

Э.Ф. Баринов, С. Мамедалиева, Т.А. Твердохлеб

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Украина

## Взаимодействие гуморальных агонистов в активации тромбоцитов при хронической ишемии мозга

**Цель исследования:** изучить влияние стандартной медикаментозной терапии у пациентов с хронической ишемией мозга (ХИМ) на функциональный статус тромбоцитов, участвующих в нарушении микроциркуляции головного мозга. **Методы:** тромбоциты, выделенные из периферической крови путем центрифугирования, изучали через 24 ч после начала стандартной медикаментозной терапии, включающей ацетилсалициловую кислоту (100 мг). Для анализа реактивности клеток *in vitro* использовали аденозиндифосфат (АДФ), адреналин, фактор активации тромбоцитов (ФАТ), ангиотензин II и серотонин в эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ), вызывающей у здоровых лиц агрегацию тромбоцитов в диапазоне  $50 \pm 5\%$ . Исследование агрегации тромбоцитов проводили на агрегометре фирмы Chrono-Log (США). **Результаты:** в исследование были включены 95 пациентов с ХИМ 1–2-й стадии, из них 82 принимали антиагрегантные и гипотензивные препараты до поступления в стационар (основная группа), 13 — не получали таковые в течение 7 сут, предшествующих госпитализации (группа сравнения). В основной группе через 24 ч от начала консервативной терапии АДФ вызывал агрегацию тромбоцитов, которая была сопоставимой ( $p > 0,05$ ) со значениями у здоровых лиц. Остальные исследованные агонисты воспроизводили гипореактивность тромбоцитов, что отражает фармакологическое ингибирование их функциональной активности. На этом фоне у 34 (41,5%) пациентов имело место потенцирование эффектов ФАТ и адреналина в тесте *in vitro*, тогда как суммация эффектов серотонина и адреналина на тромбоциты выявлена у 12 (14,6%) пациентов. В основе данного феномена может лежать усиление аутокринной стимуляции тромбоцитов при дополнительной активации Gi-белка внутриклеточной сигнальной системы посредством адреналина и Gq-белка при воздействии ФАТ и серотонина. **Заключение:** ответ тромбоцитов *in vitro* на комбинированное действие агонистов может быть предиктором риска тромбогенеза при ХИМ.

**Ключевые слова:** хроническая ишемия мозга, тромбоциты, взаимодействие агонистов *in vitro*.

(Для цитирования: Баринов Э.Ф., Мамедалиева С., Твердохлеб Т.А. Взаимодействие гуморальных агонистов в активации тромбоцитов при хронической ишемии мозга. Вестник РАМН. 2015; 70 (3): 328–333. Doi: 10.15690/vramn.v70i3.1329)

328

### Обоснование

Признавая мультифакториальность патогенеза хронической ишемии головного мозга (ХИМ) и желание исследователей выделить ведущие патогенетические факторы заболевания, *de facto* приходится сталкиваться всего лишь

с намерениями обосновать необходимость фармакологической коррекции тех или иных патохимических нарушений [1]. Какие нарушения в действительности являются ведущими в патогенезе ХИМ, традиционно обсуждается формально. Как следствие, для лечения таких пациентов характерна полипрагмазия. Данной ситуации можно из-

E.F. Barinov, S. Mamedaliyeva, T.A. Tverdokhlebo

M. Gorky Donetsk National Medical University, Ukraine

## Interaction of the Humoral Agonist During the Platelets Activation in Patients with Chronic Cerebral Ischemia

**Objective:** The aim of the study was to determine the effect of the standard drug therapy of 95 patients with chronic cerebral ischemia (CCI) on the functional status of platelets as possible participants of microcirculation of the brain. **Methods:** Platelets were isolated from peripheral blood by centrifugation and examined at 24 hours after initiation of standard medical therapy including aspirin (100 mg). The cells were stimulated *in vitro* using adenosine diphosphate (ADP), epinephrine, platelet activating factor (PAF) and serotonin in an effective concentration ( $EC_{50}$ ) inducing in healthy individuals platelet aggregation in the range of  $50 \pm 5\%$ . A study of platelet aggregation was carried out on aggregometer Chrono-Log (USA).

