

© Э.Ф. Баринов, О.Н. Сулаева, М.А. Киреева

УДК 616.127-005.8-085+616.155.1

Э.Ф. Баринов, О.Н. Сулаева, М.А. Киреева

ДИНАМИКА АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА НА ФОНЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького (г. Донецк)

Работа является фрагментом НИР МОЗ Украины «Міжтканинні та міжклітинні кооперації в реалізації репаративної регенерації органів: залежність від реактивності організму» (№ 0109U008714 шифр МК 01.10)

Вступление. «Золотым стандартом» терапии острого инфаркта миокарда (ОИМ) считается комплексное лечение с применением тиенопиридинов и аспирина, мишенью которых являются тромбоциты [1, 2]. Тиенопиридины, являясь селективными блокаторами P2Y₁₂ пуриновых рецепторов, ограничивают агрегацию тромбоцитов на АДФ поступающий из гранул, тогда как аспирин необратимо ингибирует ЦОГ и, тем самым, ограничивает продукцию в тромбоцитах такого мощного проагреганта как тромбоксан А₂ (ТХА₂) [4, 6] Совместное действие данных препаратов не только ингибируют агрегацию тромбоцитов и стабилизацию тромбогенеза, обусловленную активацией рецептора $\alpha_{IIb}\beta_3$, но и обеспечивает противовоспалительный эффект [5]. Последний феномен связывают со снижением экспозиции на плазмолемме тромбоцитов Р-селектина и других адгезивных молекул, вовлеченных в образование тромбоцит – лейкоцитарных агрегатов [7]. В то же время, в литературе имеется мало данных о специфике реакции тромбоцитов при ОИМ на сосудисто-тканевые и коагуляционные факторы, включая фактор фон Виллебранда, коллаген и тромбин. Еще меньше известно об изменении ответа тромбоцитов на системные стрессовые регуляторы, появляющиеся при развитии ОИМ, которые способны модулировать агрегационный ответ тромбоцитов индуцируемый локальными агонистами, прежде всего пуринами.

В этом контексте особый интерес представляет анализ реактивности тромбоцитов к системным и сосудисто-тканевым факторам на фоне патогенетической коррекции тромбогенеза у пациентов с ОИМ, что и определило **цель данного исследования.**

Объект и методы исследования. Тромбоциты выделяли из периферической крови 48 пациентов с острым инфарктом миокарда, подтвержденных данными ЭКГ (с элевацией ST-сегмента), а также коронароангиографии, верифицирующей локализацию окклюзии ветви коронарной артерии. Больные получали стандартную терапию с использованием комплекса тиенопиридинов и аспирина [1]. Кровь собирали в пластиковые пробирки, содержащие кислый цитратдекстрозный антикоагулянт; выделение тромбоцитов проводили методом центрифугирования. Для оценки агрегационной способности использовали суспензию тромбоцитов (200±50 тыс/

мкл). В качестве индукторов агрегации тромбоцитов (АТр) применяли: АДФ в дозе 5 мкМ, АТФ - 100 мкМ, коллаген (1 мкМ), адреналин (2,5 мкМ), серотонин (5-НТ), ангиотензин II (1 мкМ), тромбин («Технология стандарт»). Пробы инкубировали 8-9 мин, в течение которых регистрировали агрегационный ответ тромбоцитов на анализаторе агрегации тромбоцитов AP2110. Оценивали степень и скорость АТр, характер кривой, время выхода на плато, время и степень дезагрегации. Контрольную группу составили 30 практически здоровых людей аналогичного возраста. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета MedStat [3].

Результаты исследований и их обсуждение.

Анализ АТр в контрольной группе выявил, что эффект АДФ (5мкМ) составлял 52,1±2,2 % с пиком агрегационного ответа через 5,6±1,2 мин и дезагрегацией в течение 9,2±0,3 мин. Реакция тромбоцитов здоровых людей на АТФ была менее выраженной и составляла 25,7±3,2 %. Наиболее сильной и быстрой оказалась реакция тромбоцитов на коллаген (92±7,2 %; ДИ 85-98 %) и тромбин (95±3,4 %; ДИ 90-100 %). Реакция тромбоцитов на адреналин широко варьировала при использовании эффективной концентрации (ЕС50). Ответ на ангиотензин II составлял 48±1,2 % (ДИ 46-52 %), а 5-НТ вызывал АТр 43,2±5,4 % (ДИ 40-50 %).

