

О.С. Брусов, Г.П. Злобина

Научный центр психического здоровья РАМН, Москва, Российская Федерация

Активация тромбоцитов у мужчин, хронически больных шизофренией, в процессе выхода из приступа и формирования ремиссии

Цель настоящей работы — оценка степени активации тромбоцитов хронически больных шизофренией с приступообразным течением болезни в процессе выхода из приступа и формирования ремиссии. Оценивали число тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП) и в элюате после гель-фильтрации ОТП через колонку с сефарозой CL-2B у мужчин, хронически больных шизофренией, в процессе выхода из приступа и формирования ремиссии. Больные были обследованы на высоте приступа (визит 1), на этапе значительного улучшения состояния (визит 2) и на этапе сформированной лекарственной терапии (визит 3). В ОТП, полученной центрифугированием, число тромбоцитов было одинаковым у больных при 1-м, 2-м, 3-м визите и при этом значительно меньше, чем у здоровых доноров. Хроматография тромбоцитов с использованием сефарозы CL-2B продемонстрировала дополнительные потери тромбоцитов больных, при этом потери тромбоцитов возрастали от 1-го к 3-му визиту. Такие потери клеток указывают на снижение их резистентности к различным воздействиям, их активацию, несмотря на формирование ремиссии у больных.

Ключевые слова: тромбоциты, шизофрения, ремиссия.

(Вестник РАМН. 2013; 9: 42–45)

42

Введение

Увеличивающийся объем знаний о тромбоцитах позволяет открывать их новые свойства, указывающие на большое значение этих форменных элементов крови для проявления активности различных систем организма, делая возможным осуществление его интегративных функций [1–3]. Тромбоциты млекопитающих рассматривают не только как клетки, ответственные за гемостаз, но и как клетки с провоспалительной функцией, а также в качестве эффекторных иммунных клеток [4–6]. Обнаружение в тромбоцитах большого количества

специфического для мозга нейротрофического фактора (brain-derived neurotrophic factor) может указывать на осуществление ими функций взаимодействия между иммунной и нервной системой при повреждении нервных клеток [1, 7].

Изучение тромбоцитов больных шизофренией указывает на множественные изменения их функций [8, 9]. Ранее у хронических больных шизофренией в состоянии обострения психоза нами было выявлено значительное уменьшение числа тромбоцитов по сравнению со здоровыми донорами в обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП), полученной путем центрифугирования [10].

O.S. Brusov, G.P. Zlobina

Mental Health Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

Platelet Activity in the Chronic Schizophrenic Patients During Attacks Outcome and Remission Development

The purpose of this work was to evaluate the degree of activation of platelets chronically schizophrenic patients with paroxysmal course of the disease during outcome from the attack of disease or in process of forming of the remission. Platelets in platelet-rich-plasma (PRP) and after PRP gel-filtration through the column with Sepharose CL-2B taken from the ulnar vein of males with chronic schizophrenia during outcome from the attack of disease or in process of forming of the remission were measured. Patients were investigated on the peak of the disease attack (visit 1), at the stage of significant improvement of clinical state (visit 2), and at the stage of stable drug-induced remission (visit 3). Platelet quantities in PRP prepared by centrifugation are equal in patients in visits 1, 2 or 3. These platelets quantities are much less than similar platelet quantities in healthy individuals matched in age. The additional decreases of platelet quantities were found after the elution of PRP platelets from the column with Sepharose CL-2B. These additional platelet quantity losses are increased from visit 1 to visit 3. Such losses of cells indicate decrease in their resistance to various influences, their activation in spite of remission development in this group of patients.