**Results:** Research included 95 patients with CCI 1–2 Stage — 82 patients taking antiplatelet and antihypertensive drugs before hospitalization (main group), 13 — did not receive these drugs during 7 days prior to hospitalization (comparison group). After start conservative treatment, only ADP induced platelet aggregation, which was similar ( $p > 0.05$ ) with values in healthy individuals. The pharmacological inhibition of the functional activity of platelets other investigated agonists reproduced hyporesponsiveness of platelets. Against this background, in 34 (41.5%) patients at 24 hours after initiation of therapy occurred potentiation effects of PAF and epinephrine in the test *in vitro*; whereas the summation of the effects of serotonin and epinephrine on platelets was detected in 12 (14.6%) patients. The basis of this phenomenon may be strengthening effect of ADP secreted from dense-granules, additional stimulation by Gi-protein signaling system by epinephrine and Gq-protein by the action of PAF and serotonin. **Conclusion:** Response to the combined action of platelet agonists may be predictor of the risk of thrombogenesis at CCI.

**Key words:** chronic ischemia of the brain, blood platelets, the interaction of agonists *in vitro*.

(For citation: Barinov E.F., Mamedaliyeva S., Tverdokhlebo T.A. Interaction of the Humoral Agonist During the Platelets Activation in Patients with Chronic Cerebral Ischemia. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (3): 328–333. Doi: 10.15690/vramn.v70i3.1329)

бежать, если верифицировать причинно-следственные связи, формирующиеся у конкретного больного при хроническом нарушении мозгового кровообращения. Такой методический подход основан на признании индивидуальной реактивности организма и может быть реализован в исследованиях с клетками крови *in vitro*. В этом контексте представляется целесообразным перенести акцент в исследовании микроциркуляторных нарушений головного мозга на тромбоциты, которые наряду с эндотелием принимают участие в формировании агрегатов и тромбогенезе [2]. При этом возможно провести анализ влияния гуморальных агонистов, действующих на тромбоциты при ХИМ (по сути, патогенетических факторов заболевания), на предмет их участия в индукции тромбогенеза. К таковым следует отнести адреналин (в силу физиологических и патофизиологических паттернов активации симпатoadреналовой системы при ХИМ), ангиотензин II (эффektorная молекула ренин-ангиотензиновой системы), серотонин (способный модулировать активацию тромбоцитов), аденозиндифосфат (АДФ, отражающий аутокринный механизм тромбогенеза) и фактор активации тромбоцитов (ФАТ, паракринный медиатор, обеспечивающий взаимодействие лейкоцитов и тромбоцитов в реализации воспаления при атеротромбозе) [3, 4]. Анализ реальной картины, отражающей функциональную активность тромбоцитов, осложняется тем, что пациенты с ХИМ длительно принимают различные препараты, в т.ч. ограничивающие проагрегантную активность тромбоцитов (блокаторы циклооксигеназы, ангиотензиновых рецепторов типа I,  $\alpha$ -адренорецепторов, серотониновых рецепторов и т.д.). В связи с этим сформировался круг вопросов, требующих обсуждения, в частности: достигается ли надежный антиагрегантный эффект стандартной медикаментозной терапии в течение 24 ч от момента ее начала, какие из патогенетических факторов ХИМ могут быть факторами риска тромбогенеза в этот период, возможна ли в этих условиях суммация эффектов агонистов, стимулирующих тромбоциты? Очевидно, что состояние тромбоцитарного звена гемостаза в течение первых суток заболевания предопределяет прогрессирование нарушений микроциркуляции головного мозга и риск развития острых нарушений мозгового кровообращения.

Цель исследования состояла в определении функционального статуса тромбоцитов, участвующих в нарушении микроциркуляции головного мозга при ХИМ, через 24 ч после начала стандартной медикаментозной терапии.

## Методы

### Дизайн исследования

Проведено сравнительное исследование.

