

ТРОМБОЦИТНА АКТИВНОСТ И РЕВМАТИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

В. Пейчева

Клиника по ревматология, УМБАЛ "Св. Ив. Рилски" – София

PLATELET ACTIVITY AND RHEUMATIC DISEASES

V. Peycheva

Clinic of Rheumatology, UMHAT "Sv. Iv. Rilski" – Sofia

Резюме. Тромбоцитната активност е актуален биомаркер при мониторирането на клетъчната стимулация в ревматичните заболявания (СЛЕ, РА, СС). Тромбоцитните медиатори вземат участие в патогенезата на системните васкулити. Тромбоцитната активация чрез редица фактори (например тромбин – фактор IIa) играе ключова роля в патофизиологичния механизъм на възпалителните ставни заболявания.

Ключови думи: тромбоцитна активация, СЛЕ, РА, СС

Summary. Platelet activity is an actual biomarker in the monitoring of cell stimulation in rheumatic diseases (SLE, RA, SS). Platelet mediators take part in the pathogenesis of systemic vasculitides. Through a number of factors (e.g., thrombin-factor IIa), platelet activation plays a key role in the pathophysiological mechanism of the inflammatory joint diseases.

Key words: platelet activation, SLE, RA, SS

ФУНКЦИИ НА ТРОМБОЦИТИТЕ

Тромбоцитите са основен клетъчен компонент в хемостазата – активираните тромбоцити играят ролята на матрица за образуване на фибринов съсирек.

Тромбоцитите модулират възпалителния и имунния отговор посредством взаимодействия с левкоцитите и секреция на CD40, IL1 β , P-селектини, хемокини, Src кинази, металопроотеинази, секреция на тромбоцитен растежен фактор (PDGF).

Тромбоцитите секретират множество биоактивни медиатори. Те модулират функциите на други клетки, като освобождават биоактивни медиатори. Тромбоцитите съдържат три типа гранули – алфа-гранули, плътни гранули и лизозоми, чието съдържание се освобождава в циркулацията или техни белтъци се експресират на тромбоцитната повърхност след активиране. Алфа-гранулите съдържат: фибриноген, фактор на Von Willebrand (VWF), тромб фактор 4 (PF4), platelet-derived growth factor (PDGF), докато плътните гранули са богати на ADP и серотонин. Тромбинът води до освобождаване на повече от 300 белтъка.

Увеличеният брой молекули гликопротеин (GP) IIb/IIIa и P-selectin се експресират на тромбоцитната повърхност при активирането на тромбоцитите.

Тромбоцитите **участват във възпалителните процеси** посредством различни тромбоцитни медиатори:

- **Тромбоцитен CD40 лиганд** – може да индуцира производството на редица компоненти на възпалителния отговор: кислородни радикали, адхезионни молекули, хемокини и тъканен фактор.

- **Interleukin-1 β** – увеличава освобождаването на хемокини от клетки и индуцира адхезия на неутрофили и моноцити.

- **Микрочастици (малки везикули от Тр повърхност)** – освобождават хемокини, които довеждат до натрупване на моноцити или диференцирането им в макрофаги.

- **Тромбоцитен фактор 4** – индуцира експресията на **Е-селектин** от ендотелните клетки.

- **Металопроотеинази** – разграждащи матрикса ензими.

Тромбоцитите изпълняват важна роля и в запазването на съдовия интегритет – адхезират към местата на съдовото възвличане и привличат левкоцити и прогениторни клетки. Те образуват, натрупват и освобождават **стимулатори и инхибитори на ангиогенезата**, микрочастици в циркулацията, активират образуването на тромбин.