Key words: platelets, schizophrenia, remission.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk – Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013; 9: 42–45)

Этот факт указывает на активацию тромбоцитов и может быть связан с образованием агрегатов активированных тромбоцитов, которые осаждаются вместе с эритроцитами и лейкоцитами при центрифугировании цельной крови. Также показано, что гель-фильтрация оставшихся в ОТП тромбоцитов через колонку с сефарозой CL-2B приводит к потере клеток на выходе из колонки в отличие от здоровых доноров. Этот факт тоже свидетельствует о значительной активации и повышенной адгезии оставшихся в ОТП тромбоцитов. Однако остается невыясненным вопрос, как меняется активация тромбоцитов у хронических больных шизофренией при переходе их в результате фармакотерапии из состояния психоза в стадию ремиссии, сопровождающуюся уменьшением степени выраженности большинства симптомов болезни и, как следствие, уменьшением общей суммы баллов по шкале позитивных и негативных симптомов шизофрении (PANSS scale) [11, 12]. Другими словами, неясно, будет ли наблюдаться параллельно с развитием ремиссии снижение активации тромбоцитов и, соответственно, повышаться число тромбоцитов в ОТП, полученной центрифугированием и в элюате, на выходе из колонки при гель-фильтрации. Ответ на этот вопрос позволит выяснить, является ли наблюдаемая нами ранее активация маркером тяжести состояния больного (state marker), или же наблюдавшийся феномен активации тромбоцитов при обострении психоза не связан с тяжестью состояния больного (trait marker).

Цель исследования: оценить степень активации тромбоцитов у хронических больных шизофренией с приступообразным течением болезни в процессе выхода из приступа и формирования ремиссии.

Пациенты и методы

Участники исследования

В экспериментах использовали тромбоциты 39 больных шизофренией мужчин с выраженными когнитивными нарушениями и 24 здоровых мужчин. Отбор пациентов, диагностику и клиническую оценку состояния больных проводили сотрудники лаборатории психофармакологии НЦПЗ РАМН. Средний возраст больных на момент проведения исследования составил 35 ± 10 лет, здоровых доноров — 29 ± 11 лет; длительность болезни — $10,8 \pm 8,1$ года.

На момент включения в исследование у всех пациентов была диагностирована параноидальная шизофрения с эпизодическим течением и нарастающим дефектом или эпизодическим течением со стабильным дефектом (рубрификация по МКБ-10 F 20.01 или F 20.02).

Все пациенты были госпитализированы в психиатрическую больницу в связи с развившимся психотическим приступом. В клинической картине у них имелись признаки галлюцинаторно-параноидного или параноидного синдрома.

До начала исследования все больные получали антипсихотическую терапию для купирования приступа, преимущественно типичными нейролептиками. Исследование проводили с момента перевода на монотерапию рисперидоном до наступления ремиссии. Дизайн исследования включал исследование тромбоцитов: до лечения рисперидоном в качестве единственного антипсихотика в терапевтической схеме (визит 1 — на высоте приступа); через 1 мес, в течение которого проводили лечение рисперидоном (визит 2 — этап значительного улучшения состояния больного и начало формирования

ремиссии), и через 3 мес лечения рисперидоном, на этапе сформированной лекарственной ремиссии (визит 3). Помимо рисперидона в терапевтическую схему могли быть включены другие психотропные средства (например, антидепрессанты, транквилизаторы), в соответствии с требованиями актуального клинического состояния больного.

Методы исследования

Кровь брали из локтевой вены утром натощак в пластиковые флаконы, содержащие цитратный антикоагулянт (1:10). ОТП получали стандартным способом, путем центрифугирования крови при 280 g в течение 15 мин при комнатной температуре. Суспензию тромбоцитов получали гель-фильтрацией с использованием сефарозы CL-2B [13]. Подсчет клеток проводили, как описано ранее [10], на световом микроскопе фирмы Leitz (Германия) при увеличении в 400 раз.

Статистическая обработка данных

Оценку результатов экспериментов осуществляли, используя пакет программ Statistica 8.0 (Statsoft, Inc., США). Для обчета экспериментальных результатов применяли тесты непараметрической статистики Манна–Уитни для независимых переменных или Вилкоксона для пар зависимых переменных, соответственно. В случае множественных сравнений при оценке различий числа тромбоцитов после выхода из колонки при 1, 2, 3-м визите использовали дисперсионный анализ Фридмана. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе работы определяли число тромбоцитов в ОТП, полученной центрифугированием, у больных шизофренией при 1-м визите и здоровых доноров. На рис. (кривая 1) представлено число тромбоцитов в 500 мкл ОТП, полученной центрифугированием цельной крови. Можно видеть, что число тромбоцитов в ОТП у больных шизофренией в 1,8 раза меньше соответствующего показателя у здоровых доноров (контрольные значения). Эти значения достоверно различаются по тесту Манна–Уитни ($p < 0,001$).

