексом меньше 5 и больше 5 достоверно не различались ни по одному из исследованных показателей.

У больных ИБС с проксимальными стенозами уровень ХС ЦИК составлял $6,25 \pm 1,71$ мг/дл, у лиц с дистальным поражением коронарных артерий ($4,63 \pm 1,37$ мг/дл, но различия между ними оказались недостоверными. Связи между наличием или отсутствием коллатералей и уровнем ХС ЦИК не выявлено.

Полученные результаты согласуются с литературными данными, полученными Осиповым С.Г. при оценке общего уровня ЦИК и Virella G. et al., выявивших более высокое содержание окисленных ЛПНП в ЦИК при умеренном коронарном атеросклерозе (4,14). По-видимому, снижение уровня ЦИК, в том числе и со-

держающих ЛП, в сыворотке крови больных с наиболее значительными стенозами может быть связано с их фиксацией в зоне атеросклеротического поражения сосудов.

Выводы

1. У больных со стенозами коронарных артерий наблюдался достоверно более высокий уровень ХС ЦИК, чем у пациентов с неизменными коронарными артериями. Это сочеталось со снижением концентрации ХС ЛПВП, активности СОД и повышением функциональной активности тромбоцитов.

2. Концентрация ХС в ЦИК имела тенденцию к снижению при увеличении числа пораженных артерий, включая поражение основного ствола левой коронарной артерии.

3. Выявлена положительная корреляционная зависимость между уровнем ХС в ЦИК и максимальной амплитудой агрегации тромбоцитов у больных ИБС.

Литература:

1. Климов А.Н. Липиды и липопротеиды крови в возрастном аспекте и их связь с развитием атеросклероза у людей // Вестник АМН СССР.- 1980.- № 3.- с.45-49.
2. Климов А.Н., Денисенко А.Д. О роли иммунных комплексов липопротеид — антигенов в атерогенезе // Успехи совр. биологии.- 1988.- Т.106.- № 2 (5).- с.279-289.
3. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемиллюминесценции для оценок свободнорадикальных реакций в биологических субстратах // Биохимия и биофизика микроорганизмов.- Горький.- 1983.- с.41-48.
4. Осипов С.Г. Циркулирующие иммунные комплексы и иммунореактивность больных ИБС // Иммунология.- 1982.- № 6.- с.70-73.
5. Уразильдеева С.А., Шатилина Л.В., Денисенко А.Д. и соавт. Взаимосвязь между уровнем холестеринсодержащих циркулирующих комплексов и чувствительностью липопротеидов к перекисному окислению у больных ишемической болезнью сердца // Кардиология.- 1997.- т.37.- (10.- с.17-20.
6. Fitzgibbon G.M., Burggraf G.W., Groves T.D., Parker J.O. A double Master's two-step test: clinical, angiographic and hemodynamic correlation // Ann. Int. Med.- 1971.-V.74.- № 4.- P.509-517.
7. Friedwald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in lasma without use of the preparative ultracentrifuge // Clin. Chem.- 1972.- Vol.18.- № .- P.499-502.
8. Larsson A., Egberg N., Lindahl T.L. Platelet activation and binding of complement components to platelets induced by immune complexes // Platelets.-1994.- V.5.- № 3.- P.149-155.
9. Maggi E., Chiesa R., Melissano G. et al. LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis. A study of in vitro and in vivo oxidation markers // Arterioscler. Thromb.- 1994.- V. 14.- (12.- P.1892-1899.
10. Nishikimi M., Rao A., Yagi R. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine metasuifate and molecular oxygen // Biochem. Biophys. Res. Commun.- 1972.- V.46.- № 2.- P.849-854.
11. Salonen J.T., Yla-Herttuala S., Yamamoto R. et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis [see comments] // Lancet.- 1992.- Vol.339.- № 8798.- P.883-887.
12. Sharma H.M., Geer J.C. Experimental aortic lesions of acute serum sickness in rabbits // Amer.J.Pathol.- 1977.- V.88.- № 2.- P.255-260.
13. Szondy E., Mezey Z., F(st G. et al. Serial measurement of circulating immune complexes in myocardial infarction // Brit. Heart J.- 1981.- V.46.- № 1.- P.93-98.
14. Virella G., Munoz J.F., Galbraith G.M. et al. Activation of human monocyte-derived macrophages by immune complexes containing low-density lipoprotein. // Clin.Immunol.Immunopathol.- 1995.- Vol.75.- № 2.- P.179-189.