Аспиринорезистентность как результат нарушения взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов у пациентов с ишемической болезнью сердца

Гончаров М.Д.^{1,2*}, Савченко А.А.^{2,3}, Гринштейн Ю.И.², Гвоздев И.И.³, Косинова А.А.², Монгуш Т.С.^{1,2}

¹ Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии, Красноярск, Россия

² Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

³ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия

Цель. Изучить взаимосвязь между уровнями синтеза активных форм кислорода (АФК) тромбоцитами и нейтрофилами у пациентов ишемической болезнью сердца (ИБС) до и после аортокоронарного шунтирования (АКШ) в зависимости от чувствительности к ацетилсалициловой кислоте (АСК).

Материал и методы. В исследование включено 95 пациентов с ИБС, которым была показана операция АКШ. Контрольная группа – 30 здоровых доноров. За 5 сут до АКШ прекращался прием АСК, а с 1-х сут после операции возобновлялся прием кишечнорастворимой формы АСК в дозе 100 мг/сут. Резистентность к АСК определяли на оптическом агрегометре при уровне агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой $\geq 20\%$ хотя бы в одной точке наблюдения: до АКШ, на 1-3 сут и на 8-10 сут после операции. Оценивали спонтанную и индуцированную люцигенин-зависимую хемилюминесценцию (ХЛ) тромбоцитов (индукция АДФ) и нейтрофилов (индукция зимозаном) по времени выхода на максимум интенсивности (Tmax), максимальной интенсивности (Imax) и площади (S) под кривой ХЛ.

Результаты. Выявлено 70,5% чувствительных к АСК (чАСК) и 29,5% резистентных (рАСК) пациентов. До АКШ у чАСК пациентов была повышена Imax спонтанной и зимозан-индуцированной ХЛ нейтрофилов и ХЛ-активность тромбоцитов относительно контрольных значений. У рАСК пациентов была снижена Tmax спонтанной ХЛ тромбоцитов, а также Imax и S под кривой АДФ-индуцированной ХЛ тромбоцитов относительно чАСК пациентов. В 1-е и 8-10 сут после АКШ у чАСК пациентов показатели ХЛ активности нейтрофилов и тромбоцитов остаются повышенными по сравнению с контрольными значениями. В 1-е сут после АКШ у рАСК-пациентов установлено снижение S под кривой спонтанной ХЛ нейтрофилов относительно чАСК-пациентов, а также повышение Imax и S под кривой индуцированной ХЛ нейтрофилов по сравнению с контролем. У рАСК-пациентов, относительно контрольной группы и чАСК-пациентов, снижена величина Tmax спонтанной ХЛ тромбоцитов. На 8-10 сут после АКШ большинство показателей спонтанной и зимозан-индуцированной ХЛ нейтрофилов у рАСК пациентов также были повышены по сравнению с контролем. У рАСК-пациентов на 1-е сут после АКШ обнаружена положительная корреляция Imax индуцированной ХЛ ($r=0,83$), на 8-10-е сут – отрицательная корреляция Tmax спонтанной ХЛ ($r=-0,75$) и S под кривой индуцированной ХЛ ($r=-0,70$) между тромбоцитами и нейтрофилами.

Заключение. У чАСК пациентов с ИБС до и после АКШ выявляется высокий уровень синтеза супероксид-радикала нейтрофилами и тромбоцитами. Взаимосвязь между уровнями синтеза супероксид-радикала нейтрофилами и тромбоцитами обнаружена только после АКШ у рАСК-пациентов. Повышенный синтез супероксид-радикала за счет метаболических и регуляторных взаимосвязей в нейтрофилах и тромбоцитах стимулирует провоспалительные процессы при ИБС и определяет чувствительность тромбоцитов к АСК.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, резистентность, ацетилсалициловая кислота, межклеточное взаимодействие, тромбоцит, нейтрофил.

Для цитирования: Гончаров М.Д., Савченко А.А., Гринштейн Ю.И., Гвоздев И.И., Косинова А.А., Монгуш Т.С. Аспиринорезистентность как результат нарушения взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии* 2021;17(1):16-22. DOI:10.20996/1819-6446-2021-01-07.

Aspirin Resistance as a Result of Impaired Interaction of Platelets and Neutrophils in Patients with Coronary Heart Disease

Goncharov M.D.^{1,2*}, Savchenko A.A.^{2,3}, Grinshtein Yu.I.², Gvozdev I.I.³, Kosinova A.A.², Mongush T.S.^{1,2}

¹ Federal Center of Cardiovascular Surgery, Krasnoyarsk, Russia

² Professor V. F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

³ Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia

Aim. To study the relationship between the levels of synthesis of reactive oxygen species (ROS) by platelets and neutrophils in patients with coronary heart disease (CHD) before and after coronary artery bypass grafting (CABG), depending on sensitivity to acetylsalicylic acid (ASA).

