

УДК: 616.613-003.7-089.879-06:616.155.2-021.5

## Е.Ф. Барінов, А. М. Кравченко ПРОЯВИ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ РЕАКТИВНОСТІ ТРОМБОЦИТІВ ПІСЛЯ ЛІТОТРИПСІЇ

Донецький національний медичний університет ім. М. Горького

**Барінов Е.Ф., Кравченко А.М.** Прояви індивідуальної реактивності тромбоцитів після літотрипсиї // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 2. – С. 3-6.

**Мета дослідження** - встановити можливі варіанти взаємодії Адреналіну і АДФ в модуляції функції тромбоцитів після літотрипсиї (ЛТ), що дозволяє конкретизувати індивідуальні особливості тромбогенеза. У дослідження включено 70 пацієнтів з хронічним обструктивним піелонефритом (ХОПН), що надійшли для проведення ЛТ. Кавітаційну контактну-фрезову ультразвукову літотрипсию виконували за допомогою апарату Karl Storz - Calcuson. Тромбоцити (Тц) виділяли шляхом центрифугування периферичної крові, отриманої за 24 год до і через 24 год після ЛТ. Для аналізу реактивності Тц використовували агоністи в ефективній концентрації, що відповідає 50 % агрегації Тц (ЕС50): АДФ (5 мкМ) і Адреналін (5 мкМ). Оцінку агрегації тромбоцитів проводили спектрофотометрично на аналізаторі агрегації тромбоцитів фірми ChronoLog (USA). У рамках даної статті проведено дослідження фенотипу гіпоадренореактивних Тц - реакція тромбоцитів на Адреналін була менше 45%. При проведенні аналізу використовувався статистичний пакет MedStat. Виявлено 7 типів реакції гіпоадренореактивних Тц на Адреналін і АДФ після ЛТ: (1) реакція тромбоцитів на Адреналін не змінюється, реакція на АДФ збільшується; (2) реакція тромбоцитів на Адреналін підвищується, реакція на АДФ знижується; (3) реакція тромбоцитів на Адреналін і АДФ відсутня; (4) реакція тромбоцитів на Адреналін і АДФ підвищується; (5) реакція тромбоцитів на Адреналін підвищується, реакція на АДФ відсутня; (6) реакція тромбоцитів на Адреналін знижується, реакція на АДФ підвищується; (7) реакція тромбоцитів на Адреналін і АДФ знижується. Виявлення повторюваних поєднань сигналів агоністів діючих на Тц у різних пацієнтів з ХОПН дозволить встановити можливі паттерни регуляції тромбоцитів, а значить - наблизитися до індивідуальної фармакологічної корекції гемостазу.

**Ключові слова:** індивідуальна реактивність, агрегація тромбоцитів, літотрипсиї.

**Барінов Э.Ф., Кравченко А.Н.** Проявления индивидуальной реактивности тромбоцитов после литотрипсии // Украинский морфологический альманах. – 2014. – Том 12, № 2. – С. 3-6.