У пациентов с ОИМ на момент госпитализации (до назначения стандартной терапии) имело место повышение ответа тромбоцитов на большинство агонистов. Так, инкубация даже с низкой дозой АДФ (2,5 мкМ) сопровождалась необратимой АТр – 89±8,9% (ДИ 70-100 %). При добавлении к суспензии тромбоцитов ангиотензина II и 5-НТ отмечался статистически значимый подъем АТр до 72±6,7 % (ДИ 67-81 %) и 68±5,9 % (ДИ 62-74 %) соответственно. Еще более выраженным оказался ответ на адреналин, достигающий 88±3,5% (ДИ 83-92 %). Интересно, что при этом ответ на АТФ, коллаген и тромбин статистически значимо не отличались от контроля. Мощное усиление эффектов АДФ и адреналина, реализующих свое влияние на тромбоциты через Gi-белок, ингибирующий активность системы аденилатциклаза-цАМФ-протеинкиназа А [6], по сути, отражает выключение системы негативного контроля тромбогенеза у пациентов с ОИМ. Это предположение подтверждалось также корреляционной связью между АТр, индуцированной АДФ и адреналином ($r=0,715$; $p<0,001$).

Через 1 сутки после начала лечения пациентов с ОИМ отмечалось выраженное снижение АТр. В первую очередь это касалось ограничения эффектов

АДФ, ответ на который снизился до $6 \pm 5,2\%$ (ДИ 2-10 %). Характерно, что блокада $P2Y_{12}$ пуриновых рецепторов и ЦОГ сопровождалась выраженным снижением ответа на большинство системных факторов, включая адреналин ($10 \pm 5,7\%$ ДИ 4-23 %), ангиотензин II ($8,9 \pm 6,7\%$; ДИ 0-13 %) и серотонин ($5 \pm 2,7\%$, ДИ 1-12 %). При этом корреляционный анализ продемонстрировал наличие взаимосвязи между эффектами АДФ и адреналина ($r=0,533$; $p<0,01$). Ингибирование синтеза TXA_2 и снижение эффекта АДФ сопровождалось существенным уменьшением АТр, индуцированной коллагеном ($2 \pm 1,0\%$; ДИ 1-7%), что, во-первых, свидетельствует о модулирующей роли данных вторичных агонистов в реализации эффектов коллагена и, во-вторых, подтверждает эффективность используемой комбинации лекарственных препаратов. Необходимо подчеркнуть сохранение достаточно высокого агрегантного эффект тромбина - $65 \pm 10,9\%$ (ДИ 9-100 %), хотя данный показатель был достоверно ниже, чем в контрольной группе ($p<0,01$).

Интересно, что у 7 (14,58%) пациентов на фоне терапии отмечалось сохранение ответа на АДФ, и у этого контингента имела место гиперреакция тромбоцитов на адреналин (вероятно, за счет гиперчувствительности α_{2A} -адренорецепторов). Причем, у 4 из указанных выше пациентов, высокий ответ тромбоцитов на АДФ и адреналин сочетался с низким ответом на коллаген. Данный феномен может быть следствием применения аспирина, и отражать превалирование TXA_2 в амплификации эффекта коллагена. Как известно, имеется сопряженность TXA_2 и коллагена в отношении звена сигнальной системы SFK – Syk – фосфоинозитол-3киназа, активирующего фосфолипазу C [7]. Нельзя исключить, что у данных пациентов превалирует взаимосвязь коллаген-индуцируемой сигнальной системы с метаболитами арахидоновой кислоты у коллагена сильная составляющая синтез TXA_2 , что на фоне приема ингибитора ЦОГ обеспечивает мощное ограничение реакции тромбоцитов на коллаген при сохранении их ответа на АДФ. Кроме того, у всех пациентов в данный срок исследования был зафиксирован выраженный ответ на тромбин, что предполагает сохранение ассоциации тромбоцитарного и коагуляционного звеньев системы гемостаза на фоне стандартной терапии ОИМ.