Material and methods. The study included 95 patients with coronary artery disease who are indicated for CABG surgery. The control group consisted of 30 healthy donors. The antiplatelet therapy was stopped for at least 5 days before CABG. In the postoperative period, from the first day, all patients were received 100 mg of an enteric form of acetylsalicylic acid (ASA). Resistance to ASA was determined at the level of platelet aggregation with arachidonic acid $\geq 20\%$ by optical aggregometry at least at one observation point: before CABG, on 1-3 day and on 8-10 day after surgery. We evaluated the spontaneous and induced lucigenin-dependent chemiluminescence (CL) of platelets (ADP induction) and neutrophils (zymosan induction) by the exit time to maximum intensity (Tmax), maximum intensity (Imax) and area (S) under the CL curve.

Results. 70.5% sensitive (sASA) and 29.5% resistant (rASA) to ASA patients were revealed. Prior to CABG, in sASA patients, the Imax of spontaneous and zymosan-induced neutrophil CL and CL platelet activity was increased relative to control values. Tmax of spontaneous platelet CL, Imax and S under the ADP-induced platelet CL curve were lower in sASA patients, if to compare with rASA patients. On the 1st and 8-10th day after CABG in sASA patients, the CL indicators of neutrophil and platelet activity also remained elevated compared to control values. On the 1st day after CABG decreased levels of S under the spontaneous CL curve of neutrophils in rASA patients was established compared with sASA patients, and increased levels of Imax and S under the curve of induced neutrophil CL were detected in comparison with the control range. In rASA patients, the values of Tmax

of spontaneous platelet CL decreased in relation to the values detected in the control group and sASA patients. On the 8–10th day after CABG, most indicators of spontaneous and zymosan-induced CL neutrophils in rASA patients were also increased compared to control values. In rASA patients a positive correlation of I_{max}-induced CL was found ($r=0.83$) on the 1st day after CABG and negative correlations of T_{max} of spontaneous CL ($r=-0.75$) and S under the curve induced CL ($r=-0.70$) on the 8-10th day were detected between platelets and neutrophils.

Conclusion. In sASA patients with coronary heart disease before and after CABG, a high level of synthesis of superoxide radical by neutrophils and platelets was detected. The relationship between the levels of the synthesis of superoxide radical by neutrophils and platelets was found only after CABG in rASA patients. Increased synthesis of superoxide radical due to metabolic and regulatory relationships in neutrophils and platelets stimulates pro-inflammatory processes in coronary artery disease and determines the sensitivity of platelets to ASA.

Keywords: coronary artery disease, resistance, acetylsalicylic acid, intercellular interaction, platelet, neutrophil.

For citation: Goncharov M.D., Savchenko A.A., Grinshtein Y.I., Gvozdev I.I., Kosinova A.A., Mongush T.S. Aspirin Resistance as a Result of Impaired Interaction of Platelets and Neutrophils in Patients with Coronary Heart Disease. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2021;17(1):16-22. DOI:10.20996/1819-6446-2021-01-07.

*Corresponding Author (Автор ответственный за переписку): adimax07@mail.ru

Received/Поступила: 20.01.2020

Accepted/Принята в печать: 30.01.20

Введение

Для предотвращения нежелательных исходов при ишемической болезни сердца (ИБС) применяют антитромбоцитарные препараты, в частности, ацетилсалициловую кислоту (АСК) [1]. АСК используют для снижения риска атеротромбоза в сосудах сердца в качестве первичной и вторичной профилактики, в том числе – для уменьшения риска окклюзии шунтов после операции аортокоронарного шунтирования (АКШ). Однако даже при хорошей приверженности к АСК у части пациентов возникают острый инфаркт миокарда (ОИМ), тромбозы коронарных стентов и шунтов, которые связывают с недостаточным ответом тромбоцитов на АСК [2]. Обсуждаются клинические, клеточные, генетические аспекты резистентности к АСК у пациентов с ИБС. Тем не менее, механизм этого явления остается недостаточно изученным, а свой вклад в неразрешенность данного вопроса вносит и отсутствие единой стандартной методики определения аспиринорезистентности [3,4]. Во многих исследованиях используются различные варианты методов с применением разной аппаратуры и индукторов агрегации, из-за чего доля резистентных к АСК пациентов варьирует в широком диапазоне от 8 до 45% [5,6].

Тромбоциты являются активными участниками не только гемостатических, но также иммунных и воспалительных процессов, что подразумевает их тесную функциональную связь с различными популяциями лейкоцитов [7,8]. В частности, доказано, что в процессе иммунновоспалительных реакций тромбоциты формируют межклеточные комплексы с лейкоцитами (особенно – с нейтрофилами и лимфоцитами) [9]. Одним из показателей функциональной и метаболической активности тромбоцитов и нейтрофилов является наработка ими активных форм кислорода (АФК), которые принимают участие в защитных реак-

циях, регуляторных и сигнальных процессах внутри и вне клеток [10-12]. Количество лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов и синтезируемых АФК увеличивается при остром коронарном синдроме, что говорит об ответной реакции организма на повреждение миокарда и межклеточном взаимодействии клеток крови [13]. В связи с этим целесообразно более детально рассмотреть влияние межклеточных взаимодействий на чувствительность тромбоцитов к АСК.

Целью исследования явилось изучение взаимосвязи между уровнями синтеза АФК тромбоцитами и нейтрофилами у пациентов с ИБС до и после АКШ в зависимости от чувствительности к АСК.

