

© Коллектив авторов, 2017

УДК 616.831-005.4 — 036.12:616.155.29:612.435.451

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

Взаимодействие адреналина и АДФ в регуляции функциональной активности тромбоцитов при хронической ишемии мозга

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, 83003, г. Донецк, проспект Ильича, д. 16

Цель — установление роли АДФ в модуляции агрегации тромбоцитов индуцированной адреналином у пациентов с хронической ишемией головного мозга (ХИМ). **Методика.** Использована обогащенная тромбоцитами плазма, которую получали путем центрифугирования из периферической крови 55 пациентов с диагнозом ХИМ 1—2 стадии. Исследование агрегации тромбоцитов (АТц) проведено на агрегометре фирмы Chrono — Log (США). Для стимуляции тромбоцитов использовали адреналин и АДФ в эффективной концентрации (EC₅₀). **Результаты.** У 35 пациентов (1-я группа) при гиперреактивности тромбоцитов на АДФ (EC₅₀) реакция тромбоцитов на адреналин была гетерогенной: в 17 случаях (48,6%) регистрировался высокий ответ (более 50%) и в 18 случаях (51,4%) низкий ответ тромбоцитов на адреналин. У 20 пациентов (2-я группа) выявлена гипореактивность тромбоцитов при стимуляции обоими агонистами. Установлено, что низкий исходный ответ тромбоцитов на адреналин *in vitro* — может быть следствием сниженной секреции АДФ, т.е. лимитированной адаптационной реакции, поскольку введение субпороговой дозы АДФ обеспечивает повышение адренореактивности тромбоцитов. Если патохимические нарушения, лежащие в основе формирования дизадаптации тромбоцитов, являются обратимыми, то возможно восстановление реакции тромбоцитов на адреналин. **Заключение.** При снижении функционального ответа тромбоцитов на адреналин ключевым вопросом является установление обратимости нарушений адаптационной реакции тромбоцитов.

Ключевые слова: хроническая ишемия головного мозга, агрегация тромбоцитов, адреналин, АДФ.

Для цитирования: Баринов Э.Ф., Мамедалиева С.А., Твердохлеб Т.А., Балыкина А.О. Взаимодействие адреналина и АДФ в регуляции функциональной активности тромбоцитов при хронической ишемии мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 51—55. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.51-55

Для корреспонденции: Баринов Эдуард Федорович, доктор мед. наук., проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ДонНМУ, e-mail: barinov.ef@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.07.2015

Barinov E.F., Mamedaliyeva S.A., Tverdokhleb T.A., Balykina A.O.

Interaction of epinephrine and ADP in regulation of platelet function in chronic cerebral ischemia

Donetsk National Medical University named after M. Gorky, 16 pr. Ilich, Donetsk, 83003.

The purpose is devoted to test of hypothesis that patients with chronic cerebral ischemia (CCI) have decreased secretion of platelet ADP as the reason of platelet aggregation restriction in response to stimulation of adrenaline. **Methods.** We used platelet-rich plasma which was separated by centrifugation from peripheral blood of 55 patients with a diagnosis of CCI of stage 1—2. Platelets aggregation was studied on aggregometer Chrono — Log (USA). ADP and Epinephrine were used for platelet stimulation at effective concentration (EC₅₀). Modulatory role of ADP subthreshold doses (0.5 μM) in platelet activation was analyzed with its addition to a suspension of platelets stimulated by agonists (EC₅₀). **Results.** In 35 patients (group 1) with platelet hyperreactivity to ADP (EC₅₀) response of platelets to Epinephrine was heterogeneous: in 17 cases (48.6%) there was high response (50%) and in 18 cases (51.4%) there was low platelet response to Epinephrine. 20 patients (group 2) had hyporesponsiveness of platelets upon stimulation by both agonists. It was established that the low initial response of platelets to Epinephrine *in vitro* might be due to reduced secretion of ADP, i.e. limited adaptive response since administration of ADP subthreshold doses enhances adrenoactivity of platelets. If pathochemical violations underlying the formation of platelet disadaptation are reversible, it is possible to recover the reaction of platelets to Epinephrine. **Conclusion.** In reducing the functional response of platelets to Epinephrine key issue is establishing the reversibility of violations of platelets adaptive response of platelets.

Keywords: chronic cerebral ischemia, platelet aggregation, Epinephrine, ADP.

