

Гончаров Максим Дмитриевич

**ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ТРОМБОЦИТАМИ
И НЕЙТРОФИЛАМИ ПРИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
К АНТИАГРЕГАНТАМ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ
БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ДО И ПОСЛЕ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ**

3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена на кафедре терапии института последипломного образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Гринштейн Юрий Исаевич

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой патологической
физиологии ФГБОУ ВО "Читинская
государственная медицинская академия"
Минздрава России

Цыбиков Намжил Нанзатович

Доктор медицинских наук, профессор
РАН, заведующая лабораторией
исследования гомеостаза ФГБНУ
"НИИ Комплексных проблем сердечно-
сосудистых заболеваний" Министерства
науки и высшего образования РФ

Груздева Ольга Викторовна

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита состоится _____ 2024 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.068.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru

Автореферат разослан _____ 2024 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают лидирующую позицию среди причин смертности как в мире в целом, так и в России в частности. Около 4/5 из них приходится на цереброваскулярные заболевания и ишемическую болезнь сердца (ИБС) [Бойцов С. А. с соавт., 2020; Hajar R. et al., 2017; Knuuti J. et al., 2020]. Предполагается, что в ближайшее десятилетие данная тенденция сохранится. Ситуацию усугубляет и тот факт, что в настоящее время наблюдается снижение возраста, в котором возникают инфаркт миокарда (ИМ) и инсульт [Benjamin E. J., 2018]. Это вызвано целым рядом факторов, которые приводят к атеросклеротическому повреждению сосудистой стенки. Такими факторами являются злоупотребление алкогольными напитками, курение табака и кальянов, стресс, плохая экология, недостаточность сна, шум, гиподинамия, неправильное нерегулярное питание и, как следствие, ожирение, высокое артериальное давление и диабет, сниженный иммунитет, что, в свою очередь, приводит к уменьшению численности трудоспособного населения [Чистик Т. В., 2016; Lechner K. et al., 2020; Duggan J. P. et al., 2022]. Этим обусловлен выбор темы данного исследования и его актуальность как в научном, так и в практическом плане.

Одним из действенных способов восстановления кровотока в артериях сердца является операция коронарного шунтирования (КШ), после которой пациенту для вторичной профилактики сердечно-сосудистых осложнений в зависимости от анамнеза и течения патологии назначаются антиагреганты (либо монотерапия ацетилсалициловой кислотой (АСК) или клопидогрелом, либо двойная антиагрегантная терапия (ДАТ) АСК и клопидогрелом или тикагрелором) [Neumann F- J. et al., 2019; Knuuti J. et al., 2020]. Однако, несмотря на применяемое лечение, после операции КШ в ряде случаев развиваются тромбозы шунтов с частотой ранней несостоятельности 4 – 20 %. Нередко выявляют бессимптомные окклюзии шунтов до выписки из стационара, а до 40 % пациентов имеют асимптомные окклюзии шунтов спустя 1 год после КШ (3,4 % пациентов – симптомные окклюзии) с уровнем смертности до 9 % [Семченко А. Н. с соавт., 2019; Tranbaugh R.F. et al., 2012].

Причиной тромбозов шунтов может быть недостаточное подавление активности тромбоцитов антиагрегантными препаратами, в том числе и АСК, которые при обычных условиях должны нивелировать риски окклюзии сосудов [Cao J. et al., 2012; Lee C. J. et al., 2017]. Низкая чувствительность к АСК при коронарной болезни сердца в одних исследованиях незначительна, в других наблюдается в 50 % случаев либо принимает промежуточные значения [Комаров А. Л. с соавт., 2015; Gong X. et al., 2017; Ebrahimi P. et al., 2020]. Такая широкая вариабельность данных связана, в первую очередь, с отсутствием единой стандартизированной методики определения чувствительности тромбоцитов к АСК и с проведением изолированных измерений, в которых учитываются разные факторы, влияющие на восприимчивость тромбоцитов к аспирину [Политидис Р.Р. с соавт., 2017]. Пролонгированный прием АСК больными с высоким риском ССЗ снижает вероятность развития ИМ и инсультов, в то время как у аспири-

резистентных пациентов возрастает риск данных событий [Patrono C. et al., 2019; Venketasubramanian N. et al., 2022].

Степень разработанности темы. Обсуждаются многочисленные клинические, клеточные, генетические причины недостаточного ответа тромбоцитов на АСК, в том числе, роль искусственного кровообращения (ИК), операционная травма, системное воспаление, сниженная биодоступность кишечнорастворимой формы АСК, назначение селективных нестероидных противовоспалительных препаратов и др. Феномен аспиринорезистентности имеет место и существенно осложняет течение сердечно-сосудистых заболеваний. Однако четкого представления о механизме этого явления и высоко достоверных способах его диагностики пока нет.