Известни са различни маркери за тромбоцитна активност:

А. Нарушения в броя на тромбоцитите

Б. Нарушения в тромбоцитната функция, които могат да бъдат:

Медиирани от активирането – промени в Тр повърхност

- P-селектин (разтворим и мембранно-свързан)

- Активиран GP IIb/IIIa рецептор

Медиирани от активирането – секреция от тромбоцитите

- CD40 и CD40 лиганд

- PECAM-1

Медиирани от активация и агрегацията

- Тромбоцитни микрочастици (MPs)

- Тромбоцитно-моноцитни агреганти

- Тромбоцитно-неутрофилни агреганти

Циркулиращи тромбоцити – нормалният брой на циркулиращите тромбоцити варира между $150-400 \times 10^9/l$. Биологичният им живот е около 8-10 дни. Нормално се освобождават около 10^1 от мегакариоцитите в костния мозък. Това може да бъде увеличено 10-кратно при увеличен търновър на тромбоцитите. Поне 24 часа след освобождаването си от костния мозък младите тромбоцити съдържат mRNA, улесняваща синтеза на белтъци в тромбоцитите. По време на активиране на тромбоцитите претърпяват промени във формата и обема. Агрегацията е свързана с освобождаване на произведени от тромбоцитите вазоактивни и хемостазни субстанции.

MPV навлиза в клиничната практика като индикатор на тромбоцитна реактивност – увеличение в стойността на MPV показва преобладаване на млади Тр в циркулацията поради повишен тромбоцитен търновър.

ТРОМБОЦИТОЗА И РЕВМАТОИДЕН АРТРИТ

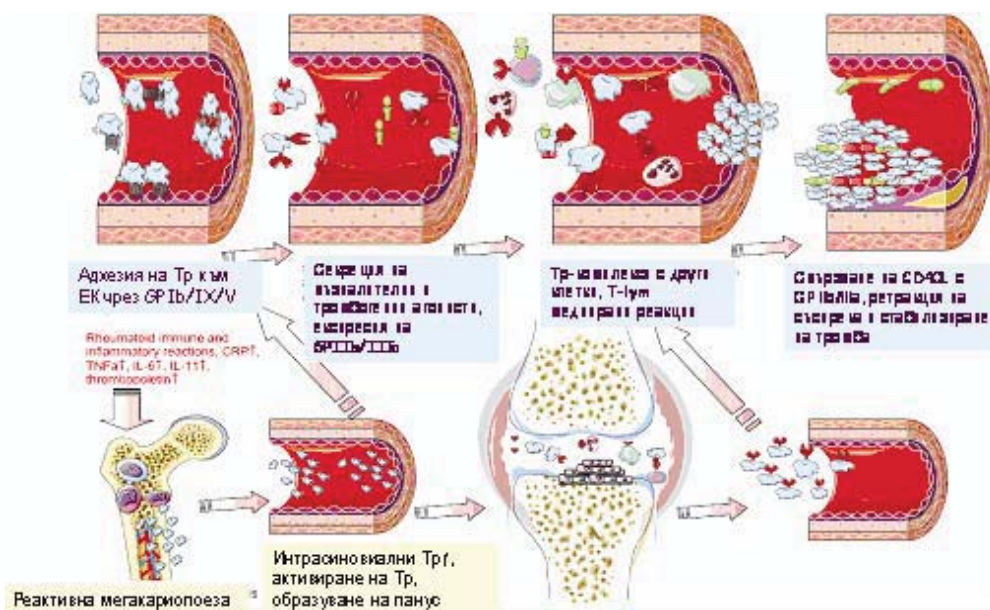
Броят на тромбоцитите често е повишен при пациенти с активен ревматоиден артрит и ювенилен хроничен артрит, вкл. реактивна тромбоцитоза. Реактивната тромбоцитоза вероятно е резултат на свръхпродукция от костния мозък, вследствие на намалената преживяемост на Тр и увеличената им консумация в кръвообращението (M. Farr et al.). Нивото на тромбоцитоза корелира с клинични и лабораторни параметри на активността на заболяването като CRP и СУЕ. Рецидивите на РА често са придружени от увеличаване на броя на тромбоцитите.