**Цель исследования** - установить возможные варианты взаимодействия Адреналина и АДФ в модуляции функции тромбоцитов после литотрипсии (ЛТ), что позволяет конкретизировать индивидуальные особенности тромбогенеза. В исследование включено 70 пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом (ХОПН), которые поступили для проведения ЛТ. Кавитационную контактно-фрезовую ультразвуковую литотрипсию производили с помощью аппарата Karl Storz - Calcuson. Тромбоциты (Тц) выделяли путем центрифугирования из цитратной периферической крови, полученной за 24 ч до и через 24 ч после ЛТ. Для анализа реактивности тромбоцитов использовали агонисты в эффективной концентрации, соответствующей 50% агрегации Тц (ЕС50): АДФ (5 мкМ) и Адреналин (5 мкМ). Оценку агрегации тромбоцитов проводили спектрофотометрически на анализаторе агрегации тромбоцитов фирмы ChronoLog (USA). В рамках данной статьи проведено исследование фенотипа гипoadренореактивных тромбоцитов – реакция тромбоцитов на Адреналин - менее 45%. При проведении анализа использовался статистический пакет MedStat. Выявлено 7 типов реакции гипoadренореактивных тромбоцитов на Адреналин и АДФ через 24ч после ЛТ: (1) реакция тромбоцитов на Адреналин не изменяется, реакция на АДФ увеличивается; (2) реакция тромбоцитов на Адреналин повышается, реакция на АДФ снижается; (3) реакция тромбоцитов на Адреналин и АДФ отсутствует; (4) реакция тромбоцитов на Адреналин и АДФ повышается; (5) реакция тромбоцитов на Адреналин повышается, реакция на АДФ отсутствует; (6) реакция тромбоцитов на Адреналин снижается, реакция на АДФ повышается; (7) реакция тромбоцитов на Адреналин и АДФ снижается. Выявление повторяющихся сочетаний сигналов у разных пациентов с ХОПН позволит установить возможные паттерны регуляции тромбоцитов, а значит – приблизиться к индивидуальной фармакологической коррекции гемостаза.

**Ключевые слова:** индивидуальная реактивность, агрегация тромбоцитов, литотрипсиї.

**Barinov E.F., Kravchenko A.N.** Features of individual platelets reactivity after lithotripsy // Украинский морфологический альманах. – 2014. – Том 12, № 2. – С. 3-6.

**Aim of the study:** to identify possible options of Epinephrine and ADP interaction in platelet function modulation after lithotripsy (LT) which enables to specify individual platelets features. The study included 70 patients with chronic obstructive pyelonephritis (CHOPN) were admitted for LT. Contact cavitation ultrasonic lithotripsy was conducted using Karl Storz-Calcuson. Platelets (PLT) were separated by centrifugation from citrated peripheral blood obtained 24 hours before and 24 hours after LT. For analysis of platelets reactivity we used agonists in effective concentrations corresponding to 50 % of platelets aggregation (ЕС50) of ADP (5 μM) and Adrenaline (5 μM). Assessment of platelet aggregation was carried out spectrophotometrically on platelet aggregation analyzer ChronoLog (USA). Within this article study of hypoadrenreactive platelets phenotype was carried out - platelet response to adrenaline was less than 45%. In this analysis we used

statistical package MedStat. Seven types of hypoadrenreactive platelets response to Adrenaline and ADP were revealed 24 hours after LT: (1) response to Adrenaline is unchanged, response to ADP is increased; (2) response to Adrenaline is increased, response to ADP is decreased; (3) no response to Adrenaline and ADP; (4) response to Adrenaline and AD is increased; (5) response to Adrenaline is increased, no response to ADP; (6) response to Adrenaline is decreased, response to ADP is increased; (7) response to Adrenaline and AD is decreased. Analysis of isolated effect of Adrenaline and ADP in the regulation of hypoadrenreactive platelets function after LP shows that response to Adrenaline is unchanged or even is decreased if response to ADP is increased. In fact, this may reflect the recovery efficiency of autocrine mechanism of platelet aggregation regulation. Increased hyporeactive platelet response to Adrenaline occurs with reduced or changed ADP-induced ATP. This situation can be interpreted as a tendency to restore the humoral control of hemostasis in low efficiency of autocrine mechanism of PLT regulation. Restoration of platelet response to Adrenaline to standard EC50 values occurs when the effect of ADP is EC50 reflecting recovery efficiency and autocrine mechanisms of humoral regulation of platelet aggregation. Platelet response to Adrenaline and ADP is unchanged or response to both agonists is further decreased (i.e. reaction dynamics of platelet response to Adrenaline repeats response to ADP) suggesting preservation of violations of humoral and autocrine mechanisms of platelet function regulation. Identifying of duplicate combinations of signals in different patients with COPN allows to identify possible patterns of PLT regulation, and therefore, and to approach the individual pharmacological correction of hemostasis.