Логично, что снижение чувствительности к АСК зависит от многих факторов и процессов, связанных с внутренней средой тромбоцитов. Но так как атеросклероз, являющийся основой ИБС, сопровождается хроническим воспалением в сосудистой стенке, то в области повреждения, помимо тромбоцитов, присутствуют и клетки лейкоцитарного ряда, в частности нейтрофилы [Soehnlein O. et al., 2017; Herrero-Cervera A. et al., 2022]. Они могут взаимодействовать с тромбоцитарными пластинками, оказывая на них определенное влияние, возможно, и в контексте чувствительности к АСК.

Тромбоциты и нейтрофилы в кровотоке способны образовывать межклеточные контакты путем связывания с помощью рецепторов, либо с помощью микровезикул, передавая друг другу различные сигналы, белки, нуклеиновые кислоты и метаболиты [Витковский Ю. А. с соавт., 2006; Burnier L. et al., 2009; Kaiser R. et al., 2022]. Причем в это время происходит взаимная активация клеток, а истощение функций нейтрофилов приводит к снижению привлечения (хемотаксиса) тромбоцитов в очаг и наоборот [Lisman T., 2018]. В этом процессе также участвуют активные формы кислорода (АФК) в качестве сигнальных молекул, продукция которых нейтрофилами и тромбоцитами значимо усиливается при образовании клеточных комплексов. Кроме того, продукцию АФК любыми клетками непосредственно связывают с их функциональной активностью [Finkel T., 2011; Soehnlein O. et al., 2017]. Так, при стимуляции различными агонистами тромбоциты начинают продуцировать АФК, которые, в свою очередь, способствуют усилению агрегации. Одним из основных источников первичной АФК является НАДФН-оксидаза, повышенную активность которой связывают с высокой агрегационной способностью тромбоцитов при различных заболеваниях [Alfatni A. et al., 2020; Vara D. et al., 2021]. В литературе имеется немало данных об изменении продукции АФК клетками при различных патологиях, включая и ССЗ. Эти изменения могут быть направлены как в сторону усиления, так и в сторону ослабления продукции активных радикалов в зависимости от условий и методов исследования [Пожилова Е. В. с соавт., 2015; Komosa A. et al., 2017]. Чтобы детектировать АФК (в том числе и разделить их на первичные и вторичные формы), используют биохемилюминесцентный метод с различными усилителями сигналов (люминол и люцигенин).

Поэтому представляется чрезвычайно актуальным изучение и поиск новых методов регистрации данных свойств клеток, определения чувствительности тромбоцитов к АСК, в частности, исследование хемилюминесцентным (ХЛ) методом продукции АФК тромбоцитами и нейтрофилами у резистентных и чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом пациентов с ИБС до и после КШ.

Цель исследования – выявить особенности модулирующего влияния коронарного шунтирования и антиагрегантной терапии на продукцию активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами у пациентов с ишемической болезнью сердца, резистентных и чувствительных к ацетилсалициловой кислоте или к комбинации ацетилсалициловой кислоты с клопидогрелом.

Задачи исследования:

1. Оценить спонтанную и индуцированную продукцию первичных и вторичных активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), резистентных и чувствительных к ацетилсалициловой кислоте (АСК) или к комбинации АСК с клопидогрелом, до приема антиагрегантных препаратов и коронарного шунтирования.
2. Охарактеризовать влияние коронарного шунтирования на спонтанную и индуцированную продукцию первичных и вторичных активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами в первые сутки после операции у пациентов с ИБС, резистентных и чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом.
3. Сравнить влияние антиагрегантной терапии на спонтанную и индуцированную продукцию первичных и вторичных активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами на 8–10-е сутки после коронарного шунтирования у пациентов с ИБС, резистентных и чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом.
4. Определить взаимосвязь между показателями продукции первичных и вторичных активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами в спонтанных и индуцированных тестах, а также между агрегацией тромбоцитов с коллагеном, АДФ, адреналином и арахидоновой кислотой и продукцией ими активных форм кислорода у пациентов с ИБС, резистентных и чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом.

Научная новизна. Впервые установлена высокая продукция первичных и вторичных активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, а также у пациентов с ИБС, резистентных к комбинации АСК с клопидогрелом, по сравнению с контрольной группой.

Впервые в спонтанных и индуцированных тестах выявлены прямые взаимосвязи между показателями продукции первичных активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом. Установлено, что при монотерапии у пациентов с ИБС, резистентных к АСК, такие взаимосвязи обнаруживаются в основном в индуцированных тестах.

Впервые установлена стабильная продукция активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами у пациентов с ИБС, резистентных к антиагрегантной терапии, после коронарного шунтирования по сравнению с периодом до операции, независимо от схемы применения терапии – монотерапия АСК или двойная антиагрегантная терапия АСК и клопидогрелом.

У пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, высокая продукция преимущественно вторичных активных форм кислорода тромбоцитами соответствует низкой агрегации тромбоцитов с адреналином. В свою очередь, у пациентов с ИБС, резистентных к антиагрегантной терапии, высокая продукция первичных и вторичных активных форм кислорода тромбоцитами при двойной антиагрегантной терапии и низкая их продукция при монотерапии АСК соответствуют высокой агрегационной активности тромбоцитов с адреналином, коллагеном, АДФ и арахидоновой кислотой.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработан методический подход к оценке генерации АФК тромбоцитами с помощью ХЛ метода с определением оптимального содержания реакционной смеси. Разработан и запатентован «Способ определения чувствительности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте» у пациентов с ИБС, который позволяет определить степень чувствительности тромбоцитов к применяемым препаратам АСК. При наличии в медицинской организации биохемилюминесцентного анализатора предложено его применение в клинической практике для диагностики чувствительности тромбоцитов к АСК до начала антиагрегантной терапии, что является очень важным параметром. Вычисление площади под кривой АДФ-индуцированной хемилюминесценции тромбоцитов с люцигенином, полученной на анализаторе, позволяет распределить пациентов с ИБС на чувствительных и резистентных к АСК. Своевременная диагностика резистентности к АСК предотвратит развитие нежелательных коронарных событий у пациентов с ИБС, резистентных к препаратам.

Обозначены механизмы возможного взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов у пациентов с ИБС в зависимости от их чувствительности к АСК и антиагрегантной терапии. У чувствительных к антиагрегантной терапии пациентов предполагается налаженный межклеточный контакт изучаемых клеток, а при резистентности к антиагрегантам – нарушение взаимодействия нейтрофилов и тромбоцитов.

Показано увеличение продукции первичных АФК в спонтанном тесте и снижение образования вторичных АФК в АДФ-индуцированном тесте тромбоцитами у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, в первые сутки после КШ по сравнению с периодом до операции. Кроме того, у этих пациентов определено увеличение продукции вторичных АФК тромбоцитами на 8–10-е сутки после КШ по сравнению с периодом до операции.

Показано, что у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, вторичные АФК подавляют агрегацию тромбоцитов с адреналином, вероятно, путем активации аденилатциклазы и снижения содержания кальция в клетках. У резистентных пациентов, наоборот, высокие уровни

продукции первичных и вторичных АФК тромбоцитами при ДАТ соответствуют повышенному агрегационному потенциалу клеток в индуцированных тестах с адреналином, коллагеном, АДФ и арахидоновой кислотой, вероятно, ввиду активации фосфолипаз С и А2. При этом физиологический уровень продукции АФК тромбоцитами в условиях монотерапии АСК определяется низкой активностью аденилатциклазы. Эти данные открывают перспективные возможности для изучения новых механизмов резистентности тромбоцитов к АСК и возможности их регулирования.

Методология и методы исследования. Исследование проводилось на клинической базе ФГБОУ ВО «КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (ректор – д.м.н., профессор А. В. Протопопов), в клинко-диагностической лаборатории (заведующий – врач клинической лабораторной диагностики Д. А. Грищенко) ФГБУ ФЦССХ Минздрава России, г. Красноярск (главный врач – д.м.н., профессор В. А. Сакович), лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии (руководитель – д.м.н., профессор А. А. Савченко) НИИ медицинских проблем Севера (директор – д.м.н., профессор Э. В. Каспаров) – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

Для реализации поставленных задач были обследованы пациенты со II-III функциональным классом стенокардии напряжения согласно Канадской классификации с атеросклеротическим поражением коронарных артерий, подтвержденным коронароангиографией. Материалом исследования являлась венозная кровь, из которой выделяли тромбоциты и нейтрофилы.

В работе использовались современные методы исследования, которые позволяют решить поставленные задачи:

- Выделение тромбоцитов из цельной крови (метод поэтапного центрифугирования с буферами).
- Выделение нейтрофилов из цельной крови (в градиенте плотности фиколлюрографина с последующей очисткой от прилипающих клеток).
- Анализ агрегации тромбоцитов оптическим методом и исследование резистентности к АСК (с использованием в качестве индукторов аденозиндифосфата (АДФ), коллагена, адреналина, арахидоновой кислоты (АК)).
- Исследование продукции клетками АФК с помощью биохемилюминесцентного метода с люминолом и люцигенином в спонтанных и индуцированных тестах.
- Методы статистического анализа результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Вариабельность резистентности к ацетилсалициловой кислоте (АСК) у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) связана с операцией коронарного шунтирования и характером антиагрегантной терапии – монотерапия АСК или комбинация АСК с клопидогрелом. Низкие значения показателей АДФ-индуцированной хемилюминесценции тромбоцитов до операции коронарного шунтирования и начала приема АСК указывают на резистентность тромбоцитов к

ней после начала терапии, что связано с отсутствием резервной активности клеток при дополнительной стимуляции.