For citation: Barinov E.F., Mamedaliyeva S.A., Tverdokhleba T.A., Balykina A.O. Interaction of epinephrine and ADP in regulation of platelet function in chronic cerebral ischemia *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (2): 51–55. (in Russ). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.51-55

For correspondence: Eduard F. Barinov, MD, Professor, Head of the Department Histology, Cytology and Embryology Donetsk National Medical University named after M. Gorky, 16 pr. Ilichea, Donetsk, 83003

Information about authors: Eduard Barinov: <http://orcid.org/0000-0002-8070-2242>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 12.07.2015

Введение

Ведущее место в структуре цереброваскулярных заболеваний занимает хроническая ишемия головного мозга (ХИМ) [1]. Основными факторами риска возникновения и прогрессирования ХИМ являются артериальная гипертензия, атеротромботические изменения сосудов, соматические нарушения, в т.ч. кардиальная патология. В настоящее время все большее внимание уделяется изучению тромбоцитов (Тц), учитывая: необходимость контроля за эффективностью антиагрегантной терапии [2]. Успешное применение двойной антитромбоцитарной терапии, направленной на ингибирование активности циклооксигеназы (ЦОГ-1) и блокаду пуриновых рецепторов, скорее свидетельствует о понимании механизмов тромбогенеза, чем механизмов, обеспечивающих индукцию и поддержание повышенной функциональной активности тромбоцитов. В этой связи имеет смысл вернуться к анализу секреции АДФ из α -гранул, поскольку этот аутокринный механизм стимуляции тромбоцитов можно рассматривать как адаптационную реакцию. Биологический смысл существования такой защитной реакции заключается в возможности амплификации внешнего слабого сигнала. По сути, АДФ секретируемый из Тц усиливает эффект первичной стимуляции агонистом и может инициировать тромбогенез. Можно предположить и обратное. В случае снижения секреции АДФ будет ограничиваться агрегация тромбоцитов в ответ на их стимуляцию экзогенным агонистом. Если данная гипотеза будет подтверждена, то при низкой функциональной активности Тц можно воспроизвести амплификацию экзогенного сигнала путем повышения в них концентрации АДФ. Исследования в данном направлении позволяют приблизиться к пониманию механизмов повышения/восстановления функциональной активности тромбоцитов при патологии сердечно-сосудистой системы, сопровождающейся вариабельностью уровня катехоламинов в циркулирующей крови.

Цель исследования — установление роли АДФ в модуляции агрегации тромбоцитов индуцированной Адреналином у пациентов с хронической ишемией головного мозга.

Методика

В исследование включены 55 пациентов с диагнозом хронической ишемии головного мозга 1—2-й стадии, из них — 25 мужчин и 30 женщин, в возрасте от 40 до 76 лет. Анализ функционального состояния тромбоцитов проводили *in vitro* на момент госпитализации пациентов до начала консервативной терапии. В исследование не включались пациенты, которые принимали антиагрегантные препараты и блокаторы α -адренорецепторов менее чем за 1 нед. до обследования. Из периферической крови путем центрифугирования выделяли обогащенную тромбоцитами плазму. В пробе содержание тромбоцитов в 1 мкл составляло $200\,000 \pm 20\,000$. Для стимуляции тромбоцитов использовали Адреналин и АДФ (Sigma, США) в эффективной концентрации (EC₅₀) — 5 мкМ, вызывающей у здоровых лиц (10 доноров) агрегацию тромбоцитов (АТц) на уровне $50 \pm 5\%$. Параллельно установили и субпороговую дозу АДФ — 0,5 мкМ, которая вызывала агрегацию тромбоцитов у здоровых лиц на уровне $9,0 \pm 1,2\%$. Модулирующую роль субпороговой дозы АДФ в активации тромбоцитов анализировали при ее добавлении в суспензию тромбоцитов стимулированных агонистами (EC₅₀). Исследование АТц проводили на агрегометре фирмы Chrono-Log (США). Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета Med Stat.

Результаты и обсуждение

Первоначально следует ответить на вопрос — отличается ли реакция тромбоцитов на АДФ и Адреналин?