В качестве АФК, синтезируемой тромбоцитами и нейтрофилами, с помощью люцигенин-зависимой хемилюминесценции исследован супероксид-радикал, который определяется как первичная АФК с выраженными регуляторными функциями [10,14,15].

Материал и методы

На базе Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии г. Красноярск было обследовано 95 пациентов с ИБС (68 мужчин и 27 женщин) в возрасте $61,5 \pm 5,1$ лет, с II-IV функциональным классом стабильной стенокардии согласно Канадской классификации, которым показана операция АКШ. Атеросклеротическое поражение коронарных артерий подтверждалось коронароангиографией. Критериями не включения в исследование были хроническая болезнь почек, печеночная недостаточность, язвенная болезнь желудка и/или двенадцатиперстной кишки в стадии обострения, непереносимость АСК. За 5 сут до АКШ пациенты прекращали прием АСК, а с первых сут после операции им назначалось 100 мг/сут кишечнорастворимой формы АСК. Забор крови проводили трижды: до АКШ на фоне отмены АСК (1 точка наблюдения), в 1 сут после

АКШ (2 точка наблюдения) и на 8-10 сут после операции на фоне терапии АСК (3 точка наблюдения). Контрольную группу составили 30 здоровых доноров.

Для проведения хемилюминесцентного (ХЛ) анализа тромбоциты выделяли из крови поэтапным центрифугированием, нейтрофилы – в градиенте плотности фиколл-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток [14,16]. Резистентность тромбоцитов к АСК определяли в богатой тромбоцитами плазме (центрифугирование крови при 1500 оборотах в течение 10 мин) на оптическом агрегометре CHRONO-LOG 490 при уровне агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой $\geq 20\%$ хотя бы в одной точке наблюдения: при инкубации с раствором 3,36 ммоль АСК (Sigma, USA) *in vitro* до терапии (до операции и в 1 сут после операции) и на 8-10 сут терапии АСК [17]. Исследование клеток с помощью ХЛ метода проводили на анализаторе БЛМ-3607 (ООО «МедБиоТех», Россия). В качестве ХЛ индикатора использовали люцигенин (Sigma, USA) в концентрации 50 мкг/мл. Данный ХЛ индикатор не проникает внутрь клетки, взаимодействует только с супероксид-радикалом [14, 15]. Оценивали спонтанную и АДФ-индуцированную ХЛ тромбоцитов (концентрация АДФ (AppliChem GmbH, Германия) 0,1 М) и спонтанную и зимозан-индуцированную ХЛ нейтрофилов (опсонизированный зимозан (AppliChem GmbH, Германия) 2 мкг/мл) по таким показателям, как время выхода на максимум интенсивности (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax) и площадь (S) под кривой ХЛ. Усиление индуцированной ХЛ оценивали соотношением площади под кривой индуцированной (Синд) к площади под кривой спонтанной (Сспонт) ХЛ и определяли как индекс активации (ИА) [15].

Исследование было выполнено с учетом информированного согласия испытуемых в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (С25 и С75). Статистическую значимость различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Статистическую значимость различий в динамике лечения определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранго-

вой корреляции по Спирмену (Spearman rank R). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты

По результатам обследования больных ИБС на резистентность тромбоцитов к АСК все пациенты были разделены на две группы: чувствительные к АСК (чАСК; n=67, 70,5%) и резистентные к АСК (рАСК; n=28, 29,5%). Подобное соотношение чАСК и рАСК у пациентов ИБС сопоставимо с ранее полученными результатами [18].

При исследовании ХЛ активности нейтрофилов и тромбоцитов обнаружено, что у чАСК пациентов с ИБС относительно контрольных значений повышена интенсивность спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови (табл. 1). ХЛ активность тромбоцитов у этой категории пациентов также увеличена относительно контрольного уровня. У рАСК пациентов с ИБС относительно контрольных значений повышена интенсивность спонтанной и индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов, но только по показателям Tmax и площади под кривой. Относительно контрольного диапазона у данной категории пациентов повышена только Tmax АДФ-индуцированной хемилюминесценции тромбоцитов. Относительно значений, выявленных у чАСК пациентов, у рАСК пациентов снижена Tmax спонтанной ХЛ тромбоцитов, а также Imax и площади под кривой АДФ-индуцированной ХЛ тромбоцитов.

В 1-е сут после АКШ у чАСК пациентов с ИБС сохраняется высокий уровень спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов (табл. 2). При этом по сравнению с исходным уровнем (до операции АКШ) выявляется понижение Tmax спонтанной (p=0,014) и индуцированной (p<0,001) ХЛ нейтрофилов. Показатели ХЛ активности тромбоцитов у данной категории пациентов также остаются повышенными по сравнению с контрольными значениями. При сравнении с исходными данными выявляется понижение Imax спонтанной (p=0,046) и Tmax индуцированной (p=0,042) ХЛ тромбоцитов. У рАСК пациентов с ИБС установлено снижение площади под кривой спонтанной ХЛ нейтрофилов относительно показателей, выявляемых у чАСК пациентов, а также повышение Imax и площади под кривой индуцированной ХЛ нейтрофилов по сравнению с контрольным диапазоном. У данной категории пациентов относительно исходных значений выявляется снижение Tmax индуцированной ХЛ нейтрофилов (p=0,049). У рАСК пациентов с ИБС относительно значений, выявляемых у лиц контрольной группы и чАСК пациентов, снижена величина Tmax спонтанной ХЛ тромбоцитов.