**Key words:** individual reactivity, platelets, lithotripsy.

У процесі адаптаційної реакції клітин крові на «обурюючий» вплив, до якого може бути віднесено оперативне втручання, функція клітин змінюється з метою переходу на новий оптимальний рівень, що дозволяє підтримувати гомеостаз. Стосовно тромбоцитів (Тц) адаптаційна реакція спрямована на тромбогенез, що обмежує післяопераційну крововтрату. Літотрипсія (ЛТ) вважається ефективним і безпечним методом видалення конкрементів нирки і сечоводу, тим не менш, за даними різних авторів частота ускладнень супроводжуючих ЛТ, варіює в межах від 4,2% до 24,2% [1,2]. Кровотеча є серйозною проблемою під час черезшкірної нефролітомії, хоча зустрічається досить рідко - порядку 0,50% при наявності конкременту в нирці і 0,14% - у разі каменю сечоводу [3]. У тіні залишається інша менш обговорювана проблема - післяопераційна гематурія, яка постійно виникає при втручанні на нирці і сечоводі. Даний вид крововтрати, традиційно, не розглядається як критичне ускладнення ЛТ, що вимагало б розробки спеціальних методів діагностики та профілактики. Хоча, ступінь гематурії, її тривалість, а також формування згустків крові в просвіті сечовивідних шляхів може зажадати не тільки проведення інфузійної терапії, але і стентування сечоводу з усіма витікаючими наслідками. У цьому контексті інтерес дослідників до функціонального стану Тц після ЛТ та управління тромбогенезом стає зрозумілим.

Очевидно, що в процесі регуляції функції Тц можуть діяти цілком певні поєднання агоністів, проте, взаємодія Адреналіну і АДФ представляє особливий інтерес. Це пов'язано з тим, що у фізіологічних умовах Адреналін вважається слабким гуморальним регулятором Тц, але ставлення до нього має бути переглянуто у всіх випадках розвитку стрес-реакції, оскільки його концентрація значно і динамічно змінюється. Хронічний обструктивний піелонефрит (ХОПН) і ЛТ, як відомо, індукують симпатoadrenalову систему [4], що, ймовірно, змінює активність Тц. Що стосується АДФ, то це ауто- і паракринний фактор активації клітин крові.

Взаємодія цієї пари агоністів традиційно розглядається як причина потенціювання функціональної активності Тц [5]. Суть такого методичного підходу в тому, що ефекти Адреналіну і АДФ реалізуються через один і той же сигнальний шлях Gi - Akt, хоча при цьому активуються різні рецептори - відповідно  $\alpha 2$  - адренорецептор і пуриновий рецептор - P2Y<sub>12</sub>. У цьому випадку дійсно можна очікувати сумарно ефектів, кінцевою метою якої є посилення тромбогенеза. Зіставлення динаміки ізольованих ефектів Адреналіну і АДФ дозволяє підійти до розуміння взаємодії цієї пари агоністів в модуляції проагрегантного статусу тромбоцитів, що важливо для прогнозування гематурії після ЛТ.

**Мета дослідження** - встановити можливі варіанти взаємодії Адреналіну і АДФ в модуляції функції тромбоцитів після літотрипсії, що дозволяє конкретизувати індивідуальні особливості тромбогенеза.

**Матеріал і методи досліджень.** У дослідженні включено 70 пацієнтів з хронічним обструктивним піелонефритом, що надійшли в урологічне відділення для проведення ЛТ. Кавітаційну контактну-фрезову ультразвукову ЛТ виконували за допомогою апарату Karl Storz - Calucson. Всі пацієнти до- і після ЛТ отримували анальгетики, антибактеріальну і протизапальну терапію. Тромбоцити виділяли шляхом центрифугування з периферичної крові, отриманої за 24 год до- і через 24 год після ЛТ. У даному дослідженні аналізували вплив: (а) АДФ - аутокринного фактора, який накопичується в цільних гранулах тромбоцитів і забезпечує активацію Тц за принципом inside - out; (б) Адреналіну - системного фактора, рівень якого зростає в умовах ХОПН внаслідок активації симпатoadrenalової системи (за фізіологічних умов - слабкий стимулятор агрегації Тц). Для аналізу реактивності Тц використовували агоністи в ефективній концентрації, що відповідає 50% агрегації Тц (EC<sub>50</sub>): АДФ (5 мкМ) і Адреналін (5 мкМ). Оцінку агрегації тромбоцитів (АТц) проводили спектрофотометрично на аналізаторі фірми ChronoLog (USA). У рамках даної статті