Установлено, что АДФ в концентрации EC₅₀ вызывал более высокую агрегацию тромбоцитов, чем Адреналин (соответственно $57,0 \pm 4,2\%$, и $22,0 \pm 4,3\%$; межгрупповая разница $p < 0,001$). Наличие связи между индукцией агрегации тромбоцитов обоими агонистами (показатель ранговой корреляции Спирмена $R = 0.713$; $p < 0,01$) объясняется общим механизмом амплификации сигнала — секрецией эндогенного АДФ из α -гранул. Привлечение спектрального анализа частоты встречаемости признака показа-

ло, что агрегация тромбоцитов в ответ на введение АДФ (ЕС₅₀) представлена двумя выборками показателей: 1-я группа — АТ_ц 50% и выше, и 2-я группа — АТ_ц ниже 50%. В каждой из этих групп определили количество случаев, когда АТ_ц-индуцированная Адреналином была больше и меньше 50%. Такой подход позволяет сопоставить альтернативную реакцию тромбоцитов на Адреналин в зависимости от выраженности реакции тромбоцитов на АДФ. Оказалось, что в 1-й группе (35 случаев) когда АДФ-индуцированная АТ_ц (ЕС₅₀) была выше 50% — в 17 случаях (подгруппа А, 48,6%) ответ тромбоцитов на Адреналин (ЕС₅₀) также был выше 50% и в 18 случаях (подгруппа Б, 51,4%) ответ тромбоцитов на Адреналин (ЕС₅₀) был ниже 50%.

В подгруппе А реакция тромбоцитов на АДФ и Адреналин укладывается в картину гиперреактивности в отношении двух и более агонистов. Подтверждением этого феномена могут быть данные АТ_ц представленные в I-м квартиле: для АДФ — 60% и более, для Адреналина — 55% и выше. АДФ-индуцированная АТ_ц ($66,0 \pm 4,7\%$) статистически значимо выше, чем АТ_ц стимулированная Адреналином ($57,0 \pm 4,4\%$; $p < 0,05$). В подгруппе Б реакция тромбоцитов на оба агониста отличалась полярностью ответов. Введение в суспензию тромбоцитов АДФ сопровождалось гиперреактивностью сопоставимой с подгруппой А ($61,0 \pm 3,8\%$). АТ_ц-индуцированная Адреналином была ниже реакции тромбоцитов на АДФ ($20,0 \pm 4,1\%$; $p < 0,05$), причем в I-м и III-м квартилях АТ_ц находилась в диапазоне 13% — 33%, т.е. имела место выраженная гипореактивность. Отсутствие статистически значимой корреляционной связи между АТ_ц стимулированной АДФ и Адреналином ($R_0 = -0,017$; $p > 0,05$) свидетельствует, что причины выявленных различий следует искать на «входе» в систему регуляции функции тромбоцитов. В частности, это может быть — низкая чувствительность α_2 -адренорецепторов, но не «поломка» сигнальной системы обеспечивающей секрецию АДФ из α -гранул. В противном случае альтерация сигнальной системы связанной с Gi-белком сопровождалась бы низким ответом тромбоцитов на АДФ [3].

Во 2-й группе (20 случаев), для которой характерна АДФ-индуцированная АТ_ц (ЕС₅₀) меньше 50%, во всех исследованиях (100%) ответ тромбоцитов на Адреналин (ЕС₅₀) также был ниже 50%. Обращает на себя внимание, что АДФ-индуцированная АТ_ц ($26,5 \pm 3,7\%$) находилась в диапазоне от 13% до 40%, тогда как стимуляция тромбоцитов Адреналином ($5,5 \pm 3,9\%$) воспроизводилась в диапазоне от 2% до 20%. Существующая корреляционная связь ($R_0 = 0,765$; $p < 0,01$) подтверждает взаимосвязь гипореактивности в отношении двух агонистов,

один из которых — АДФ. Возникает резонный вопрос, что общего в механизмах реализации ответа тромбоцитов (АТ_ц) на Адреналин и АДФ? Ключевым моментом может быть адаптационная реакция, обеспечивающая модуляцию экзогенного сигнала (агониста), которая основана на секреции биологически активных веществ, в том числе эндогенного АДФ из α -гранул. В качестве аргументов можно принять — что такая адаптационная реакция тромбоцита (а) связана с воздействием внешних сигналов агонистов, напряжением сдвига потока крови и т.д.; (б) в основе ее реализации лежат индивидуальные морфологические и биохимические особенности (наличие органелл; архитектура цитоскелета; содержание гранул и экспрессия белков обеспечивающих процесс причаливания и секреции гранул; активность окислительного фосфорилирования и анаэробного гликолиза и т.д.); (в) позволяет достигнуть оптимального (нового стационарного) функционального состояния тромбоцита направленного на поддержание локального гомеостаза (индукция и лимитирование тромбогенеза, инициации воспаления, репарации в стенке сосуда и окружающих его тканях) [4].