ВЪВЛИЧАНЕ НА ТРОМБОЦИТИТЕ ПРИ РЕВМАТОИДНИТЕ СИНОВИТИ

Има данни за активиране на **тромбоцитите при синовитите**. Тромбоцитите взаимодействат и прилепват към ендотелните клетки (ECs) и левкоцитите във възпалените синовиални съдове. (M. Schmitt-Sody et al., 2005). Последващата тромбоцитна агрегация води до образуване на фибринов съсирек и повлиява синовиалната микроциркулация. В експерименти, при антиген-индуцирани артрити се установява ролята на Р-селектин – адхезионна молекула, образувана при взаимодействието между тромбоцити, левкоцити и ЕС при възпалените стави (M. Schmitt-Sody et al., 2007). Други, произведени от тромбоцитите белтъци, като тромбоцитен растежен фактор (PDGF), силен ангиогенен фактор, предизвикват синовити и панус-подобна хиперплазия (модел на зайци – Y. Waguri-Nagaya et al., 2000).

Обобщено, **α -гранулите и плътните телца на тромбоцитите**, активирани от системното ревматоидно възпаление, могат да освобождават допълнително тромбоцитни възпалителни и имунни медиатори, улеснявайки започването и прогресията на синовитите и деструкцията на хрущялната тъкан. Допуска се също инхибитори на тромбоцитите с последващо намаление на тромбоцит-произлизашите възпалителни маркери да имат ползотворен ефект върху протичането на артрита.

РОЛЯ НА ЦИРКУЛИРАЩИТЕ И СИНОВИАЛНИТЕ ТРОМБОЦИТИ ПРИ РЕВМАТОИДЕН АРТРИТ



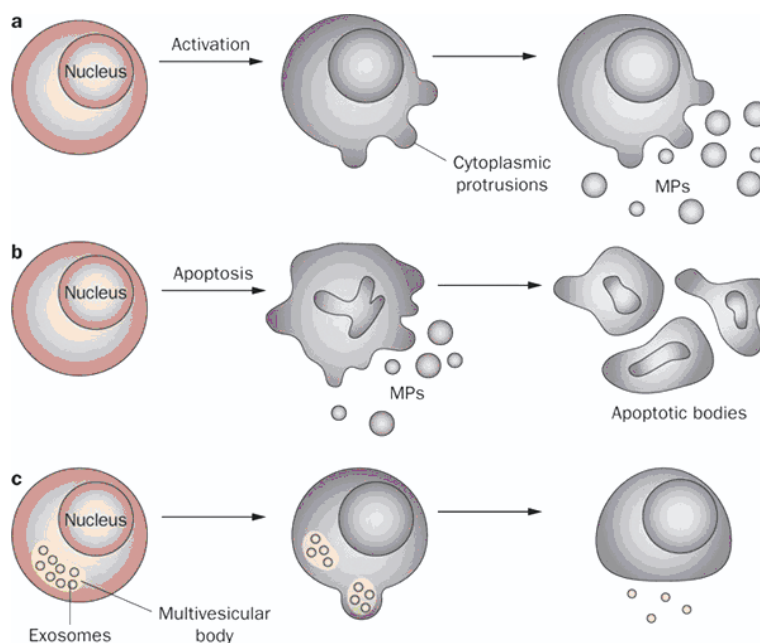
Фиг. 1. Роля на циркулиращи и синовиални тромбоцити при ревматоиден артрит

Разтворим Р-селектин – концентрацията на разтворимия Р-селектин в плазмата отразява тромбоцитната активация *in-vivo*. Високата концентрация на Р-селектин се свързва най-вече с извънредното му освобождаване от α -гранулите на тромбоцитите. Разтворимият Р-selectin улеснява взаимодействието между Т_H и Т-лимфоцити, неутрофили, моноцити и ендотелни клетки в мястото на възпаление при ревматичните заболявания. Междуклетъчните взаимодействия изискват участието и на друга адхезионна молекула – Р-селектин гликопротеин лиганд 1 (PSGL-1), която се експресира върху повърхността на активираните тромбоцити, лимфоцити, моноцити и левкоцити. Посредством свързване с PSGL-1 Р-селектинът медира адхезията на тромбоцитите и формирането на комплекси с левкоцити и моноцити. *Повишените нива на Р-селектин корелират с нивата на острофазовите белтъци и отразяват степента на системното възпаление при РА (Platelet Function in Rheumatoid Arthritis, 2007).*