### Критерии соответствия

Критерий включения в исследование — наличие клинико-нейровизуализационных признаков хронического нарушения мозгового кровообращения. В исследование не включали пациентов, перенесших ишемический или геморрагический инсульт, гипертонические кризы с проводниковыми расстройствами; имеющих любые расстройства в сфере сознания, судорожные пароксизмы в анамнезе, а также пациентов с деменцией и наличием грубых интеллектуально-мнестических расстройств; наличием очаговой патологии головного мозга по данным нейровизуализации; онкологических заболеваний; недавно (менее 6 мес) перенесших черепно-мозговую

травму; пациентов с острым инфарктом миокарда, тяжелыми формами ишемической болезни сердца, пароксизмами аритмий в анамнезе; неконтролируемым повышением артериального давления и повышением его свыше 200/100 мм рт. ст., застойной сердечной недостаточностью; наличием в анамнезе язвенной болезни желудка или двенадцатиперстной кишки, сахарного диабета, печеночной и почечной недостаточности, заболеваний щитовидной железы, а также госпитализированных во время выходных дней или праздников. Все больные были информированы о процедурах и плане лечения, дали письменное согласие на участие в исследовании.

### Условия проведения

Пациенты были обследованы и проходили лечение во 2-м неврологическом отделении и отделении нейрореанимации Донецкого областного клинического территориального медицинского объединения (Украина).

### Продолжительность исследования

Запланированная продолжительность периода исследования составила 14 дней.

### Описание медицинского вмешательства

В основной группе представлены пациенты с ХИМ, которые до поступления в стационар принимали антиагрегантные и гипотензивные препараты. Агрегацию тромбоцитов (АТц) у данного контингента больных исследовали через 24 ч после начала стандартной консервативной терапии, включающей гипотензивные (периндоприл, 10 мг/сут; рамиприл, 5 мг/сут; лозартан, 50 мг/сут; валсартан, 80 мг/сут; бисопролол, 5 мг/сут; небиволол, 5 мг/сут; амлодипин, 5 мг/сут) препараты, статины (ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы ловастатин, 40 мг/сут; аторвастатин, 40 мг/сут; розувастатин, 10 мг/сут), вазоактивные препараты (циннаризин, 75 мг/сут; винпоцетин, 20 мг/сут внутривенно; ницерголин, 30 мг/сут; бетагистин, 48 мг/сут), препараты улучшающие метаболизм головного мозга и обеспечивающие коррекцию когнитивных расстройств (цитиколин, 1000 мг/сут; холина альфосцерат, 1000 мг/сут; пирацетам, 500 мг/сут; мемантин, 5 мг/сут;  $\gamma$ -аминомасляная кислота, 1000 мг/сут; L-лизин эсцинат, 5 мг/сут), антиагреганты (ацетилсалициловая кислота, 100 мг/сут).

### Исходы исследования

Наличие антиагрегантного эффекта у пациентов констатировали в тех случаях, когда агрегация тромбоцитов *in vitro* при действии основных агонистов не превышала 45%.

### Методы регистрации исходов

Исследование функционального состояния тромбоцитов проведено на момент госпитализации пациентов. Тромбоциты выделяли из периферической крови путем центрифугирования. Для стимуляции тромбоцитов *in vitro* использовали АДФ (5 мкМ), адреналин (5 мкМ), ФАТ (150 мкМ), ангиотензин II (10 мкМ) и серотонин (СТ, 10 мкМ) в эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ), вызывающей у здоровых лиц агрегацию тромбоцитов в диапазоне  $50 \pm 5\%$ . Исследование агрегации тромбоцитов проводили на агрегометре фирмы Chrono-Log (США); содержание тромбоцитов в пробе составляло  $200\ 000 \pm 20\ 000$ /мкл.

### Этическая экспертиза

Все клинические исследования выполнены по согласованию с комиссией по биоэтике Донецкого наци-

онального медицинского университета им. М. Горького (протокол № 95/16 от 19 сентября 2013 г.). В заключении указано, что работа выполнена с соблюдением норм медицинской этики и деонтологии, она отвечает этическим принципам проведения клинических исследований и положениям Хельсинкской декларации, принятой Генеральной ассамблеей Всемирной Медицинской Ассоциации (1997–2000), Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1997), соответствующим положениям Всемирной организации здравоохранения, Международного совета медицинских научных обществ, Международного кодекса медицинской этики (1983) и законам Украины и полностью исключает ограничение интересов больного и нанесения вреда его здоровью.

**Статистический анализ**

**Принципы расчета размера выборки**

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакета MedStat (ДонНМУ, Украина). Размер выборки определялся на основании сравнения двух средних с мощностью 80% и на уровне значимости 5%.