Число тромбоцитов в 500 мкл ОТП при 2-м и 3-м визите было практически одинаковым и не отличалось от соответствующих значений при 1-м посещении (см. рис., кривая 1). Число тромбоцитов в плазме при 2-м и 3-м визите также достоверно отличалось от такового для здоровых доноров: по тесту Манна–Уитни в обоих случаях $p < 0,00001$.

Далее было показано, что последующая гель-фильтрация тромбоцитов, оставшихся в ОТП при 1-м, 2-м и 3-м визите у больных и у здоровых доноров, через колонку с сефарозой CL-2B (см. рис., кривая 2) также приводила к статистически значимой потере клеток у больных на выходе из колонки в отличие от здоровых доноров. Очевидно, что число тромбоцитов, прошедших через колонку, у больных шизофренией при 1-м визите в 2,4 раза меньше соответствующего значения у здоровых доноров ($p < 0,003$ по тесту Манна–Уитни). Число тромбоцитов у больных шизофренией при 2-м и 3-м визите также было статистически значимо меньше соответствующего значения у здоровых доноров ($p < 0,00002$ в обоих случаях по тесту Манна–Уитни).

Кроме того, наблюдали уменьшение числа тромбоцитов, прошедших через колонку, от 1-го к 3-му ви-

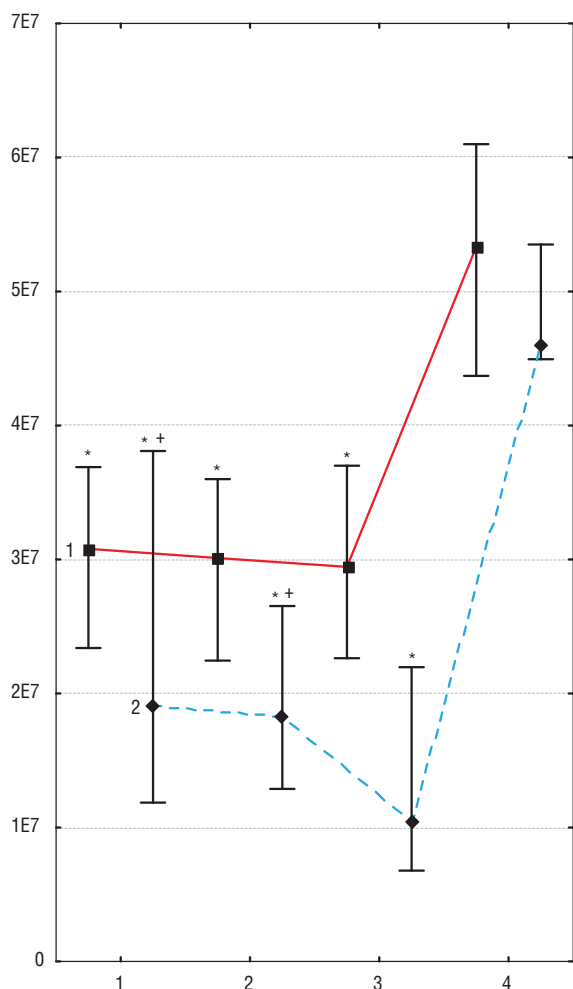


Рис. Центрифугированные тромбоциты.

Примечание. Кривая 1 — тромбоциты в обогащенной тромбоцитами плазме, 2 — тромбоциты, элюированные с колонки. По оси ординат — число тромбоцитов в 500 мкл плазмы крови (на рисунке представлены значения медианы); по оси абсцисс: 1, 2, 3 — визиты больных шизофренией, 4 — здоровые доноры. Вертикальные линии представляют значения переменной в 1-м и 3-м квартилях; * — достоверная ($p < 0,003$) разница по сравнению со здоровыми донорами; + — достоверная ($p < 0,017$) разница по сравнению с третьим визитом.