проведено дослідження фенотипу гіпоадренореактивних Тц, для яких була характерною реакція тромбоцитів на Адреналін – менше 45%. При проведенні аналізу використовувався статистичний пакет MedStat .

**Результати та обговорення.** Нами виявлено 7 типів реакції гіпоадренореактивних тромбоцитів на Адреналін і АДФ у 24 пацієнтів через 24г після ЛТ у пацієнтів з ХОПН (табл.).

1. *Реакція тромбоцитів на Адреналін не змінюється, реакція на АДФ збільшується.*

Найбільш часто - у 6-ти (25%) пацієнтів зустрічався тип реакції гіпоадренореактивних тромбоцитів, коли АДФ відтворював підвищену АТц, а Адреналін не чинив істотного впливу на АТц. При цьому АДФ в стандартній дозі ЕС<sub>50</sub> статистично значимо підвищував АТц на 36,1% (р = 0,001) порівняно з її величиною до ЛТ.

2. *Реакція тромбоцитів на Адреналін підвищується, реакція на АДФ знижується.*

У 5-ти (20,8%) випадках реакція тромбоцитів на АДФ після ЛТ знижувалася (на 56 %; р = 0,008), а на Адреналін підвищувалася (в 3,1 рази; р = 0,008) щодо значень АТц до ЛТ.

3. *Реакція тромбоцитів на Адреналін і АДФ не змінюється.*

У 4-х випадках (16,7%) не виявлено статис-

тично значущих відмінностей ефектів Адреналіну і АДФ на тромбоцити після ЛТ щодо відповідних значень до ЛТ.

4. *Реакція тромбоцитів на Адреналін і АДФ підвищується*

У 3-х випадках (12,5 %) мало місце збільшення відповіді тромбоцитів як на Адреналін (на 144,9%; р < 0,05 ), так і на АДФ (на 108,7%; р = 0,023) порівняно зі значеннями агрегації тромбоцитів до ЛТ.

5. *Реакція тромбоцитів на Адреналін підвищується, реакція на АДФ не змінюється.*

Ще в 3-х випадках (12,5%) реакція Тц на АДФ не змінилася, тоді як на Адреналін підвищилася (на 40,2%; р = 0,098) щодо значень агрегації викликаних даними агоністами до ЛТ.

6. *Реакція тромбоцитів на Адреналін знижується, реакція на АДФ підвищується.*

У 2 -х випадках (8,3%) реакція Тц на АДФ підвищилася (на 52,3%), а на Адреналін – знизилася (на 50,9%).

7. *Реакція тромбоцитів на Адреналін і АДФ знижується*

У 1-му випадку (4,2%) реакція тромбоцитів на АДФ і Адреналін знижувалася щодо відповідних значень до ЛТ.