**Методы статистического анализа данных**

Точечная оценка величин, подлежащих анализу, проводилась путем расчета среднего арифметического признака ( $\bar{X}$ ) или медианы (Me) и соответствующей стандартной погрешности (m); для анализа структуры вариационного ряда использовалась характеристика квартилей. При анализе межгрупповых различий применяли критерий Стьюдента (в случае нормального закона распределения), критерий Вилкоксона (в случае распределения, отличного от нормального). Во всех случаях различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Для определения связи между признаками применяли методы корреляционного анализа: рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона r (в случае нормального закона распределения) или показатель ранговой корреляции Спирмена (в случае распределения, отличного от нормального).

**Результаты**

**Участники исследования**

В исследование были включены 95 пациентов с диагнозом «Хроническая ишемия головного мозга» (ХИМ, дисциркуляторная энцефалопатия) 1–2-й стадии. В основную группу вошли 47 мужчин и 35 женщин в возрасте от 40 до 84 (средний возраст  $64,3 \pm 8,0$ ) лет; группа сравнения представлена 13 пациентами с ХИМ 1–2-й стадии, из которых 7 мужчин и 6 женщин в возрасте от 52 до 75 (средний возраст  $63,4 \pm 9,4$ ) лет. Эти пациенты не принимали в течение 7 дней, предшествующих госпитализации, антиагрегантные препараты, блока-

торы кальциевых каналов и неселективные блокаторы  $\alpha$ -адренорецепторов.

**Основные результаты исследования**

**Достигается ли эффективный антиагрегантный эффект при стандартной консервативной терапии в течение 24 ч**

Ответ на данный вопрос рационально представить в контексте влияния АДФ, адреналина, ФАТ, СТ и ангиотензина II (АнII) на функциональную активность тромбоцитов в группе сравнения: у 13 пациентов с верифицированным диагнозом ХИМ была зафиксирована гиперреактивность тромбоцитов (табл. 1). В порядке снижения силы проагрегантного эффекта агонисты можно было ранжировать следующим образом: АДФ > адреналин – ФАТ – АнII > СТ. Таким образом, для пациентов с ХИМ характерна повышенная аутокринная стимуляция тромбоцитов, отражающая их проагрегантный потенциал, и наличие выраженного ответа на основные гуморальные факторы патогенеза заболевания. Исключением из правила является низкая СТ-индуцированная агрегация тромбоцитов, что свидетельствует о десенситизации 5HT<sub>2</sub>-рецепторов, происходящей, вероятно, в результате влияния нарушений серотонинергической системы головного мозга при ХИМ. В основной группе через 24 ч после начала консервативной терапии АДФ вызывал агрегацию тромбоцитов (АТц), которая была сопоставимой ( $p > 0,05$ ) со значениями у здоровых лиц. Что касается остальных исследованных агонистов, то все они воспроизводили гипореактивность тромбоцитов, а, значит, эффект фармакологического ингибирования функциональной активности тромбоцитов достигался.

**Какие из гуморальных агонистов ХИМ могут оставаться предикторами риска тромбогенеза через 24 ч после начала стандартной консервативной терапии, и возможна ли в этих условиях суммация эффектов агонистов, стимулирующих тромбоциты**

Из 82 пациентов с ХИМ у 34 (41,5%) человек имело место потенцирование эффектов ФАТ и адреналина в тесте *in vitro*. Данному контингенту больных присуща общая закономерность – гипореактивность тромбоцитов через 24 ч консервативной терапии (табл. 2). При этом чувствительность рецепторов к адреналину была выше, чем к ФАТ. Обращает на себя внимание ряд интересных фактов. Во-первых, АДФ-индуцированная АТц находилась на уровне нижней границы нормореактивности ( $EC_{50}$  АДФ у здоровых лиц  $50,0 \pm 5,0\%$ ). Поквартильный анализ агрегатограмм свидетельствует о том, что в анализе представлены как гипо-, так и гиперреактивные тромбоциты. Если исходить из того, что агонист АДФ тестирует чувствительность пуриновых рецепторов, а, по сути, оценивает механизм аутокринной стимуляции, то следует признать, что протромбогенный потенциал тромбоцитов остается