Table 1. Chemiluminescent activity of neutrophils and platelets in patients with coronary artery disease before coronary artery bypass grafting

Таблица 1. Хемилюминесцентная активность нейтрофилов и тромбоцитов у пациентов с ИБС до АКШ

Параметр	Нейтрофилы			Тромбоциты		
	Контроль (n=30)	чАСК (n=67)	рАСК (n=28)	Контроль (n=30)	чАСК (n=67)	рАСК (n=28)
Спонтанная хемилюминесценция						
Tmax, сек.	847 (673-1356)	1515 (1163-1810)***	1363 (1271-1785)*	213 (80-354)	813 (222-2841)*	212 (35-286)†
Imax, о.е.×10 ³	2,48 (0,59-3,43)	4,56 (1,99-9,85)*	4,10 (0,72-8,17)	0,08 (0,07-0,09)	0,12 (0,09-0,50)	0,09 (0,08-0,38)
S, о.е.×сек×10 ⁶	4,34 (1,64-9,18)	14,49 (5,55-34,15)**	11,72 (5,32-35,60)*	0,23 (0,19-0,26)	0,30 (0,18-0,79)*	0,22 (0,19-0,31)
Индукцированная хемилюминесценция						
Tmax, сек	671 (495-1008)	1461 (1147-1810)***	1516 (1130-1836)***	96 (49-230)	1036 (445-3745)***	764 (287-1201)*
Imax, о.е.×10 ³	4,58 (2,31-6,32)	12,30 (4,31-20,84)**	8,99 (3,33-21,71)	0,08 (0,07-0,08)	0,13 (0,08-0,43)**	0,08 (0,07-0,12) †
S, о.е.×сек×10 ⁶	8,68 (5,07-13,79)	38,09 (14,12-60,25)***	29,94 (10,52-68,92)*	0,27 (0,18-0,29)	0,41 (0,25-1,11)*	0,23 (0,20-0,29)†
Синд/Спонт	2,29 (1,35-2,98)	3,25 (1,16-4,34)	2,63 (0,95-3,74)	1,03 (0,95-1,66)	1,06 (0,89-1,28)	0,96 (0,91-1,15)
Данные представлены в виде Me (25%-75%)						
*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 по сравнению с контролем, †p<0,05 по сравнению с группой чАСК						
ИБС – ишемическая болезнь сердца, АСК – ацетилсалициловая кислота, чАСК – чувствительность к АСК, рАСК – резистентность к АСК, Tmax – время выхода на максимум интенсивности хемилюминесценции, Imax – максимальное значение интенсивности хемилюминесценции, S – площадь под кривой хемилюминесценции, Синд – площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции, Спонт – площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции, о.е. – относительные единицы						

Table 2. Chemiluminescent activity of neutrophils and platelets in patients with coronary artery disease on the first day after coronary artery bypass grafting

Таблица 2. Хемилюминесцентная активность нейтрофилов и тромбоцитов у пациентов с ИБС в первые сутки после АКШ

Параметр	Нейтрофилы			Тромбоциты		
	Контроль (n=30)	чАСК (n=67)	рАСК (n=28)	Контроль (n=30)	чАСК (n=67)	рАСК (n=28)
Спонтанная хемилюминесценция						
Tmax, сек.	847 (673-1356)	1327 (928-1801)*	1290 (1006-1819)	213 (80-354)	494 (255-2043)*	89 (33-203)**†
Imax, о.е.×10 ³	2,48 (0,59-3,43)	7,41 (3,35-13,11)***	3,52 (1,66-7,15)	0,08 (0,07-0,09)	0,10 (0,08-0,30)*	0,09 (0,09-0,13)
S, о.е.×сек×10 ⁶	4,34 (1,64-9,18)	24,09 (9,04-36,29)***	8,09 (3,83-17,87)†	0,23 (0,19-0,26)	0,35 (0,21-0,56)*	0,28 (0,21-0,39)
Индукцированная хемилюминесценция						
Tmax, сек	671 (495-1008)	1127 (892-1400)*	1243 (856-1317)	96 (49-230)	458 (177-985)*	269 (68-404)
Imax, о.е.×10 ³	4,58 (2,31-6,32)	17,25 (8,88-25,01)***	15,69 (9,45-23,69)*	0,08 (0,07-0,08)	0,13 (0,08-0,45)*	0,08 (0,08-0,10)
S, о.е.×сек×10 ⁶	8,68 (5,07-13,79)	46,08 (27,01-67,35)***	32,64 (21,51-66,01)*	0,27 (0,18-0,29)	0,32 (0,21-0,67)*	0,23 (0,20-0,31)
Синд/Спонт	2,29 (1,35-2,98)	2,23 (1,39-3,54)	2,93 (1,90-4,87)	1,03 (0,95-1,66)	1,03 (0,97-1,17)	0,96 (0,91-1,15)
Данные представлены в виде Me (25%-75%)						
*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 по сравнению с контролем, †p<0,05 по сравнению с группой чАСК						
ИБС – ишемическая болезнь сердца, АКШ – аорто-коронарное шунтирование, АСК – ацетилсалициловая кислота, чАСК – чувствительность к АСК, рАСК – резистентность к АСК, Tmax – время выхода на максимум интенсивности хемилюминесценции, Imax – максимальное значение интенсивности хемилюминесценции, S – площадь под кривой хемилюминесценции, Синд – площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции, Спонт – площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции, о.е. – относительные единицы						