**Таблиця.** Варіанти ефектів Адреналіну (ЕС<sub>50</sub>) і АДФ (ЕС<sub>50</sub>) на агрегацію гіпоадренореактивних тромбоцитів після літотрипсії

| Виявлений ефект                                 | Етап дослідження | Агоніст   | Агрегація тромбоцитів, % | р- стосовно рівня до ЛТ |
|---|------------------|-----------|--------------------------|-------------------------|
| ↑АДФ<br>Реакція на Адреналін не змінилася (n=6) | До ЛТ            | АДФ       | 35,7±1,25                | р=0,001                 |
|   | Після ЛТ         |           | 48,6± 1,31               |                         |
| ↓АДФ  | До ЛТ            | Адреналін | 19,4± 4,59               | р=0,845                 |
|   | Після ЛТ         |           | 18,0± 4,98               |                         |
| ↑Адреналін (n=5)                                | До ЛТ            | АДФ       | 35,0± 3,83               | р=0,008                 |
|   | Після ЛТ         |           | 19,6± 2,01               |                         |
| Реакція на АДФ не змінилася                     | До ЛТ            | Адреналін | 9,8±1,88                 | р=0,035                 |
|   | Після ЛТ         |           | 30,4±6,14                |                         |
| Реакція на Адреналін не змінилася (n=4)         | До ЛТ            | АДФ       | 40,02± 2,63              | р=0,270                 |
|   | Після ЛТ         |           | 38,3± 3,44               |                         |
| ↑АДФ  | До ЛТ            | Адреналін | 25,9± 8,02               | р=0,154                 |
|   | Після ЛТ         |           | 23,2± 8,46               |                         |
| ↑Адреналін (n=3)                                | До ЛТ            | АДФ       | 26,3± 4,12               | р=0,023                 |
|   | Після ЛТ         |           | 54,9± 3,21               |                         |
| Реакція на АДФ не змінилася                     | До ЛТ            | Адреналін | 19,6±7,41                | р<0,05                  |
|   | Після ЛТ         |           | 48,0± 6,10               |                         |
| ↑Адреналін(n=3)                                 | До ЛТ            | АДФ       | 44,1± 8,40               | р=1,000                 |
|   | Після ЛТ         |           | 45,0± 7,96               |                         |
| ↑АДФ  | До ЛТ            | Адреналін | 26,6± 9,07               | р=0,098                 |
|   | Після ЛТ         |           | 37,3± 9,13               |                         |
| ↓Адреналін (n=2)                                | До ЛТ            | АДФ       | 32,5± 10,65              |                         |
|   | Після ЛТ         |           | 49,5± 15,67              |                         |
| ↓АДФ  | До ЛТ            | Адреналін | 28,5±11,91               |                         |
|   | Після ЛТ         |           | 14,0± 5,03               |                         |
| ↓Адреналін (n=1)                                | До ЛТ            | АДФ       | 28,0                     |                         |
|   | Після ЛТ         |           | 6,0                      |                         |
|   | До ЛТ            | Адреналін | 15,0                     |                         |
|   | Після ЛТ         |           | 5,0                      |                         |

**Примітка:** ↑-реакція на агоніст підвищилась; ↓-реакція на агоніст зменшилась.

У процесі адаптаційної реакції клітин крові, Тц повинні переходити з одного стаціонарного

стану (нормо- або гіпореактивності), в інше - з більш високим проагрегантним потенціалом.

Якщо судити з реакції Тц на один агоніст (Адреналін або АДФ), або навіть зіставити ефекти двох агоністів, то складається враження «парадоксальності» зареєстрованих відповідей. Інакше як можна пояснити відсутність змін або навіть зниження функціональної активності Тц після ЛТ. Можна звичайно зв'язати отриманий результат з відстроченим терміном спостереження (все-таки 24 год після операції), але і в цьому випадку необхідно шукати пояснення різної реакції тромбоцитів (підвищується, знижується або відсутня). Пояснення «парадоксальності поведінки» тромбоцитів можна знайти в існуванні різних варіантів поєднання (взаємодії) двох і більше сигналів. Ймовірно, поєднання сигналів агоністів, кожен з яких може викликати підвищення/зниження реакції Тц, або не чинити значущого впливу – відображає індивідуальну реактивність організму. Чи означає це, що індивідуальна реактивність тромбоцитів є унікальною і аналогічні механізми її реалізації на тромбоцитах не відтворюються у іншому організмі?