**Таблица 1.** Межгрупповые различия индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов с хронической ишемией головного мозга

| Индуктор агрегации ( $EC_{50}$ ) | Группа сравнения  |          | Основная группа |         |
|----------------------------------|-------------------|----------|-----------------|---------|
|                                  | Me $\pm$ m        | ДИ       | Me $\pm$ m      | ДИ      |
| АДФ (5 мкМ)                      | 83,3 $\pm$ 11,333 | (55–100) | 45 $\pm$ 5,206* | (30–57) |
| Адреналин (5 мкМ)                | 63,0 $\pm$ 10,714 | (50–100) | 20 $\pm$ 4,449* | (5–37)  |
| ФАТ (150 мкМ)                    | 59,6 $\pm$ 3,022  | (56–70)  | 5 $\pm$ 2,806** | (2–8)   |
| Ангиотензин II (10 мкМ)          | 62,5 $\pm$ 4,811  | (50–75)  | 2 $\pm$ 1,939** | (1–3)   |
| Серотонин (10 мкМ)               | 36,6 $\pm$ 3,619  | (26–44)  | 3 $\pm$ 2,11**  | (2–19)  |

Примечание. \* – межгрупповые различия,  $p < 0,01$ ; \*\* – межгрупповые различия,  $p < 0,001$ . ДИ – доверительный интервал.

Таблица 2. Параметры ФАТ-индуцированной агрегации тромбоцитов

| Агонист (EC50)                    | Медиана | I квартиль | III квартиль | Ошибка медианы | Левый 95% ДИ | Правый 95% ДИ |
|-----------------------------------|---------|------------|--------------|----------------|--------------|---------------|
| АДФ (5 мкМ)                       | 45      | 18         | 60           | 5,206          | 30           | 57            |
| Адреналин (5 мкМ)                 | 20      | 4          | 40           | 4,449          | 5            | 37            |
| ФАТ (150 мкМ)                     | 5       | 2          | 12           | 2,806          | 2            | 8             |
| ФАТ (150 мкМ) + адреналин (5 мкМ) | 43*♦    | 16         | 55           | 2,806          | 2            | 8             |

Примечание. \* — вероятность различий АТц при совместном действии агонистов (ФАТ + адреналин) и только ФАТ ( $p < 0,01$ ); ♦ — ФАТ + адреналин и только адреналин ( $p < 0,05$ ).

достаточно высоким. Во-вторых, сопоставление результатов АТц, индуцированной АДФ, адреналином и ФАТ, позволяет констатировать, что имеет место снижение чувствительности  $\alpha_2$ -адренорецепторов и ФАТ-рецепторов, тогда как «поломки» внутриклеточных сигнальных систем тромбоцитов отсутствуют. В противном случае ответ тромбоцитов на АДФ был бы снижен. В-третьих, более высокий ответ тромбоцитов на адреналин, по сравнению с ФАТ, отражает доминирующий эффект участка сигнальной системы, сопряженной с Gi-белком, над сигнальной системой, ассоциированной с Gq-белком, в реализации сигнала, активирующего тромбоциты. В-четвертых, анализ линейной корреляционной связи свидетельствует о том, что эффект потенцирования ФАТ в присутствии адреналина в большей степени связан с чувствительностью пуриновых рецепторов ( $r = 0,724$ ;  $p < 0,050$ ) и  $\alpha_2$ -адренорецепторов ( $r = 0,650$ ;  $p < 0,050$ ) и в меньшей степени — самих ФАТ-рецепторов ( $r = 0,369$ ;  $p < 0,050$ ). Иными словами, потенцирующий эффект зависит от аутокринной стимуляции, которая обеспечивается секрецией АДФ из плотных гранул (т.е. адаптационной реакцией самих тромбоцитов), возможностью реализации гуморального сигнала при активации симпато-адреналовой системы (исходная экспрессия  $\alpha_2$ -адренорецепторов, уровень катехоламинов в циркулирующей крови, остаточная активность рецепторов после фармакологической блокады) и межклеточной кооперацией клеток крови (стимуляцией тромбоцитов со стороны активированных лейкоцитов, участвующих в воспалительной реакции). В-пятых, участие ФАТ в активации тромбоцитов даже после блокады ЦОГ-1 тромбоцитов и ЦОГ-2 лейкоцитов (в результате назначения больным ацетилсалициловой кислоты, различных противовоспалительных препаратов) подтверждает возможность стимуляции тромбоцитов активированными лейкоцитами при наличии воспалительной реакции у пациента.