зиту ($p < 0,002$ при анализе Фридмана). Число тромбоцитов на выходе из колонки у больных шизофренией при 3-м визите было в 1,8 раза меньше, чем при 1-м. По тесту Вилкоксона для пар зависимых переменных значения числа тромбоцитов при всех визитах достоверно различались: для 1-го и 2-го визита $p < 0,017$; для 1-го и 3-го — $p = 0,002$; для 2-го и 3-го — $p = 0,005$.

Из рис. можно видеть, что число тромбоцитов больных шизофренией при 1-м, 2-м и 3-м визите на выходе из колонки (кривая 2) меньше, чем число тромбоцитов, наслаиваемое на колонку (кривая 1). По тесту Вилкоксона для пар зависимых переменных эти значения достоверно различались при всех визитах: при 1-м — $p < 0,02$; при 2-м — $p < 0,0002$; при 3-м — $p < 0,00005$. При 1-м и 2-м визите при гель-фильтрации на выходе из колонки терялось 38–39% клеток, при 3-м — около 65% клеток. Для здоровых доноров также показано уменьшение числа

клеток при гель-фильтрации тромбоцитов через сефарозу CL-2B, но при этом терялось лишь около 10% клеток. Число тромбоцитов здоровых доноров, элюированных с колонки, приблизительно в 2,5 раза превосходило соответствующие значения у больных шизофренией при 1-м и 2-м визите и было в 4,4 раза больше при 3-м.

Обсуждение

Результаты настоящего исследования указывают на то, что в процессе изменения степени тяжести состояния больного при формировании ремиссии наблюдается возрастание активации тромбоцитов при пропускании центрифугированных клеток через колонку с сефарозой CL-2B. Степень активации оценивали по числу клеток на выходе из колонки: чем выше уровень активации, тем меньшее число клеток элюирует с колонки. Таким образом, данный способ может стать инструментом, способным выявлять разную степень активации тромбоцитов в процессе формирования ремиссии.

В целом можно сделать заключение о том, что, вопреки ожиданиям, при формировании клинической ремиссии в результате лечения рisperидоном у больных шизофренией имеет место повышение уровня активации тромбоцитов. Возможной причиной появления в крови активированных тромбоцитов у больных шизофренией может быть изменение части клеток в результате выполнения ими защитных реакций, которые сопровождаются их активацией или дегрануляцией. Стимулы, способные взаимодействовать с мембраной тромбоцита, многообразны по происхождению и биохимическому строению [14]. Обнаружение у больных шизофренией активации некоторых параметров врожденного иммунитета, выражающейся в увеличении активности эластазы в плазме крови, повышении содержания фактора Виллебранда и С-реактивного белка [8], позволяет предположить, что одной из причин активации тромбоцитов является их участие в иммунных реакциях [4]. Известно также, что при шизофрении в крови обнаруживают ряд изменений, свидетельствующих о развитии эндотоксикоза [15]. В связи с этим зарегистрированная в настоящей работе активация тромбоцитов может быть связана также с повышенной токсичностью крови больных.

Необходимо также отметить, что разработка и применение биологических тестов, позволяющих давать точную количественную оценку статуса больного в процессе развития болезни, представляет значительный интерес для установления стандартных критериев, характеризующих ремиссию. Настоящее исследование является начальным этапом работы в этом направлении. Для внедрения в практику метода, предложенного в данной статье, необходимо провести дополнительные исследования, которые бы однозначно указывали на связь изучаемого параметра со степенью тяжести состояния больного. Нельзя также исключить, что возрастание уровня активации тромбоцитов у больных при длительной монотерапии рisperидоном может быть связано с токсическим действием этого препарата на тромбоциты.