Якщо відштовхуватися від необхідності підтримки балансу проагрегантної й антиагрегантної активності тромбоцитів після виконання ЛТ, то очевидно, що якісна і кількісна характеристика АТц буде залежати, насамперед, від сили сигналів (концентрації агоністів) і чутливості відповідних рецепторів. При цьому слабкі сигнали можуть посилювати (потенціювати) ефекти один одного, у разі необхідності підвищення протромбогенного потенціалу Тц, або - послаблювати сильний/домінуючий сигнал одного з агоністів (не тільки шляхом зниження чутливості відповідного рецептора, а й повної десенситизації рецептора другого агоніста), якщо виникає необхідність обмеження гіперреактивності Тц. У цьому випадку, індивідуальна реакція може бути унікальною по спектру агоністів (яких більше 10), кожен з яких має свої можливості/параметри управління, однак оптимальна функція тромбоцитів може досягатися тільки цілком певним поєднанням сигналів.

**Висновки:** Аналіз ізольованих ефектів Адреналіну і АДФ в регуляції функції гіпоадренореактивних тромбоцитів після літотрипсії, свідчить, що:

1. Реакція на Адреналін не змінюється, або навіть знижується, якщо реакція на АДФ підвищується. По суті, це може означати відновлення ефективності аутокринного механізму регуляції АТц.

2. Підвищення відповіді гіпореактивних Тц на Адреналін має місце, коли знижується або не змінюється АДФ-індукована АТц. Така ситуація може трактуватися як тенденція до відновлення гуморального контролю за гемостазом в умовах низької ефективності аутокринного механізму регуляції тромбоцитів.

3. Відновлення відповіді Тц на Адреналін до стандартних значень ЕС<sub>50</sub> відбувається в тих випадках, коли АДФ відтворює ефект на рівні ЕС<sub>50</sub>, що відображає відновлення ефективності

аутокринного і гуморального механізмів регуляції АТц.

4. Реакція Тц на Адреналін і АДФ не змінюється, або відповідь на обидва агоніста ще більше знижується (тобто динаміка реакції тромбоцитів на Адреналін повторює реакцію на АДФ), що свідчить про збереження порушень гуморального і аутокринного механізмів регуляції функції Тц

**Перспективи подальших розробок за даним напрямком.** Виявлення повторюваних поєднань сигналів у різних пацієнтів дозволить встановити можливі паттерни регуляції тромбоцитів, а значить - наблизитися до індивідуальної фармакологічної корекції гемостазу після ЛТ.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Factors affecting blood loss during percutaneous nephrolithotomy using balloon dilation in a large contemporary series / J. J. Tomaszewski, M. C. Smaldone, T. Schuster [et al.] // J Endourol — 2010. — Vol. 24(2) — P. 207-211.
2. Safety of ESWL in elderly: evaluation of independent predictors and comorbidity on stone-free rate and complications / F. Polat, S. Yeşil, E. Ak [et al.] // Geriatr Gerontol Int. — 2012. — Vol. 12(3) — P. 413 - 417.
3. Renal haemorrhage risk after extracorporeal shockwave lithotripsy: results from the Japanese Diagnosis Procedure Combination Database / T. Sugihara, H. Yasunaga, H. Horiguchi [et al.] // BJU Int. — 2012. — Vol. 8 Pt B. — P. 308-332.
4. Renal nerves mediate changes in contralateral renal blood flow after extracorporeal shockwave lithotripsy / Connors BA, Evan AP, Willis LR, [et al.] // Nephron Physiol. — 2003. — Vol. 95(4) — P. 67-75.
5. Epinephrine-mediated protein kinase C and Rap1b activation requires the co-stimulation of G<sub>z</sub>-, G<sub>q</sub>-, and G<sub>i</sub>-coupled receptors / Lova P, Guidetti GF, Canobbio I, [et al.] // Thromb Haemost. — 2011. — Vol. 105(3). — P. 479-486.

Надійшла 11.03.2014 р.

Рецензент: проф. С.А. Кащенко