Означают ли полученные результаты, что при фармакологической супрессии тромбоцитов другие агонисты, активирующие Gq-белоксопосредованный участок сигнального пути (например, СТ и АНП), могут взаимодействовать с адреналином?

В этом контексте вызывает интерес возможность взаимодействия СТ и катехоламинов в модуляции функциональной активности тромбоцитов, которые имеют

рецепторы 5HT<sub>2</sub>. Это связано с тем, что метаболизм СТ в тромбоцитах при патологии центральной нервной системы рассматривается в контексте дисфункции гуморального звена церебральной серотонинергической системы [5]. Суммация эффектов СТ и адреналина на тромбоциты была установлена у 12 (14,6%) из 76 пациентов с ХИМ через 24 ч после начала консервативной терапии (табл. 3). У данного контингента больных не обнаружено статистически значимых различий между АТц, индуцированной АДФ и адреналином. Гипореактивность тромбоцитов в отношении адреналина и СТ, вероятно, связана с десенситизацией рецепторов. Косвенным подтверждением этого может быть адекватное функционирование нисходящих потоков сигнальных систем, связанных с Gi- и Gq-белками, при стимуляции тромбоцитов АДФ.

Инкубация тромбоцитов с СТ в присутствии адреналина сопровождалась суммацией ответов тромбоцитов, в которой определяющую роль играет адреналин. В то же время не следует недооценивать участие СТ в индукции тромбогенеза при ХИМ, учитывая индивидуальную вариабельность реакции тромбоцитов на СТ (минимальная АТц — 1%, максимальная достигала 36%). Подтверждением этого могут служить 2 случая, когда регистрировалась гипореактивность 5HT<sub>2</sub>-рецепторов (АТц 17 и 36%) и  $\alpha_2$ -адренорецепторов (АТц 13 и 55%), однако при совместном действии агонистов возникало критическое повышение функциональной активности тромбоцитов (АТц регистрировалась на уровне 70 и 60%, соответственно). Наличие линейной корреляционной связи говорит о том, что эффект суммации агонистов связан с чувствительностью пуриновых рецепторов ( $r = 0,636$ ;  $p < 0,050$ ),  $\alpha_2$ -адренорецепторов ( $r = 0,563$ ;  $p < 0,050$ ) и 5HT<sub>2</sub>-рецепторов ( $r = 0,483$ ;  $p < 0,050$ ). Очевидно, что адреналин может взаимодействовать с СТ в плане повышения функциональной активности тромбоцитов. Можно предположить, что в данном случае мы сталкиваемся с ситуацией, когда адреналин путем активации фосфолипазы С $\beta$  дублирует эффект СТ, стимулирующего Gq-белок, связанный с участком сигнальной системы. Следовательно, в условиях выраженной гипореактивности 5HT<sub>2</sub>-рецепторов агонист в комбинации с адреналином не является фактором риска тромбогенеза. Вероятно, ситуация может кардинально измениться при остаточной чувствительности 5HT<sub>2</sub>-рецепторов, превышающей 17%.

Таблица 3. Параметры агрегации тромбоцитов при индукции серотонином

| Агонист (EC <sub>50</sub> )     | Медиана | I квартиль | III квартиль | Ошибка медианы | Левый 95% ДИ | Правый 95% ДИ |
|---------------------------------|---------|------------|--------------|----------------|--------------|---------------|
| АДФ (5 мкМ)                     | 50      | 34         | 66           | 9,913          | 28           | 66            |
| Адреналин (5 мкМ)               | 36,5    | 8,5        | 55           | 8,289          | 4            | 55            |
| СТ (10 мкМ)                     | 2       | 1,5        | 2,5          | 4,423          | 1            | 3             |
| СТ (10 мкМ) + адреналин (5 мкМ) | 47,5*♦  | 15,5       | 59,5         | 8,3            | 15           | 60            |

Примечание.\* — вероятность различий АТц при совместном действии агонистов (СТ + адреналин) и только СТ ( $p < 0,001$ ); ♦ — СТ + адреналин и только адреналин ( $p < 0,05$ ). ДИ — доверительный интервал.