Через 7 суток терапии у большинства пациентов сохранялся низкий агрегационный ответ тромбоцитов на большинство агонистов. Обращал на себя внимание факт снижения ответа тромбоцитов на тромбин до $45 \pm 10,6\%$ (ДИ 8-100 %). Сохранение ответа тромбоцитов на АДФ наблюдалось только у 3-х пациентов, причем АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов была сопряжена с повышенной реакцией тромбоцитов на адреналин. Данная ситуация, по сути, отражает дефект общего звена сигнализации для адреналина и АДФ – аденилатциклазы и цАМФ, которые традиционно относят к системе негативного контроля тромбогенеза [7].

Однако через 14 суток ситуация оказалась менее стабильной. Хотя АТр, индуцированная АДФ, составляла лишь $11,5 \pm 3,9\%$, регистрировалось возрастание реакции тромбоцитов на адреналин ($p<0,05$), ангиотензин II ($p<0,01$) и серотонин ($p<0,01$); максимальный эффект (близкий к 100%) воспроизводил тромбин. При этом изменялся характер взаимоотношений между эффектами агонистов, демонстрируя наличие выраженной связи между воздействием АДФ и адреналина ($r=0,523$; $p<0,01$), АДФ и серотонина ($r=0,756$ $p<0,001$). По сути, такая ситуация демонстрирует возможность и роль взаимодействий на уровне сигнальных систем, сопряженных с разными G-белками. Так, эффекты АДФ через $P2Y_{12}$ рецепторы, и адреналина - через α_{2A} рецепторы реализуются через Gi-белок и связанную с ним систему АЦ-цАМФ-ПКА [4, 6]. В то же время активация $P2Y_1$ рецепторов и 5-HT₂ рецепторов серотонина сопряжена с G_q-белками, запускающими каскад фосфолипазы C_β. Вероятно, изменение исходного состояния данных сигнальных систем может моделировать чувствительность рецепторов, сопряженных с ними, а это может вести к потенцированию эффектов синергичных агонистов [5].

У ранее отмеченных 7-и пациентов степень АТр при использовании перечисленных регуляторов была значимо выше, достигая $38,9 \pm 5,6\%$ (ДИ 32-47 %) при введении АДФ. Интересно, что при этом усиливалась связь между гиперадренореактивностью чувствительностью адренорецепторов и эффектом АТФ ($r=0,833$; $p<0,001$). Данный факт, учитывая значимость внеклеточного АТФ как маркера клеточного стресса (механического, осмотического, оксидативного), может отражать морфогенетические изменения в сердце/коронарных сосудах и требует более детального анализа в сопоставлении с клинико-лабораторными данными.

Выводы. Таким образом, ОИМ сопровождается значимым усилением агрегации тромбоцитов в ответ на системные и паракринные регуляторы, что сопровождается амплификацией тромбогенеза и обосновывает необходимость разработки критериев оценки эффективности и оптимизации терапии. Назначение тиенопиридинов совместно с аспирином при ОИМ ограничивает агрегационный ответ тромбоцитов на паракринные (АДФ, коллаген) и системные факторы (адреналин, серотонин, ангиотензин II), при сохранении реакции на тромбин, что может отражать специфику отношений между тромбоцитарным и коагуляционным звеньями системы гемостаза при ОИМ. Сохранение у части пациентов реакции тромбоцитов на АДФ сопряжено с гиперчувствительностью адренорецепторов, и может потенцироваться повышением ответа на другие системные факторы (серотонин, ангиотензин), что требует дальнейшего анализа статуса систем внутриклеточной сигнализации тромбоцитов.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейший анализ статуса систем внутриклеточной сигнализации тромбоцитов позволит определить молекулярные механизмы нарушения тромбогенеза при ОИМ.