Table 3. Chemiluminescent activity of neutrophils and platelets in patients with coronary artery disease on days 8-10 after coronary artery bypass grafting during treatment with acetylsalicylic acid

Таблица 3. Хемилюминесцентная активность нейтрофилов и тромбоцитов у пациентов с ИБС на 8-10 сут после АКШ на фоне терапии АСК

Параметр	Нейтрофилы			Тромбоциты		
	Контроль (n=30)	чАСК (n=67)	рАСК (n=28)	Контроль (n=30)	чАСК (n=67)	рАСК (n=28)
Спонтанная хемилюминесценция						
Tmax, сек.	847 (673-1356)	1331 (1147-1765)**	1412 (1158-1730)*	213 (80-354)	611 (185-2198)**	177 (75-526)
Imax, о.е.×10 ³	2,48 (0,59-3,43)	4,81 (2,47-9,78)*	3,09 (2,49-10,71)	0,08 (0,07-0,09)	0,11 (0,09-0,34)*	0,09 (0,08-0,12)
S, о.е.×сек×10 ⁶	4,34 (1,64-9,18)	13,65 (7,28-22,63)***	11,85 (8,71-31,14)*	0,23 (0,19-0,26)	0,32 (0,20-0,85)	0,30 (0,18-0,35)
Индукцированная хемилюминесценция						
Tmax, сек	671 (495-1008)	1200 (1051-1388)***	1156 (905-1377)*	96 (49-230)	1625 (161-3099)*	532 (106-1123)
Imax, о.е.×10 ³	4,58 (2,31-6,32)	9,73 (7,63-24,72)***	17,23 (6,51-22,17)**	0,08 (0,07-0,08)	0,12 (0,09-0,53)***	0,10 (0,08-0,12)
S, о.е.×сек×10 ⁶	8,68 (5,07-13,79)	33,19 (20,38-57,79)***	51,93 (18,44-110,6)**	0,27 (0,18-0,29)	0,35 (0,28-1,47)*	0,32 (0,24-0,36)
Синд/Спонт	2,29 (1,35-2,98)	1,94 (1,55-3,67)	2,18 (0,72-4,67)	1,03 (0,95-1,66)	1,10 (0,88-1,95)	1,09 (0,95-1,35)
Данные представлены в виде Me (25%-75%)						
*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 по сравнению с контролем						
ИБС – ишемическая болезнь сердца, АКШ – арто-коронарное шунтирование, АСК – ацетилсалициловая кислота, чАСК – чувствительность к АСК, рАСК – резистентность к АСК, Tmax – время выхода на максимум интенсивности хемилюминесценции, Imax – максимальное значение интенсивности хемилюминесценции, S – площадь под кривой хемилюминесценции, Синд – площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции, Спонт – площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции, о.е. – относительные единицы						

На 8-10 сут после АКШ у чАСК пациентов с ИБС сохраняется высокий уровень ХЛ активности нейтрофилов и тромбоцитов по сравнению с контрольными значениями (табл. 3), при этом выявляется снижение по сравнению с исходным уровнем Tmax индуцированной ХЛ нейтрофилов (p=0,021). Большинство показателей спонтанной и зимозан-индуцированной ХЛ нейтрофилов у рАСК пациентов с ИБС также повышены по сравнению с контрольными значениями, в то же время все показатели ХЛ активности тромбоцитов соответствуют контрольному диапазону.

Только у рАСК пациентов с ИБС выявлена корреляция между показателями ХЛ активности нейтрофилов и тромбоцитов. Так, на 1-е сут после АКШ обнаружена положительная взаимосвязь Imax индуцированной ХЛ (r=0,83, p=0,010). На 8-10 сут после АКШ выявляются отрицательные взаимосвязи Tmax спонтанной ХЛ (r=-0,75, p=0,019) и площадью под кривой индуцированной ХЛ (r=-0,70, p=0,036).

Обсуждение

Механизмы резистентности тромбоцитов к АСК на сегодняшний день до конца не изучены. В качестве основных причин определяются нарушения в метаболизме арахидоновой кислоты (АК), связанные с активностью циклооксигеназы (СОХ) [19,20]. Причем,

нарушения обмена АК в тромбоцитах развиваются на фоне активации воспалительных процессов, что реализуется высвобождением АДФ и повышением содержания фактора Виллебранда за счет повреждения клеток эндотелия. В свою очередь, сами процессы воспаления развиваются с участием нейтрофилов и тромбоцитов, функциональное и метаболическое состояние которых, в том числе, может зависеть и от чувствительности/резистентности к АСК.