2. У пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, до и после коронарного шунтирования отмечается активация тромбоцитов и нейтрофилов, проявляющаяся высокой продукцией первичных и вторичных активных форм кислорода в спонтанных и индуцированных тестах относительно контрольной группы и группы резистентных к АСК пациентов при монотерапии. У пациентов с ИБС, резистентных к комбинации АСК с клопидогрелом, в тромбоцитах и нейтрофилах выявляется высокий уровень первичных и вторичных активных форм кислорода при замедлении их продукции в нейтрофилах в индуцированных тестах, что указывает на высокие, но инертные резервные возможности клеток.

3. У пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, высокие уровни продукции вторичных активных форм кислорода тромбоцитами соответствуют их сниженному агрегационному потенциалу. У пациентов с ИБС, резистентных к антиагрегантной терапии, при монотерапии АСК регистрируется физиологический уровень продукции первичных и вторичных активных форм кислорода тромбоцитами, а при двойной антиагрегантной терапии АСК с клопидогрелом – высокий уровень их образования, что соответствует повышенному агрегационному потенциалу тромбоцитов. Положительные взаимосвязи между показателями спонтанной и индуцированной продукции первичных активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, отражают взаимную активацию и наличие межклеточного взаимодействия при участии супероксид анион-радикала.

Внедрение результатов работы. Способ определения чувствительности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте, разработанный по результатам диссертации, внедрен на кафедре терапии ИПО и кафедре патологической физиологии имени профессора В. В. Иванова Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, а также в работу 1 кардиохирургического отделения Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии (г. Красноярск).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинико-лабораторного материала, использованием актуальных методов исследования и статистического анализа, адекватных поставленным цели и задачам. Формирование групп исследования проводили с соблюдением критериев включения/исключения пациентов с ИБС. Результаты работы были представлены и обсуждены в виде устных докладов и тезисов на следующих конференциях: Российский национальный конгресс кардиологов (Москва, сентябрь 2018 г.; Екатеринбург, сентябрь 2019 г.; Казань, сентябрь 2020 г., Казань, сентябрь 2022 г.), XXIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Лабораторная служба в современных реалиях» (Москва, март 2019 г.), VIII Съезд кардиологов Сибирского федерального округа «От первичной

профилактики до высоких технологий в кардиологии» (Кемерово, октябрь 2019), XVIII Научно-образовательная конференция с Всероссийским участием «Кардиоангиология-2020» в рамках специализированной выставки-форума «Енисей-Медика» (Красноярск, март 2020), Европейский конгресс кардиологов (ESC 2021, 27–30 августа 2021), Ежегодная Всероссийская научно-практическая конференция «Кардиология на марше 2021» и 61-я сессия ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России (7–9 сентября 2021, Москва), IX съезд кардиологов Сибирского федерального округа (финал конкурса молодых ученых, 13–14 октября 2021, Новосибирск), XX Юбилейная Всероссийская научно-образовательная конференция «Кардиоангиология – 2022» «От знаний к передовым технологиям», посвященная 80-летию КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого (18–19 марта 2022, Красноярск).

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликовано 19 научных работ (9 статей, 9 тезисов, 1 патент), из них 12 (8 статей, 4 тезиса) в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки Российской Федерации и индексируемых в Scopus и Web of Science. Зарегистрирован 1 патент РФ на изобретение «Способ определения чувствительности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте» №2699569 С1.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и 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».

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 12 рисунков. В структуру диссертации входят введение, 4 главы (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение полученных результатов), заключение, выводы, список сокращений, список литературы из 258 источников (77 отечественных и 181 зарубежных) и список иллюстративного материала.

Личный вклад автора. Разработка темы, планирование и дизайн исследования проводились при непосредственном участии автора. Автор провел и подготовил обзор, систематизацию имеющихся в литературе данных по теме исследования, получил, провел анализ, оценку и статистическую обработку данных, по результатам чего были подготовлены публикации и доклады, сформулированы выводы диссертационной работы. Оформление всей диссертации выполнено соискателем самостоятельно.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении представлена обоснованная актуальность темы диссертационной работы, определены цель, выделены основные задачи, научная новизна и гипотеза, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов.

В первой главе приведен систематизированный обзор имеющихся в литературе данных по теме диссертационного исследования, раскрыто понятие

ИБС и КШ как хирургического метода её лечения. Рассмотрено участие тромбоцитов, нейтрофилов и роль их взаимодействия в патогенезе атеросклеротического поражения сосудистой стенки при данной патологии. Проведен анализ данных по продукции тромбоцитами и нейтрофилами АФК при сердечно-сосудистых и сопутствующих им заболеваниях, а также обзор возможных известных механизмов резистентности тромбоцитов к антиагрегантным препаратам, таким как АСК и клопидогрел.