МИКРОЧАСТИЦИТЕ – НОВИ БИОМАРКЕРИ ПРИ РЕВМАТИЧНИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Микрочастиците (MPs) са хетерогенна група мембранно-образувани везикули, които се освобождават от клетките по време на клетъчна активация и апоптоза. След като бъдат освободени от клетките чрез “издуване” – екзоцитоза на клетъчната мембрана, те действат като междуклетъчни сигнализиращи елементи. В зависимост от клетките, от които произхождат, и процеса на освобождаване MPs могат да активират хемостазата, съдовата реактивност, ангиогенезата и възпалението. Съответно на ролята на MPs в имунопатогенезата при пациентите с ревматично заболяване се установява значително увеличение в броя на микрочастиците в кръвта, което може да отразява степента и тежестта на заболяването (Nature Reviews. – Rheumatology, 6, 2010, 21).

Формиране и освобождаване на микрочастиците (С. Beyer et D. S. Pisetsky. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. – Nat. Rev. Rheumatol., 2009.).



Фиг. 2

Тромбоцитни микрочастици. При тромбоцитите освобождаването на MPs е резултат директно от клетъчна активация. Тромбоцитните MPs (PMPs) експресират специфични повърхностни маркери като:

- glycoprotein Iba polypeptide (GPIb α ; известен като CD42b),
- GPIIb (CD41), или GPVI (CD49),
- integrin- β 3 (CD61),
- лизозомните маркери CD68 или CD63

MPs взаимодействат с прицелните клетки по различни начини:

– Разтворими медиатори, освободени от MPs (e.g. IL-1 β) се свързват с рецептори на таргетните клетки и активират вътреклетъчна сигнализация. Така те пренасят проинфламаторни или антиинфламаторни сигнали;

– Селективен пренос на мембранни компоненти – напр. arachidonic acid, цитоплазмени протени (напр. CXCR4 и CCR5) и нуклеинови

киселини, които могат да променят функциите на таргетната клетка;

– Сливане на MPs с таргетните клетки, което води до неселективен трансфер на мембрани, цитозолни и ядрени компоненти, но може значимо да промени вида и характеристиките на таргетната клетка;

– “Поглъщане” от таргетните клетки. Съдържанието на “погълнатите” MPs, включително автоантигени, може да бъде обработено и представено от антиген-представящи клетки за стимулиране на специфични отговори.

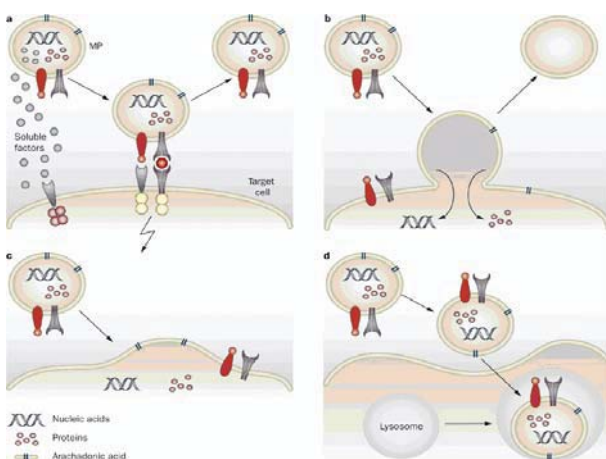
Установени са няколко механизма, по които MPs осъществяват имунна модулация (Beyer, C. et D. S. Pisetsky. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. – *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009).

1. Разтворими медиатори, освободени от MPs (e.g. IL-1 β) се свързват с рецептори на таргетните клетки и активират вътреклетъчна сигнализация.

2. Сливане на MPs с прицелните клетки води до неселективен трансфер на мембрани, цитозолни и ядрени компоненти и променя вида и характеристиките на прицелната клетка.