Список литературы

1. Айнетдинова Д. Х. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам у больных с острым коронарным синдромом без подъема ST / Д. Х. Айнетдинова, А. Е. Удовиченко, В. А. Сулимов // Кардиология. – 2008. – № 6. – С. 35–39.
2. Крылов А. Л. Проблемы коронарной ангиопластики, которые не смогли разрешить стенты с антипролиферативным покрытием / А. Л. Крылов // Кардиология. – 2009. – № 5. – С. 69–74.
3. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом Medstat / Ю. Е. Лях, В. Г. Гурьянов, В. Н. Хоменко – Д.: Папакица, 2006. – 214 с.
4. Abbraccio M. P. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y₁ G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy / M. P. Abbraccio, G. Burnstock, J. M. Boeynaems // Pharmacol. Rev. – 2006. – Vol. 58. – P. 281–341.
5. Angiolillo D. J. Optimizing Platelet Inhibition in Clopidogrel Poor Metabolizers: Therapeutic Options and Practical Considerations / D. J. Angiolillo, M. Ueno // J. Am. Coll. Cardiol. – 2011. – Vol. 4. – P. 411–414
6. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors / S. Offermanns // Circ. Res. – 2006. – Vol. 99. – P. 1293–1304.
7. Rivera J. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation / J. Rivera, M. L. Lozano // Haematologica. – 2009. – Vol. 94. – P. 700–711.

УДК 616.127-005.8-085+616.155.1

ДИНАМИКА АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА НА ФОНЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Киреева М.А.

Резюме. В работе проведен анализ реактивности тромбоцитов к системным и сосудисто-тканевым факторам на фоне патогенетической терапии у 48 пациентов с острым инфарктом миокарда. Показано, что инфаркт миокарда сопровождается усилением агрегации тромбоцитов в ответ на адреналин, ангиотензин II, серотонин, коллаген и пурины. Назначение тиапиридинов с аспирином ограничивает агрегационный ответ тромбоцитов на АДФ, коллаген, адреналин, серотонин и ангиотензин II, однако при этом сохраняется реакция на тромбин. У части пациентов отмечалось транзиторное или стабильное сохранение агрегационного ответа тромбоцитов на АДФ, сопряженное с гиперсенситивностью адренорецепторов, что требует дальнейшего анализа статуса систем внутриклеточной сигнализации тромбоцитов.

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда, тромбоциты, реактивность.

УДК 616.127-005.8-085+616.155.1

ДИНАМІКА АГРЕГАЦІЇ ТРОМБОЦИТІВ У ПАЦІЄНТІВ З ГОСТРИМ ІНФАРКТОМ МІОКАРДА НА ТЛІ ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ ТЕРАПІЇ

Барінов Е.Ф., Сулаєва О.М., Кіреєва М. О.

Резюме. В роботі проведено аналіз реактивності тромбоцитів до системних та судинно-тканинних факторів на тлі патогенетичної терапії у 48 пацієнтів з гострим інфарктом міокарда. Показано, що інфаркт міокарда супроводжується посиленням агрегації тромбоцитів у відповідь на адреналін, ангіотензин II, серотонін, колаген і пурини. Призначення тиапіридинів з аспирином обмежує агрегаційну відповідь тромбоцитів на АДФ, колаген, адреналін, серотонін і ангіотензин II, однак при цьому зберігалася реакція на тромбін. У частини пацієнтів відзначалося транзиторне або стабільне збереження агрегаційної відповіді тромбоцитів на АДФ, поєднане з гіперсенситивністю адренорецепторів, що вимагає подальшого аналізу статусу систем внутрішньоклітинної сигналізації тромбоцитів.

Ключові слова: гострий інфаркт міокарда, тромбоцити, реактивність.

UDC 616.127-005.8-085+616.155.1

Dynamics Of Platelet Aggregation In Patients With Acute Myocardial Infarction Under Pathogenetic Therapy

Barinov E.F., Sulaieva O.N., Kireyeva M.A.

Summary. The platelet reactivity to different agonists in 48 patients with acute myocardial infarction before and under pathogenetic therapy was analyzed. It was shown that myocardial infarction is accompanied by increased platelet aggregation in response to epinephrine, angiotensin II, serotonin, collagen, and purines. Under thienopyridines and aspirin administration significant decrease of aggregation response of platelets to ADP, collagen, epinephrine, serotonin and angiotensin II was detected. But reaction of platelets on thrombin was significant. Some patients had transient or stable high reactivity of platelets to ADP, combined with hypersensitivity to epinephrine, which requires further analysis of the status of platelet intracellular signaling systems.

Key words: acute myocardial infarction, platelet reactivity.

Стаття надійшла 23.03.2012 р.
Рецензент – проф. Катеринчук І.П.