Действительно, результат стимуляции тромбоцитов Адреналином, будет складываться из первичной волны агрегатограммы связанной с повышением уровня Ca^{+2} (т.е. прямым эффектом Адреналина) и вторичной волны обусловленной активацией пуриновых рецепторов посредством связывания секретиремого АДФ [5]. Очевидно, что в случае нарушения (снижения/повышения) чувствительности α_2 -адренорецепторов — стимуляция тромбоцитов изменяется, при этом может изменяться и адаптационная реакция. Следуя этой логике, можно предположить, что повышение адаптационной реакции (в частности, синтез пуриновых нуклеотидов и секреция АДФ) должно предшествовать усилению/восстановлению реактивности тромбоцитов на стимулирующий агонист. А значит, если смоделировать повышение адаптационной реакции Т_ц (повысить концентрацию АДФ) при низкой реактивности Т_ц на Адреналин, то можно ожидать усиления их адренореактивности. Для проверки данной гипотезы можно воспользоваться добавлением субпороговой дозы АДФ (0,5 мкМ) в суспензию тромбоцитов стимулированных Адреналином (ЕС₅₀).

В анализ включены по 14 исследований с исходной гипoadренореактивностью тромбоцитов в подгруппах А и Б (таблица). В подгруппе А, где, как уже отмечалось, воспроизводилась высокая АДФ-индуцированная АТ_ц, субпороговая доза АДФ (0,5 мкМ) воспроизводила АТ_ц на уровне $11,36 \pm 0,74\%$ (для сравнения в контроле $10,1 \pm 1,5\%$). При инкубации тромбоцитов с АДФ

Таблица

Параметры индуцированной агрегации при гипoadренореактивности тромбоцитов

Условия инкубации тромбоцитов	Подгруппа А	Подгруппа Б
Адреналин (EC ₅₀ —5 мкМ)	18,0 ± 2,7 (95% ДИ 13-22%)	13,5 ± 4,6 (95% ДИ 4-20%)
АДФ (EC ₅₀ —5 мкМ)	61,0 ± 4,48 (95% ДИ 57-66%)	29,0 ± 4,3*** (95% ДИ 13-39%)
АДФ (0,5 мкМ)	11,36 ± 0,74 (95% ДИ 9,7- 13%)	6,50 ± 0,48*** (95% ДИ 5,5-7,5%)
Адреналин (5 мкМ) + АДФ (0,5 мкМ)	31,8 ± 2,1 (95% ДИ 27,3-36,3%)	20,5 ± 3,6* (95% ДИ 17-26%)
АДФ (5 мкМ) + АДФ (0,5 мкМ)	61,5 ± 4,2 (95% ДИ 57-66%)	37,3 ± 2,8*** (95% ДИ 31,3-43,3%)
Примечание. * — статистическая значимость отличий от значений в подгруппе А на уровне p<0,05; *** — p<0,001		

в концентрации EC₅₀, дополнительное введение субпороговой дозы АДФ не сопровождалось изменением АТ_ц, что подтверждает оптимальный уровень секреции АДФ, а в сущности адаптационной реакции тромбоцитов. Повышение АТ_ц при инкубации с Адреналином (EC₅₀) и субпороговой дозой АДФ на 76,6% (p<0,001 по сравнению со значениями только Адреналина (EC₅₀), вероятно, связано с эффектом суммации сигналов активирующих внутриклеточные каскады Gi-ассоциированной сигнальной системы [6].

Подгруппа Б характеризуется низким функциональным ответом тромбоцитов на EC₅₀ Адреналина и АДФ, т.е. имеет место гипореактивность тромбоцитов по отношению к двум агонистам. По сути, это может отражать снижение функционирования сигнальных систем пуриновых рецепторов ассоциированных с Gi- и Gq-белками, и быть основой ограничения адаптационной реакции в подгруппе Б. В этом случае, можно ожидать восстановления реакции тромбоцитов на Адреналин при повышении концентрации АДФ. Обращает на себя внимание, что субпороговая доза АДФ воспроизводила в подгруппе Б агрегацию значительно ниже, чем в контроле и подгруппе А. При инкубации тромбоцитов с Адреналином и субпороговой дозой АДФ агрегация повысилась на 51,8% (p<0,001 по сравнению с таковой при стимуляции одним Адреналином), а прирост АТ_ц в случае воздействия АДФ (EC₅₀) и субпороговой дозы АДФ составила 29,6% (p<0,05 относительно исходного уровня АТ_ц, т.е. без добавления субпороговой дозы АДФ).