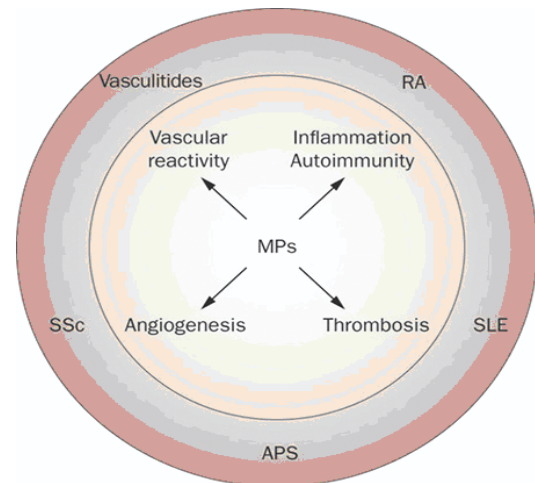
3. Селективен пренос на мембрани компоненти – напр. арахидонова киселина, цитоплазмени протени (напр. CXCR4 и CCR5) и нуклеинови киселини – променят функциите на таргетната клетка.

4. “Поглъщане” – съдържанието на “погълнатите” MPs, включително автоантигени, може да бъде обработено от антиген-представящи клетки за стимулиране на специфични отговори.



Фиг. 3

Микрочастиците имат множество функции в патогенезата на ревматичните болести (Beyer, C. et D. S. Pisetsky. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. – *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009).



Фиг. 4

Съвсем нови изследвания потвърждават участието на тромбоцитни микрочастици в патогенезата на ревматоидния артрит. Knijff-Dutmer и сътр. (2002) първи описват увеличен брой тромбоцитни микрочастици (PMPs) в кръвта на пациенти с тежък RA и корелация между броя на PMPs и DAS28.

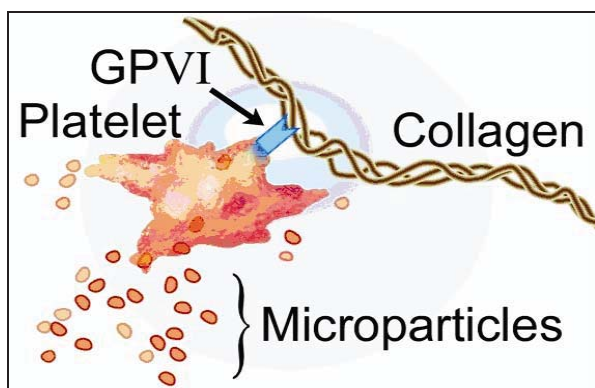
Boilard и Coworkers (2010) разкриват нова роля на тромбоцитите в патогенезата на RA, като демонстрират, че PMPs могат да усилват възпалението при RA. (Microparticles and their roles in inflammatory arthritides *Nature Reviews. – Rheumatology*, 6, 2010, 385).

Авторите доказват, че тромбоцитни частици, получени от активирани тромбоцити, се установяват в синовиалната течност при RA, но не и при OA (*Science*, 327, 2010, № 5965, 580-583).

Тромбоцитните MPs са интактни везикули (0.2 до 1 μm в диаметър), които се формират чрез пъпкуване от мембраните на активирани тромбоцити

Boilard и сътр. откриват средно близо $2 \times 10^5 / \mu\text{L}$ CD41+ MPs в синовиалната течност при ревматоиден артрит. За разлика от синовиалната течност при ревматоиден артрит, където MPs се установяват във всички проби, CD41+ MPs не се установяват в пробите от синовиална течност при остеоартрит.

Glycoprotein VI е ключов за локалното активиране и формирането на тромбоцитни микрочастици. Активирането на тромбоцитите се осъществява чрез стимулация на колагеновия рецептор GPVI, което води до генериране на MPs – играе важна роля в патогенезата на артритата. Тромбоцити, експресиращи GPVI, се активират от колаген и освобождават голямо количество богати на IL-1 микрочастици (MPs), които преминават в синовиалната и синовиалната течност.



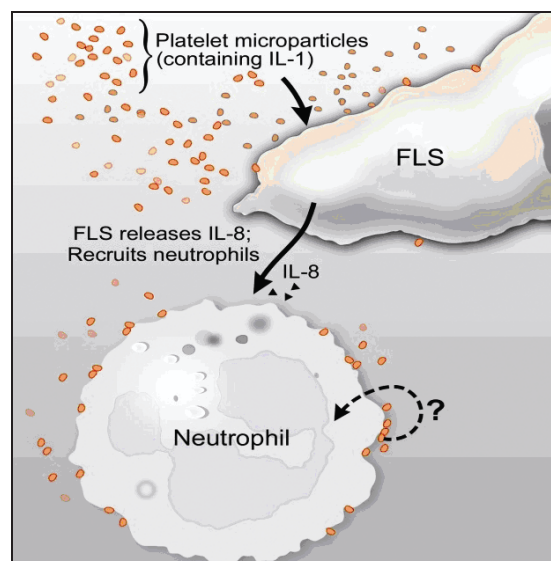
Фиг. 5

Точната анатомична локализация на активацията и пътят, по който микрочастиците навлизат в ставата, все още не са изяснени.