Супероксид-радикал синтезируется NADPH-оксидазой (NOX) при функциональной активации нейтрофилов в процессе фагоцитоза или внешнего киллинга [10,11,15]. Для нейтрофилов и тромбоцитов NOX является ферментом, локализующимся в цитоплазматической мембране, а у тромбоцитов за счет синтеза супероксид-радикала принимает участие в регуляторных и функциональных процессах [10,11]. У пациентов с ИБС в течение всего наблюдаемого периода выявляется повышенный уровень синтеза супероксид-радикала нейтрофилами, что, однако, имеет особенности в зависимости от чувствительности/резистентности тромбоцитов к АСК. Так, у чАСК пациентов повышенный уровень синтеза супероксид-радикалов нейтрофилами регистрируется как до операции АКШ, так и в течение всего послеоперационного периода. У рАСК пациентов до операции АКШ также наблюдается

высокий уровень синтеза супероксид-радикала нейтрофилами, однако $I_{\max}$ спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции соответствует контрольному диапазону. Подобное состояние ХЛ показателей позволяет констатировать наличие кинетических особенностей активации NOX, при которых общий высокий уровень синтеза супероксид-радикала сопровождается постепенным подъемом и медленным спадом, не достигая высоких значений. Данный феномен развивается при изменении физико-химических характеристик клеточной мембраны и замедлении механизмов проведения функционально-регуляторных сигналов в клетке [14, 15]. Кроме того, у рАСК пациентов с ИБС на 1-е сут после АКШ наблюдается снижение спонтанной ХЛ нейтрофилов до контрольного уровня, но при сохранении высоких значений индуцированной ХЛ, что характеризует активированное состояние нейтрофилов, которое проявляется только при дополнительной индукции дыхательного взрыва. На 8-10 сут после АКШ уровень спонтанного и индуцированного синтеза супероксид-радикала нейтрофилами крови у рАСК пациентов снова высокий, и соответствует значениям, выявленным у ЧАСК пациентов.

В то же время уровень синтеза супероксид-радикала тромбоцитами у пациентов с ИБС значительно различается в зависимости от их чувствительности к АСК. У ЧАСК пациентов с ИБС до и после операции АКШ выявляется высокий уровень спонтанного и АДФ-индуцированного синтеза супероксид-радикала, тогда как у рАСК пациентов в течение всего наблюдаемого периода уровень синтеза супероксид-радикала тромбоцитами соответствует контрольному диапазону. Активность NOX связывают с агрегационной способностью тромбоцитов, причем, данная взаимосвязь наиболее тесно выражена при атеросклероз-ассоциированных заболеваниях [21]. Следовательно, высокая активность NOX, характеризуя повышенный уровень агрегационной способности тромбоцитов, определяет чувствительность к АСК. Низкая активность NOX, соответственно, с пониженным уровнем агрегационной способности, определяет резистентность тромбоцитов к АСК. Данный феномен может определяться за счет выраженных метаболических и регуляторных взаимосвязей NOX и COX, так как продукты обоих ферментов, в конечном счете, стимулируют провоспалительные реакции [19, 20, 22].

Взаимосвязь между активностью NOX нейтрофилов и тромбоцитов выявляется только у рАСК пациентов ИБС и только после АКШ. Причем, на 1-е сут после АКШ наблюдается сопоставленное изменение в уровнях синтеза супероксид-радикала (положительная взаимосвязь по $I_{\max}$), но при разнонаправленном изменении времени активации NOX (отрицательная корреляция по $T_{\max}$). На 8-10 сут после АКШ установлена

обратная зависимость в уровнях синтеза первичной АФК нейтрофилами и тромбоцитами (по площади под ХЛ кривой). Подобная динамика, по-видимому, определяется, в первую очередь, ХЛ активностью нейтрофилов, и связана с изменением активности NOX в послеоперационном периоде. Отмечено, что уровень синтеза АФК в нейтрофилах может зависеть от их взаимодействия с тромбоцитами через рецепторы фибриногена и CD62P, причем, экспрессия рецепторов и формирование нейтрофильно-тромбоцитарных комплексов может приводить как к активации синтеза АФК, так и к его ингибированию [23].

Заключение

Таким образом, у пациентов с ИБС в зависимости от чувствительности тромбоцитов к АСК выявляются характерные особенности в уровнях синтеза супероксид-радикала нейтрофилами и тромбоцитами до и после АКШ. У ЧАСК пациентов с ИБС до и после АКШ выявляется высокий уровень синтеза супероксид-радикала нейтрофилами и тромбоцитами. Так как синтез супероксид-радикала в клетках осуществляется NOX, можно предположить, что ее высокая активность (и, соответственно, повышенный синтез супероксид-радикала) за счет метаболических и регуляторных взаимосвязей с COX в нейтрофилах и тромбоцитах стимулирует провоспалительные процессы при ИБС и определяет чувствительность тромбоцитов к АСК. У рАСК пациентов с ИБС в тромбоцитах активность NOX соответствует контрольному диапазону, что через регуляторно-метаболические взаимосвязи с COX опосредует резистентность тромбоцитов к АСК. В то же время взаимосвязь между уровнями синтеза супероксид-радикала нейтрофилами и тромбоцитами обнаружена только у рАСК пациентов ИБС и только после АКШ. Причем, в зависимости от активности NOX в нейтрофилах выявленные взаимосвязи меняются, что, по-видимому, также опосредуется механизмами нейтрофильно-тромбоцитарного взаимодействия. В дальнейшем представляется перспективным изучение механизмов нейтрофильно-тромбоцитарной кооперации на основе их регуляторно-рецепторного взаимодействия у пациентов с разным ответом на АСК, что дает надежду на разработку эффективных подходов к контролю агрегационной активности тромбоцитов и состоянию воспалительных процессов при ИБС, в том числе, после реваскуляризации.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта № 18-415-243003 «Персонализация антитромбоцитарной терапии пациентов