Во второй главе описаны материал и методы исследования. В основу настоящей работы положены результаты исследования лабораторных параметров крови 104 пациентов, находящихся на стационарном лечении в кардиохирургическом отделении № 1 (заведующий – к.м.н. А. В. Андин) ФГБУ ФЦССХ (г. Красноярск) Минздрава России. Включение пациентов в диссертационное исследование осуществляли при непосредственном участии врача-кардиолога Т. С. Монгуш. Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики и принципами Хельсинкской декларации. Всеми пациентами было подписано информированное согласие об участии в исследовании. Исследование было выполнено с разрешения локального этического комитета ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (Протокол № 76/2016 от 04.05.2017).

Все пациенты (79 мужчин и 25 женщин) со II-III функциональным классом стенокардии напряжения согласно Канадской классификации в возрасте от 35 до 76 лет (средний возраст $61 \pm 5,5$ года). У всех пациентов атеросклеротическое поражение коронарных артерий подтверждено коронароангиографией (таблица 1). На терапии АСК находились 64 пациента и 40 пациентов на ДАТ (АСК+клопидогрел). Всем пациентам выполнялась операция КШ. Минимум за 5 суток до КШ пациенты прекращали прием антиагрегантов. В первые сутки после операции всем пациентам назначалось 100 мг/сутки кишечнорастворимой формы АСК. В группе пациентов на ДАТ клопидогрел назначался на 2–3-и сутки после КШ в дозе 75 мг/сутки.

Критериями включения являлись стабильная стенокардия II-III функционального класса, атеросклероз коронарных артерий, подтвержденный коронароангиографией. Критериями исключения являлись почечная недостаточность (клубочковая фильтрация по клиренсу креатинина <60 мл/мин/1,73 м²), печеночная недостаточность (превышение норм активности печеночных трансаминаз в 3 и более раз), язвенная болезнь желудка и/или 12-перстной кишки в стадии обострения, аллергия на АСК, клопидогрел.

В контрольную группу были включены 32 здоровых донора КГКУЗ «Красноярский краевой центр крови № 1» (главный врач – д.м.н. Н. Г. Филина), сопоставимых по полу и возрасту, не предъявлявшие на момент обследования жалоб и не имеющие в анамнезе хронических инфекционных заболеваний.

Материалом исследования являлась венозная кровь пациентов с ИБС (взятие и исследования проводились трижды: до КШ, на первые и на 8–10-е сутки после КШ) и здоровых доноров.

Таблица 1 – Клинико-лабораторная характеристика пациентов на фоне терапии АСК и ДАТ (Ме (С25-С75))

Характеристика 1	Все пациенты с ИБС (n=104) 2	На терапии АСК (n=64) 3	На терапии ДАТ (n=40) 4	Р уровень 5
Пол, n (%) жен/муж	76,0 25/79	68,8 20/44	87,5 5/35	p=0,094
Возраст, годы	63,0 (56,0-65,0)	64,0 (59,8-67,0)	58,5 (55,5-64,5)	p=0,089
Курение, n (%)	44 (42,3)	30 (46,9)	14 (35,0)	p=0,492
Общий холестерин, ммоль/л	4,28 (3,69-5,58)	4,35 (3,69-5,42)	4,30 (3,72-5,94)	p=0,604
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,57 (6,44-8,60)	7,73 (6,56-8,60)	7,40 (6,10-8,50)	p=0,523
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	228,0 (203,0-276,0)	229,0 (206,0-265,5)	224,5 (199,0-290,5)	p=0,572
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,00 (4,70-5,30)	5,03 (4,78-5,23)	5,00 (4,69-5,26)	p=0,702
Гемоглобин, г/л	141,0 (133,0-152,3)	141,0 (133,8-150,5)	141,5 (132,8-153,0)	p=0,969
Креатинин, мкмоль/л	109,0 (97,8-119,0)	107,0 (95,8-115,3)	109,5 (99,0-121,3)	p=0,198
Стабильная стенокардия, класс II, n (%)	62 (59,6)	35 (54,7)	27 (67,5)	p=0,433
Стабильная стенокардия, класс III, n (%)	42 (40,4)	29 (45,3)	13 (32,5)	p=0,433
Сердечная недостаточность, класс II, n (%)	72 (69,2)	40 (62,5)	32 (80,0)	p=0,266
Сердечная недостаточность, класс III, n (%)	32 (30,8)	24 (37,5)	8 (20,0)	p=0,266
Гипертоническая болезнь, n (%)	104 (100)	64 (100)	40 (100)	p=1,000
Сахарный диабет, n (%)	29 (27,9)	20 (31,3)	9 (22,5)	p=0,526
Фракция выброса левого желудочка, %	53,0 (44,8-57,3)	54,0 (47,0-58,0)	52,5 (42,3-56,0)	p=0,519
Постинфарктный кардиосклероз, n (%)	66 (63,5)	35 (54,7)	31 (77,5)	p=0,064
Ожирение, n (%)	35 (33,7)	18 (28,1)	17 (42,5)	p=0,315
Время искусственного кровообращения, мин	67,0 (54,5-85,8)	67,0 (57,0-87,0)	69,0 (58,5-90,0)	p=0,237
Количество шунтов, шт	2 (2;3)	2 (1,5;3)	2 (1;3)	p=0,070
Плеврит в послеоперационном периоде, n (%)	30 (28,8)	18 (28,1)	12 (30,0)	p=0,892

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между тремя группами.