Тромбоцитните микрочастици имат проинфламаторно действие и усилват синовиата. Тромбоцитните микрочастици оказват проинфламаторно действие, като предизвикват цитокинови отговори от синовиалните фибробласти чрез IL1. Тромбоцитите притежават мембранно-свързана IL-1 активност за 2-те форми на този цитокин, като IL-1 α е доминиращата. Аналогично, тромбоцитните MPs експресират едновременно IL-1 α и IL-1 β (19.1 versus 0.1 pg/mg protein) и тригерират освобождаване на IL-8 от синовиалните фибробласти при RA по дозозависим начин, даже в по-голяма степен, отколкото IL-1 β или TNF. И двете форми на IL-1 участват от стимулацията на FLS, тъй като неутрализирането на IL-1 активността на PMPs изисква блокиращи антитела едновременно срещу IL-1 α и IL-1 β .

Тромбоцитните MPs допринасят за ставното възпаление чрез механизми, включващи мощна IL-1-медирана активация на синовиалните фибробласти.

Тромбоцитните микрочастици взаимодействат с тъканни клетки, включително синовиални фибробласти и левкоцити в синовиалната течност. Това предизвиква по-нататъшни възпалителни ефекти от страна на таргетните клетки и по такъв начин усилва синовиата. По отношение на синовиалните фибробласти PMPs стимулират продукцията на IL-8 и други медиатори, които са левкоцитни хемоатрактанти в ставата. PMPs, прикрепени към неутрофили, също се установяват във възпалената синовиална течност и е възможно също да стимулират ефекторни функции на неутрофилите, което остава да бъде потвърдено.



Фиг. 6

ЗНАЧЕНИЕ НА ТРОМБОЦИТНИТЕ МИКРОЧАСТИЦИ ПРИ РА

Тромбоцитите изпълняват усилваща роля в патофизиологията на възпалителния артрит, освобождавайки **проинфламаторни микрочастици, които са най-многобройният клетъчен елемент в синовиалната течност.** Мембранно-свързаният с MPs IL-1 е необичайно трудно да бъде антагонизиран, което може да обясни ограничението ефект от блокадата на IL-1 при RA. Преобладаването на IL-1 α при MPs носи потенциални ограничения в ефикасността на IL-1 β -специфичните агенти.

Тромбоцитна активност и SLE. Според проучване на изследователи от University of Bordeaux, France, тромбоцити, активирани от автоантигени, участват в патологията на SLE, като усилват възпалителния отговор. Активирани тромбоцити образуват агрегати с циркулиращи антиген-представящи клетки – включително моноцити и плазмоцитонидни дендритни клетки (pDCs); които са главен източник за type I IFN при SLE. Засилената активация на тромбоцитите тригерира повишаване на нивата на протеин CD154, който стимулира продукцията на интерферони и причинява възпаление при човешки и миши клетки. Изследователите показват също, че приложението на лекарство, което инхибира тромбоцитната активация, може да бъде полезен подход при SLE. В експериментален модел изследователите демонстрират, че разрушаването на тромбоцитите чрез инжектиране на антитяло или инхибирането на тромбоцитната активация с Clopidogrel може да намали възпалението в бъбреците и симптомите на болестта.

Тази резултати показват, че антиромбоцитна терапия може да спомогне за предотвратяване на активирането на SLE при хора.

Нови изследвания правят връзка между тромбоцитната активация, имунните комплекси (ICs) и интерферон- α (IFN- α) в патогенезата на SLE и могат да предоставят подкрепа за приложението на антиромбоцитни стратегии като добавена терапия, особено при лупусен нефрит. В допълнение, дългосрочната антиромбоцитна терапия може да повлияе не само върху имунните аспекти на патогенезата, но също и на сърдечно-съдовите проблеми, свързани с болестта.