## Обсуждение

В основной группе через 24 ч после начала консервативной терапии только АДФ вызывал агрегацию тромбоцитов, которая была сопоставимой ( $p > 0,050$ ) с таковой у здоровых лиц. Остальные исследованные агонисты воспроизводили гипореактивность тромбоцитов, что отражает фармакологическое ингибирование функциональной активности тромбоцитов. На этом фоне у 34 (41,5%) пациентов через 24 ч после начала консервативной терапии имело место потенцирование эффектов ФАТ и адреналина в тесте *in vitro*, тогда как суммация эффектов СТ и адреналина на тромбоциты выявлена у 12 (14,6%) пациентов. В основе данного феномена может лежать усиление эффекта АДФ, секретируемого из плотных гранул, путем дополнительной стимуляции Gi-белка сигнальной системы посредством адреналина и Gq-белка при воздействии ФАТ и СТ. Ответы тромбоцитов на комбинированное действие агонистов могут быть предикторами риска тромбогенеза при ХИМ.

По данным литературы может сложиться впечатление, что антиагрегантная терапия при кардиоваскулярной патологии гарантирует гипореактивность тромбоцитов, поэтому риск тромбогенеза при действии на тромбоциты гуморальных факторов патогенеза ХИМ минимизируется [6]. Тем не менее прогрессирование нарушений мозгового кровообращения (развитие транзиторной ишемической атаки или инсульта) на фоне поддерживающей консервативной терапии свидетельствует о том, что не все так однозначно [7]. В последнее время обсуждаются причины восстановления реактивности тромбоцитов в течение 24 ч после назначения первой дозы ацетилсалициловой кислоты у пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения [8]. В связи с этим результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что уже через 24 ч после назначения пациентам ацетилсалициловой кислоты в дозе 100 мг регистрируется гипореактивность тромбоцитов в отношении адреналина, ФАТ и СТ. Однако при этом АДФ воспроизводит ответ тромбоцитов на уровне нижней границы референтного диапазона нормы. Следовательно, при монотерапии ацетилсалициловой кислотой возможно ингибирование функциональной активности тромбоцитов, однако при этом сохраняется аутокринная стимуляция тромбоцитов, связанная с секрецией АДФ из гранул. В этом контексте приобретает новый смысл анализ возможности рецидива инсульта при использовании различных антиагрегантов [9, 10]. Демонстративным в этом отношении служит исследование Т. Абумиа и соавт. [11], в котором проспективно изучали связь агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ и коллагеном, и возникновения повторных инсультов у больных, принимающих ацетилсалициловую кислоту, тиклопидин и комбинацию ацетилсалициловой кислоты и тиклопидина. Установлено, что АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов была значительно ниже в группах с исполь-

зованием тиклопидина и ацетилсалициловой кислоты + тиклопидин по сравнению с группой ацетилсалициловой кислоты ( $p < 0,001$ ). Возможную разницу в возникновении повторных инсультов при использовании ацетилсалициловой кислоты и тиклопидина связывают с остаточной проагрегантной возможностью тромбоцитов. Вероятно, обнаруженное сохранение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов на фоне монотерапии ацетилсалициловой кислотой является фактором риска повышения функциональной активности гипореактивных тромбоцитов. Подтверждением данной гипотезы может служить эффект комбинированного действия «слабых» гуморальных агонистов на тромбоциты. Так, у 34 (41,5%) пациентов с ХИМ через 24 ч после назначения ацетилсалициловой кислоты регистрировали потенцирование проагрегантных эффектов ФАТ и адреналина в тесте *in vitro* на гипореактивных тромбоцитах, если АДФ-индуцированная АТц находилась на уровне нижней границы нормореактивности ( $45,0 \pm 5,2\%$ ). Роль аутокринной стимуляции АДФ просматривается и при инкубации тромбоцитов с СТ в присутствии адреналина. Так, у 12 (14,6%) пациентов обнаружена суммация эффектов СТ и адреналина на тромбоциты, при этом АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов сохранялась высокой ( $50,0 \pm 9,9\%$ ).