с ишемической болезнью сердца (ИБС) в зависимости от уровня экспрессии гена Р-селектина, выраженности межклеточного взаимодействия и воспаления».

Отношения и Деятельность: нет.
Relationships and Activities: none.

References / Литература

1. Patrono C., Bachmann F., Baigent C., et al. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European society of cardiology. Eur Heart J. 2004;25(2):166-81. DOI:10.1016/j.ehj.2003.10.013.
2. Puchinyan N.F., Furman N.V., Kiselev A.R., Dovgalevsky Y.P. Risk of repeated thrombotic events in patients survived acute coronary syndrome and having laboratory proven resistance to acetylsalicylic acid. Rational Pharmacotherapy in Cardiology. 2009;5(6):41-6 (In Russ.) [Пучиньян Н.Ф., Фурман Н.В., Киселев А.Р., Довгалецкий Я.П. Риск повторных тромботических событий у пациентов с лабораторно определяемой резистентностью к ацетилсалициловой кислоте, перенесших острый коронарный синдром. Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. 2009;5(6):41-6]. DOI:10.20996/1819-6446-2009-5-6-41-46.
3. Aynetdinova D.H., Udovichenko A.E., Sulimov V.A. Resistance to antiplatelet drugs in patients with ischemic heart disease. Rational Pharmacotherapy in Cardiology. 2007;3(3):52-9 (In Russ.) [Айнетдинова Д.Х., Удовиченко А.Е., Сулимов В.А. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам у больных ишемической болезнью сердца. Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. 2007;3(3):52-9]. DOI:10.20996/1819-6446-2007-3-3-52-59.
4. Grinshtein Y.I., Kosinova A.A., Grinshtein I.Y. Antiplatelet therapy control: credibility gap or search for new decisions? Rational Pharmacotherapy in Cardiology. 2013;9(6):682-9 (In Russ.) [Гринштейн Ю.И., Косинова А.А., Гринштейн И.Ю. Контроль антитромбоцитарной терапии: кризис доверия или поиск новых решений? Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2013;9(6):682-9]. DOI:10.20996/1819-6446-2013-9-6-682-689.
5. Golukhova E.Z., Ryabinina M.N. Current aspects of antiplatelet therapy. Kreativnaya Kardiologiya. 2013;1:46-57 (In Russ.) [Голухова Е.З., Рябинина М.Н. Современные аспекты антиагрегантной терапии. Креативная Кардиология. 2013;(1):46-57].
6. Grosser T., Fries S., Lawson J.A., et al. Drug resistance and pseudo-resistance: an unintended consequence of enteric coating aspirin. Circulation. 2013;127(3):377-85. DOI:10.1161/CIRCULATION.112.117283.
7. Ren Q., Chan K.W., Huang H., et al. Platelet-derived alpha-granules are associated with inflammation in patients with NK/T-cell lymphoma-associated hemophagocytic syndrome. Cytokine. 2020;126:154878. DOI:10.1016/j.cyt.2019.154878.
8. Teixeira C., Fernandes C.M., Leiguez E. et al. Inflammation Induced by Platelet-Activating Viperid Snake Venoms: Perspectives on Thromboinflammation. Front Immunol. 2019;10:2082. DOI:10.3389/fimmu.2019.02082.
9. Vitkovsky YA., Kuznick B.I., Solpov A.V. Pathogenetic significance of lymphocyte-to-platelet adherence. Medical Immunology (Russia). 2006;8(5-6):745-53 (In Russ.) [Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. Медицинская Иммунология. 2006;8(5-6):745-53]. DOI:10.15789/1563-0625-2006-5-6-745-753.
10. Fuentes E., Gibbins J.M., Holbrook L.M., Palomo I. NADPH oxidase 2 (NOX2): A key target of oxidative stress-mediated platelet activation and thrombosis. Trends Cardiovasc Med. 2018;28(7):429-34. DOI:10.1016/j.tcm.2018.03.001.
11. Ghasemzadeh M., Hosseini E., Roudsari Z.O., Zadkhak P. Intraplatelet reactive oxygen species (ROS) correlate with the shedding of adhesive receptors, microvesiculation and platelet adhesion to collagen during storage: Does endogenous ROS generation downregulate platelet adhesive function? Thromb Res. 2018;163:153-61. DOI:10.1016/j.thromres.2018.01.048.
12. Paul M., Hemshekar M., Kemparaju K., Girish K.S. Berberine mitigates high glucose-potentiated platelet aggregation and apoptosis by modulating aldose reductase and NADPH oxidase activity. Free Radic Biol Med. 2019;130:196-205. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.453.
13. Pinegina N.V. Leukocyte-platelet complexes in the pathogenesis of acute coronary syndrome. Part 2. Kreativnaya Kardiologiya. 2016;10(3):201-9 (In Russ.) [Пинегина Н.В. Лейкоцитарно-тромбоцитарные комплексы в патогенезе острого коронарного синдрома. Часть 2. Креативная Кардиология. 2016;10(3):201-9].