Полученные результаты порождают новый вопрос. Почему эффект субпороговой дозы АДФ сильнее проявляется в случае стимуляции тромбоцитов Адреналином, а не АДФ? Если при введении субпороговой дозы АДФ моделируется одинаковая адаптационная реакция, то и прирост АТ_ц на EC₅₀ обоих агонистов должен быть примерно одинаковым. Однако такой результат не выявляется ни в подгруппе Б, ни в подгруппе А. Очевидно, что разница в ответе на агонисты может быть только в случае, если имеются

различия в функционировании соответствующих сигнальных систем. Можно предположить, что имеется исходная низкая чувствительность пуриновых рецепторов и α₂-адренорецепторов, тогда (а) субпороговая доза АДФ повышает секрецию эндогенного адреналина, что и активирует α₂-адренорецепторы; или (б) поскольку чувствительность α₂-адренорецепторов больше чувствительности пуриновых рецепторов, то субпороговая доза АДФ может усиливать сигнал Адреналина вследствие суммации эффектов двух агонистов. Подтверждением низкой чувствительности пуриновых рецепторов может быть факт, что АДФ-индуцированная АТ_ц не восстанавливается до уровня нормореактивности (50%) при дополнительном введении субпороговой дозы АДФ.

Тем не менее, можно констатировать, что низкий исходный ответ тромбоцитов на Адреналин — может быть следствием сниженной секреции АДФ, т.е. лимитированной адаптационной реакции, поскольку введение субпороговой дозы АДФ обеспечивает повышение адренореактивности тромбоцитов. Вероятно, если патохимические нарушения, лежащие в основе формирования дизадаптации тромбоцитов, являются обратимыми, то возможно восстановление реакции тромбоцитов на Адреналин. В этом контексте ключевым вопросом при снижении функционального ответа тромбоцитов на Адреналин является установление обратимости нарушений адаптационной реакции тромбоцитов.

References

1. Kisialiou A., Grella R., Carrizzo A., Pelone G., Bartolo M., Zucchella C., Rozza F., Grillea G., Colonnese C., Formisano L., Lembo M., Puca A.A., Vecchione C. Risk factors and acute ischemic stroke subtypes. *J Neurol Sci.* 2014; 339(1-2): 41-6. doi: 10.1016/j.jns.2014.01.014.
2. Richard S., Toussaint-Hacquard M., Fay R., Lacoour J.C., Ducrocq X., 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): 574-8. doi: 10.1159/000338291
3. Sagdilek E., Buyukcoskun N.I., Ozluk K. Evaluation of platelet function and lack of response to epinephrine in pregnant women. *Int J Lab Hematol.* 2007; 29(4): 302-9.

4. Canobbio I., Guidetti G.F., Oliviero B., Mangano D., Vara D., Torti M., Pula G. Amyloid β -peptide-dependent activation of human platelets: essential role for Ca^{2+} and ADP in aggregation and thrombus formation. *Biochem J.* 2014; 462(3): 513-23. doi: 10.1042/BJ20140307.

5. Kovacs E.G., Katona E., Bereczky Z., Homorodi N., Balogh L., Toth E., Peterfy H., Kiss R.G., Edes I., Muszbek L. Evaluation of laboratory methods routinely used to

detect the effect of aspirin against new reference methods. *Thromb Res.* 2014; 133(5): 811-6. doi: 10.1016/j.thromres.2013.10.008.

6. Alarayed N.A., Graham B.R., Prichard B.N., Smith C.C. The potentiation of adrenaline-induced in vitro platelet aggregation by ADP, collagen and serotonin and its inhibition by naftopidil and doxazosin in normal human subjects. *Br J clin Pharmac.* 1995; 39: 369-74.

Сведения об авторах:

Мамедалиева Севиндж Али, ассистент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ДонНМУ;

Твердохлеб Татьяна Александровна, аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ДонНМУ;

Балыкина Анастасия Олеговна, ассистент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ДонНМУ.