Исследование агрегации тромбоцитов с АДФ (5 мкМ), коллагеном (2 мкг/мл), адреналином (10 мкМ) и АК (0,5 мМ) проводили на оптическом агрегометре Chronolog 490 (США) согласно инструкции к реагентам CHRONO-PAR (США). Если измерение проводилось до начала терапии АСК, то агрегация тромбоцитов с АК определялась еще и после их инкубации с водным раствором АСК ($\geq 99.0\%$, A5376 Sigma Aldrich) (3,36 мМ) *in vitro* в течение 3 минут при температуре 37°C для прогнозирования аспиринорезистентности [Патент РФ № 2413953 С1]. Резистентность к АСК определялась при уровне агрегации тромбоцитов с АК $\geq 20\%$ от максимально возможной амплитуды хотя бы в одной точке наблюдения.

Для определения ХЛ активности тромбоцитов и нейтрофилов (оценка продукции АФК) их предварительно выделяли из венозной крови, смешанной с 3,2% цитратом натрия и с гепарином лития соответственно. Оценивали спонтанную и индуцированную ХЛ клеток в течение 90 минут на 36-канальном биохемилюминесцентном анализаторе БЛМ-3607 (ООО «МедБиоТех», Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум ($T_{\max}$), максимальное значение интенсивности ($I_{\max}$), а также площадь под кривой ХЛ (S). Усиление ХЛ тромбоцитов и нейтрофилов, индуцированной АДФ и зимозаном соответственно, оценивали отношением площади под кривой индуцированной ХЛ к площади под кривой спонтанной ХЛ и определяли как индекс активации (ИА).

Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007) и «Microsoft Exel» компании «Microsoft». Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с применением критерия Шапиро – Уилка для $8 \leq n \leq 50$ и с использованием критерия Колмагорова – Смирнова для $n > 50$. Описание выборок, распределение которых отличалось от нормального, производили с помощью подсчета медианы (Me) и 25 и 75 перцентилей ($C_{25} - C_{75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна – Уитни, зависимых выборок – по критерию Вилкоксона. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне $p < 0,05$. С целью выявления функциональных взаимосвязей между группами изучаемых параметров применяли корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). При сравнении клинико-анамнестических характеристик между группами пациентов использовали непараметрический критерий Краскела – Уоллиса. Для сравнения категориальных переменных использовали критерий χ^2 .

В третьей главе представлены результаты исследования распространенности явления резистентности тромбоцитов к АСК среди пациентов с ИБС, показателей ХЛ тромбоцитов и нейтрофилов у пациентов с ИБС до и после КШ, а также взаимосвязи этих соответствующих показателей между изучаемыми клетками.

В четвертой главе приведен анализ полученных результатов с рассуждениями, опирающимися на данные современной научной литературы. По результатам агрегометрии с АК пациенты были разделены на 2 группы: 71 чувствительный к АСК или АСК+клопидогрел пациент (чАСК) (68,3 %) и 33

резистентных к АСК или АСК+клопидогрел пациента (рАСК) (31,7 %) (18 на монотерапии АСК и 15 на ДАТ). Далее все рАСК были разделены на 2 группы в зависимости от применяемой терапии: монотерапия препаратами АСК (n=18) и ДАТ (n=15). Чувствительность к АСК или АСК+клопидогрел у большинства пациентов с ИБС в разные периоды наблюдения менялась. Полученные результаты согласуются с результатами некоторых работ, раскрывающих возможные клинические причины резистентности к АСК (условия искусственного кровообращения (ИК), операционная травма, почечная дисфункция, системное воспаление, сниженная биодоступность кишечнорастворимой формы АСК, дополнительное назначение других нестероидных противовоспалительных препаратов) [Запровальная О. Е. с соавт., 2012; Душпанова А. Т. с соавт., 2016; Modica A. et al., 2007]. Эти наблюдения свидетельствуют об изменении окружающей тромбоциты среды во времени при терапии и оперативных вмешательствах, что и приводит к перестройке их внутренних процессов и сказывается в ответе на действие АСК.