14. Savchenko A.A., Zdzitovetskii D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Chemiluminescent and enzyme activity of neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis depending on the outcome of disease. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014;69(5-6):23-8 (In Russ.) [Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилуминесцентная и ферментативная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания. Вестник РАМН. 2014;69(5-6):23-8]. DOI:10.15690/vramn.v69i5-6.1039.
15. Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Methods of estimation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. Russian Journal of Infection and Immunity. 2017;7(4):327-40 (In Russ.) [Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний. Инфекция и Иммунология. 2017;7(4):327-40]. DOI:10.15789/2220-7619-2017-4-327-340.
16. Savchenko E.A., Savchenko A.A., Gerasimchuk A.N., Grishchenko D.A. Assessment of the metabolic status of platelets in normal and coronary heart disease. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2006;5(5):33-6. (In Russ.) [Савченко Е.А., Савченко А.А., Герасимчук А.Н., Грищенко Д.А. Оценка метаболического статуса тромбоцитов в норме и при ишемической болезни сердца. Клиническая Лабораторная Диагностика. 2006;5(5):33-6].
17. Grinshtein Yu.I., Filonenko I.V., Savchenko A.A., et al. A method for the diagnosis of resistance to acetylsalicylic acid. Patent 2413953, Russian Federation. Published 03/10/2009 Bull. No 7. (In Russ.) [Гринштейн Ю.И., Филоненко И.В., Савченко А.А. и др. Способ диагностики резистентности к ацетилсалициловой кислоте. Патент 2413953, Российская Федерация. Опубликовано 10.03.2009. Бюллетень № 7].
18. Grinshtein Yu.I., Savchenko A.A., Grinshtein I.Yu., Savchenko E.A. Features of hemostasis, platelet metabolic activity and the frequency of aspirin resistance in patients with chronic heart failure after coronary artery bypass grafting. Kardiologiya. 2008;48(6):51-6 (In Russ.) [Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Гринштейн И.Ю., Савченко Е.А. Особенности гемостаза, метаболической активности тромбоцитов и частота резистентности к аспирину у больных с хронической сердечной недостаточностью после аортокоронарного шунтирования. Кардиология. 2008;48(6):51-6].
19. Finamore F., Remy J.L., Malacarne S. et al. A high glucose level is associated with decreased aspirin-mediated acetylation of platelet cyclooxygenase (COX)-1 at serine 529: A pilot study. J. Proteomics. 2019;192:258-66. DOI:10.1016/j.jpro.2018.09.007.
20. Jiang X., Liu X., Liu X., et al. Low-Dose Aspirin Treatment Attenuates Male Rat Salt-Sensitive Hypertension via Platelet Cyclooxygenase 1 and Complement Cascade Pathway. J Am Heart Assoc. 2020;9(1):e013470. DOI:10.1161/JAHA.119.013470.
21. Pastori D., Pignatelli P., Carnevale R., Violi F. Nox-2 up-regulation and platelet activation: Novel insights. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2015;120:50-5. DOI:10.1016/j.prostaglandins.2015.03.010.
22. Qin Y.Y., Li M., Feng X., et al. Combined NADPH and the NOX inhibitor apocynin provides greater anti-inflammatory and neuroprotective effects in a mouse model of stroke. Free Radic Biol Med. 2017;104:333-45. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.034.
23. Lösche W., Temmler U., Redlich H., et al. Inhibition of leukocyte chemiluminescence by platelets: role of platelet-bound fibrinogen. Platelets. 2001;12(1):15-9. DOI:10.1080/0953710020031171.

About the Authors / Сведения об авторах:

Гончаров Максим Дмитриевич [Maxim D. Goncharov]
eLibrary SPIN: 2544-5109. ORCID: 0000-0001-5583-7412
Савченко Андрей Анатольевич [Andrei A. Savchenko]
eLibrary SPIN: 3132-8260. ORCID: 0000-0001-5829-672x
Гринштейн Юрий Исаевич [Yury I. Grinshtein]
eLibrary SPIN: 1219-3804. ORCID: 0000-0002-4621-1618

Гвоздев Иван Игоревич [Ivan I. Gvozdev]
eLibrary SPIN: 6203-4651. ORCID: 0000-0002-1041-9871
Косинова Александра Александровна [Aleksandra A. Kosinova]
eLibrary SPIN: 2108-0220. ORCID: 0000-0002-7412-2516
Монгуш Таира Семеновна [Tayra S. Mongush]
eLibrary SPIN: 3095-1506. ORCID: 0000-0003-4530-8730