## Заключение

Антиагрегантная терапия при кардиоваскулярной патологии снижает риск тромбогенеза, однако причины восстановления реактивности тромбоцитов остаются неясными. В исследовании показано, что функциональный статус тромбоцитов при ХИМ через 24 ч после начала консервативной терапии, включающей ацетилсалициловую кислоту в дозе 100 мг, действительно характеризуется гипореактивностью в отношении действия основных гуморальных факторов: адреналина, фактора активации тромбоцитов, ангиотензина II и серотонина. Тем не менее в этих условиях возможно потенцирование или суммация эффектов «слабых» агонистов, стимулирующих тромбоциты. В основе данного феномена может лежать усиление эффекта АДФ, секретируемого из плотных гранул, путем дополнительной стимуляции Gi-белка сигнальной системы посредством адреналина и Gq-белка при воздействии фактора активации тромбоцитов и серотонина. Ответ тромбоцитов на комбинированное действие агонистов может быть предиктором риска тромбогенеза при ХИМ.

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки исследования / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tanahashi N. Antiplatelet therapy for secondary prevention of cerebral infarction. *Nihon. Rinsho*. 2014; 72 (7): 1270–1275.
2. Lukasiak M., Dworacki G., Michalak S., Kufel–Grabowska J., Watala C., Kozubski W. Chronic hyper-reactivity of platelets resulting in enhanced monocyte recruitment in patients after ischaemic stroke. *Platelets*. 2012; 23 (2): 132–142.
3. Yano Y., Hoshida S., Etoh T., Tamaki N., Yokota N., Kario C. Synergistic effect of chronic kidney disease and high circulatory nor-
4. epinephrine level on stroke risk in Japanese hypertensive patients. *Atherosclerosis*. 2011; 219 (1): 273–279.
5. Claus R. Disorders of consciousness and pharmaceuticals that act on oxygen based amino acid and monoamine neurotransmitter pathways of the brain. *Curr. Pharm. Des.* 2014; 20 (26): 4140–4153.
6. Каракулова Ю.В., Кайгородова Н.Б., Батуева Е.А. Активация гуморального серотонина и эндогенных нейротрофинов под

- влиянием терапии при диабетической периферической невропатии. *Медицина и здравоохранение*. 2013; 3: 13–17.
6. Roth G.A., Gillespie C.W., Mokdad A.A., Shen D.D., Fleming D.W., Stergachis A., Murray C.J., Mokdad A.H. Aspirin use and knowledge in the community: a population and health facility based survey for measuring local health system performance. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2014; 7 (14): 16.
  7. Conrad M.F., Boulom V., Mukhopadhyay S., Garg A., Patel V.I., Cambria R.P. Progression of asymptomatic carotid stenosis despite optimal medical therapy. *J. Vasc. Surg.* 2013; 58 (1): 128–135.
  8. Richard S., Toussaint-Насquard M., Fay R., Lacour J.C., Ducrocq X., Lecompte T. Laboratory effect on platelet activity within 24 h of the first 300 mg oral dose of aspirin given in hospital during the acute phase of ischemic cerebral events. *Cerebrovasc. Dis.* 2012; 33 (6): 574–578.
  9. Arnan M.K., Burke G.L., Bushnell C. Secondary prevention of stroke in the elderly: focus on drug therapy. *Drugs Aging.* 2014; 31 (10): 721–730.
  10. Thaler D.E., Ruthazer R., Weimar C., Mas J.L., Serena J., Di Angelantonio E., Papetti F., Homma S., Mattle H.P., Nedeltchev K., Mono M.L., Jaigobin C., Michel P., Elkind M.S., Di Tullio M.R., Lutz J.S., Griffith J., Kent D.M. Recurrent stroke predictors differ in medically treated patients with pathogenic vs. other PFOs. *Neurology.* 2014; 83 (3): 221–226.
  11. Abumiya T., Houkin K. Association of recurrent cerebral infarction with adenosine diphosphate and collagen induced platelet aggregation in patients treated with ticlopidine and/or aspirin. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2011; 20 (4): 319–323.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Баринов Эдуард Фёдорович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького

Адрес: 83003, Украина, Донецк, пр-т Ильича, д. 16, тел.: +38 (062) 344-42-61, e-mail: barinov.ef@gmail.com

**Мамедалиева Севиндж**, ассистент кафедры неврологии и медицинской генетики Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького

Адрес: 83003, Украина, Донецк, пр-т Ильича, д. 16, тел.: +38 (062) 295-62-89, e-mail: sevdamar@mail.ru

**Твердохлеб Татьяна Александровна**, аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького

Адрес: 83003, Украина, Донецк, пр-т Ильича, д. 16, тел.: +38 (062) 344-42-56, e-mail: ivt-08@mail