БЪДЕЩИ ТЕРАПЕВТИЧНИ ПОДХОДИ ЗА ПОВЛИЯВАНЕ НА ТРОМБОЦИТНАТА ФУНКЦИЯ ПРИ РЕВМАТИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

1. Комбинирана антиагрегантна терапия – ниска доза аспирин и Clopidogrel или Dipyridamole
2. Перорални фактор – Ха инхибитори – Rivaroxaban (Xarelto), Apixaban, Endoxaban
3. Директни инхибитори на тромбина – Dabigatran (Pradaxa)
4. Статини – Fluvastatin, Rosuvastatin – *предотвратяват повишената адхезия на ендотелните клетки, предизвикана от anti- β 2-glycoprotein*
5. Hydroxychloroquine – *директно инхибира свързването на комплексите антифосфолипидни антитела- β 2-glycoprotein-1 към фосфолипидните повърхности*
6. Намаляване на В-клетките – Rituximab

Изводи

Микрочастиците предоставят връзка между възпалението, коагулацията и ангиогенезата, които са ключови процеси както при системните, така и при органоспецифичните прояви на ревматичните заболявания.

Микрочастиците все повече се налагат като важни медиатори на междуклетъчната сигнализация при ревматичните заболявания. Тъй като те могат да бъдат измерени количествено в кръвта, микрочастиците са нови биомаркери и оценката им може да подобри диагнозата и определянето на болестната активност. Възниква неотложна необходимост от стандартизация на техниките за изолиране и количествено им определяне.

Селективна прицелна терапия чрез блокиране на освобождаването на микрочастиците или чрез модифициране на тяхната активност би могла да предложи по-благоприятни ефекти и да постави началото на нов път за лечение на ревматичните заболявания.

Библиография

1. Ahmad, Z. et al. The role of platelet rich plasma in musculoskeletal science. – JAMA, **304**, 2010, № 3, 17.
2. Beyer, C. et D. S. Pisetsky. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases Nat. Rev. Rheumatol. doi:10.1038/nrrheum.2009.229 – Nature reviews, Rheumatol., **6**, 2010, 21.
3. Boilard, E. et al. Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via Collagen-Dependent Microparticle Production. – Science, **327**, 2010, 580.
4. Chinami, O. et al. Plasma Platelet-derived Microparticles in Patients with Connective Tissue Diseases. – The J. Rheumatol., **38**, 2011, 4.
5. Distler, J. H. W. et al. Microparticles as Regulators of Inflammation Novel Players of Cellular Crosstalk in the Rheumatic Diseases. – Arthritis & Rheumatism, **52**, 2005, № 11, 3337-3348.
6. Distler, J. H. W. et al. Microparticles and their roles in inflammatory arthritis. – Nature reviews, Rheumatol., **6**, 2010, 385.
7. Kisacik, B., A. Tufan, U. Kalyoncu, O. Karadag, A. Akdogan– Elsevier. Mean platelet volume (MPV) as an inflammatory marker in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. – Joint Bone Spine, 2008, Platelet Function in Rheumatoid Arthritis: 2007, 6.
8. Knijff-Dutmer, E. A. J. et al. Platelet function is inhibited by non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs but not by cyclo-oxygenase-2-selective inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. – The Netherlands. Rheumatol., **42**, 2002, 458-461.
9. Martz, L. et W. Staff. Targeting platelets in RA. – SciBX, **3**, 8; doi:10.1038/scibx.2010.236. Feb. 25 2010.

Постъпил за печат на 30 октомври 2012 г.

✉ Адрес за кореспонденция:

Доц. д-р Венета Пейчева
Клиника по ревматология
УМБАЛ "Св. Иван Рилски"
ул. „Урвич“ № 13
1612 София

✉ Address for correspondence:

Assoc. prof. Veneta Peicheva, M.D.
Clinic of Rheumatology
University Hospital "Sv. Iv. Rilski"
13, Urvich Str.
Bg – 1612 Sofia