Для оценки продукции АФК клетками проводили ХЛ анализ с вычислением основных показателей. Во всех трех точках наблюдения было обнаружено, что у чАСК статистически значимо выше значения многих показателей ХЛ тромбоцитов и нейтрофилов по сравнению с контрольной группой. У тромбоцитов до операции КШ это ХЛ с люцигенином Tmax и Imax в спонтанном (p=0,027 и p=0,006 соответственно) и АДФ-индуцированном тесте (p=0,004 и p=0,013 соответственно) и люминолом Imax в спонтанном (p=0,01) и АДФ-индуцированном тесте (p=0,008) и S в АДФ-индуцированном тесте (p=0,041)); в первые сутки после операции КШ это ХЛ с люцигенином Tmax (p=0,008) и Imax (p=0,036) в спонтанном тесте и люминолом Imax (p=0,012) и S (p=0,043) в спонтанном тесте, Tmax (p=0,046) и Imax (p=0,011) в АДФ-индуцированном тесте; на 8–10-е сутки после операции КШ это ХЛ с люцигенином Tmax (p=0,015) и Imax (p=0,002) в спонтанном тесте, Imax (p=0,001) и S (p=0,037) в АДФ-индуцированном тесте и люминолом Imax (p=0,001) и S (p<0,001) в спонтанном тесте, Tmax (p=0,01), Imax (p<0,001) и S (p=0,038) в АДФ-индуцированном тесте). У нейтрофилов до операции КШ это ХЛ с люцигенином Tmax (p<0,001) и S (p=0,016) в зимозан-индуцированном тесте и люминолом Tmax (p=0,002) в зимозан-индуцированном тесте и ИА (p=0,044). В первые сутки после операции КШ это ХЛ с люцигенином и люминолом (Imax (p<0,05) и S (p<0,05) в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте). На 8–10-е сутки после операции КШ это ХЛ с люцигенином Imax и S в спонтанном (p=0,035 и p=0,018 соответственно) и зимозан-индуцированном тесте (p=0,027 и p=0,01 соответственно) и Tmax (p=0,011) в зимозан-индуцированном тесте и люминолом Tmax в зимозан-индуцированном тесте (p=0,009). Полученные результаты указывают на активированное базовое состояние данных клеток и их потенциальных возможностей при дополнительной стимуляции. Активация тромбоцитов при атеросклерозе приводит к выделению CD40L, связывающегося с CD40 на нейтрофилах, что вызывает образование хемоаттрактантов, дополнительно увеличивающих экспрессию рецепторов взаимодействия, экстравазацию нейтрофилов, что сказывается на повышенной продукции АФК

всеми клетками в данной группе пациентов с ИБС [Gerdes N. et al., 2016; Cognasse F. et al., 2022].

У тромбоцитов в группе чАСК по сравнению с периодом до КШ в первые сутки после КШ снизились S ($p=0,014$) в АДФ-индуцированном тесте с люминолом, T_{max} ($p=0,004$) в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином и повысилась I_{max} ($p=0,036$) в спонтанном тесте с люцигенином, а к 8–10-м суткам после операции повысились S ($p=0,041$) в спонтанном тесте с люминолом и ИА ($p=0,025$) с люцигенином, снизилось T_{max} ($p=0,046$) в спонтанном тесте с люминолом. У нейтрофилов же в первые сутки после КШ наблюдалось повышение таких показателей, как I_{max} и S в спонтанном ($p=0,01$ и $p=0,006$ соответственно) и зимозан-индуцированном ($p<0,001$ и $p<0,001$ соответственно) тесте с люминолом и I_{max} ($p=0,036$) в спонтанном тесте с люцигенином, при этом T_{max} в спонтанном ($p=0,008$) и зимозан-индуцированном ($p<0,001$) тесте снизились, а к 8–10-м суткам после операции было лишь снижение T_{max} ($p=0,026$) в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином. Контакт тромбоцитов с «неэндотелиальной» поверхностью контура аппарата ИК и с другими клетками приводит к дополнительной стимуляции, в результате чего в первые сутки после КШ они функционально и метаболически истощены в индуцированном тесте *in vitro* с люминолом (то есть сверх стимуляция не увеличивает продукцию АФК) и, наоборот, активированы в спонтанном тесте с люцигенином [Schrottmaier W.C. et al., 2020]. Однако операционная активация нейтрофилов, характеризующаяся повышенной продукцией АФК, сохраняется дольше, что видно по увеличению ХЛ нейтрофилов в первые сутки после КШ *in vitro* с угасанием до дооперационных уровней на 8–10-е сутки, тогда как на 8–10-е сутки (данный период совпадает со средней продолжительностью жизни тромбоцитов) активность тромбоцитов восстанавливается, вероятно, в результате поступления в кровоток молодых форм с высоким потенциалом, что характеризуется повышенной продукцией всех форм АФК как в спонтанном, так и в АДФ-индуцированном тесте.