Заключение

Ранее у хронических больных шизофренией в состоянии обострения психоза нами было выявлено значительное уменьшение количества тромбоцитов в ОТП,

полученной центрифугированием, по сравнению со здоровыми донорами. Гель-фильтрация оставшихся в ОТП тромбоцитов через колонку с сефарозой CL 2В приводила к потере клеток на выходе из колонки. Эти факты свидетельствуют об активации тромбоцитов. Однако оставался невыясненным вопрос, как меняется активация тромбоцитов хронических больных шизофренией при их переходе в результате фармакотерапии из психоза в ремиссию, сопровождающуюся снижением выраженности большинства симптомов болезни. Было не ясно, будет ли наблюдаться параллельно с развитием ремиссии снижение

активации тромбоцитов и, соответственно, повышаться количество тромбоцитов в ОТП и элюате на выходе из колонки. Результаты нашего исследования показывают, что при хроматографии тромбоцитов хронических больных шизофренией с использованием сефарозы CL 2В выявляется последовательное возрастание их активации в процессе выхода в ремиссию при 1-м, 2-м, 3-м визитах. Оценка степени активации проводилась по количеству клеток на выходе из колонки. Такой подход при дальнейшей разработке может явиться инновационным способом количественной оценки качества ремиссии болезни.

REFERENCES

1. Yamamoto H., Gurney M.E. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 1990; 10 (11): 3469–78.
2. Yeaman M.R., Tang Y.Q., Shen A.J. et al. Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infect. Immun.* 1997; 65 (3): 1023–1031.
3. Zarbock A., Polanowska-Grabowska R.K., Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 2007; 2 (3): 99–111.
4. Klinger M.H., Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.* 2002; 22 (9): 913–922.
5. Strous R.D., Shoenfeld Y. Schizophrenia, autoimmunity and immune system degradation: A comprehensive model updated and revisited. *J. Autoimm.* 2006; 27 (2): 71–80.
6. Yeaman M.R., Bauer A.S. Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Resist. Updates.* 1999; 2 (2): 116–126.
7. Toyooka K., Asama K., Watanabe Y., Muratake T., Takahashi M., Someya T., Nawa H. Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients. *Psychiatry Res.* 2002; 110 (3): 249–257.
8. Shcherbakova I.V., Kaleda V.G., Barkhatova A.N., Klyushnik T.P. *Zhurnal neurologii i psikiatrii – Journal of Neurology and Psychiatry.* 2005; 105(3): 43–46.
9. Belsham B. Glutamate and its role in psychiatric illness. *Hum. Psychopharmacol.* 2001; 16 (2): 139–146.
10. Zlobina G.P., Brusov O.S., Morozova M.A., Beniashvili A.G. *Zhurnal neurologii i psikiatrii – Journal of Neurology and Psychiatry.* 2009; 109(10): 47–50.
11. Leucht S., Beitinger R., Kissling W. On the concept of remission in schizophrenia. *Psychopharmacol.* 2007; 194 (4): 453–461.
12. Rossi A., Bagala A., Del Curatolo V., Scapati F., Bemareggi M.M., Giustra M.G. Remission in schizophrenia: one-year italian prospective study of risperidone long-acting injectable (RLA) in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Hum. Psychopharmacol.* 2009; 24 (7): 574–583.
13. Kiktenko A.I., Zlobina G.P., Shchurin M.R., Kleshchinov V.N. *Byulleten' eksperimental'noi biologii – Bulletin of Experimental Biology.* 1991; 112(11): 485–488.
14. Shitikova A.S. *Trombotsitarnyy gemostaz.* [Thrombocytic Hemostasis]. Saint-Petersburg, SPbGMU, 2000. 227 p.
15. Uzbekov M.G., Smolina N.V., Misionzhnik E.Yu., Molodetskikh A.V., Dobretsov G.E., Grizunov Yu.A. *Zhurnal neurologii i psikiatrii – Journal of Neurology and Psychiatry.* 2008; 108(5): 67–70.

FOR CORRESPONDANCE

Brusov Oleg Sergeevich, MD, chief of the clinical biochemistry laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Mental Health Research Center» of RAMS.

Address: bld. 16, build. 3, 2, Zagorodnoye Route, Moscow, 117152; **tel.:** (495) 952-91-41; **e-mail:** oleg_brusov@mail.ru

Zlobina Galina Petrovna, MD, senior research scientist of the clinical biochemistry laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Mental Health Research Center» of RAMS.

Address: bld. 16, build. 3, 2, Zagorodnoye Route, Moscow, 117152; **tel.:** (495) 952-91-41; **e-mail:** zlobina2000@mail.ru