В группе рАСК (монотерапия АСК) по сравнению с контрольной группой у тромбоцитов и нейтрофилов выше оказались лишь показатели T_{max} ($p<0,05$) в индуцированных тестах до КШ, что свидетельствует о замедлении процессов продукции АФК. Любые возможные дефекты в рецепторном аппарате, в передаче сигналов и метаболитов между взаимодействующими клетками, особенно при различных патологических состояниях, в том числе и ССЗ, оказывают влияние на процессы, протекающие как внутри, так и снаружи клеток. Резистентность тромбоцитов обусловлена невосприимчивостью ЦОГ-1 к действию АСК, а с другой стороны, работа ЦОГ-1 по образованию из АК тромбосана A_2 сопровождается наработкой АФК [Xiao Y. et al., 2011; Hernanz R. et al., 2014]. Сниженный уровень продукции первичных и вторичных АФК тромбоцитами и нейтрофилами у рАСК (монотерапия АСК) пациентов в сравнении с чАСК по многим показателям ХЛ ($p<0,05$) подтверждает данное предположение, так как в результате возможного нарушения связи с нейтрофилами (на уровне микровезикул или рецепторного аппарата), наработка АФК и метаболизм АК в резистентных тромбоцитах могут быть угнетены (из-за нарушения передачи АК в микровезикулах), а ЦОГ-1 как

точка приложения АСК становится неактуальной у данной категории пациентов [Свиридова С. П. с соавт., 2018]. Кроме того, практически однообразие в продукции АФК тромбоцитами и нейтрофилами на протяжении всего исследования у рАСК (монотерапия АСК) может быть связано с низкой восприимчивостью тромбоцитов не только к антиагрегантам, но и к другим факторам (в частности, стимуляции клеток внесосудистым контуром аппарата ИК и нейтрофилам, присутствующим в очаге воспаления сосудистой стенки при ИБС), в отличие от чАСК, а антиагрегантная терапия не снижает продукцию АФК по сравнению с исходным уровнем, также как у чАСК (рисунок 1).

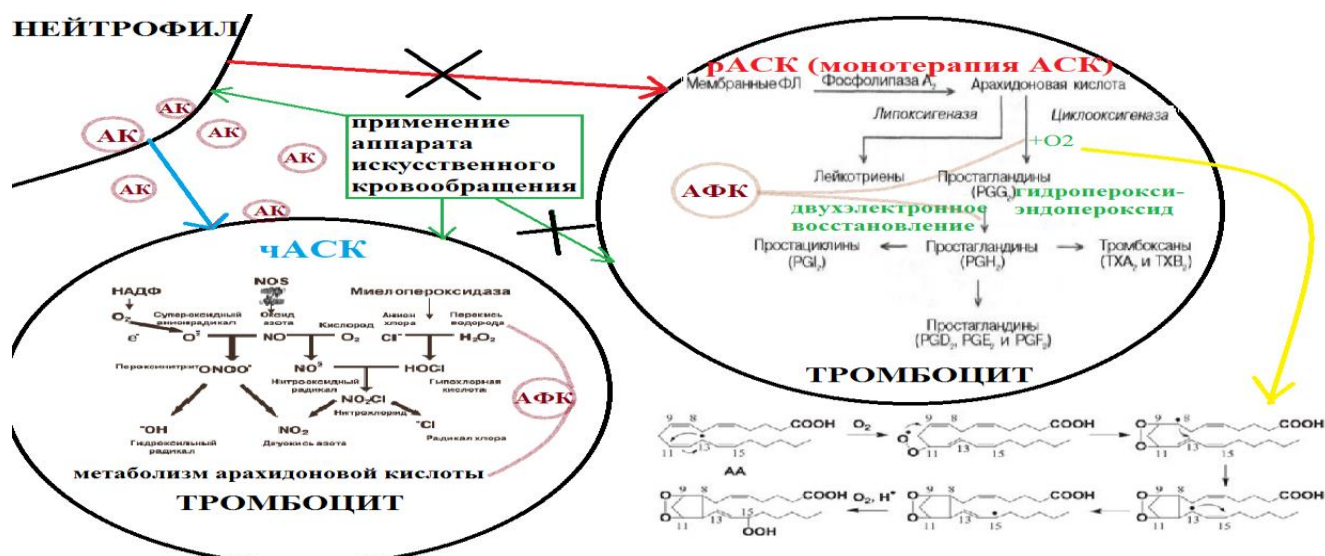


Рисунок 1. Предполагаемое взаимодействие тромбоцитов и нейтрофилов у чувствительных и резистентных к АСК и/или АСК и клопидогрелу пациентов с ИБС при терапии АСК или ДАТ

Примечание: ФЛ – фосфолипиды, NOS – NO-синтаза, PG – простагландины, TX – тромбоксаны.

В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с контрольной группой у тромбоцитов выше оказались такие показатели ХЛ: I_{max} (p=0,049) в спонтанном тесте с люцигенином и I_{max} (p=0,024) в АДФ-индуцированном тесте и S (p=0,015) в спонтанном тесте с люминолом (в первые сутки после операции КШ), I_{max} в спонтанном (p=0,035) и АДФ-индуцированном тесте (p=0,041) с люминолом (на 8–10-е сутки после операции КШ). У нейтрофилов выше оказались такие показатели ХЛ, как T_{max} (p=0,016) в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином (до КШ), I_{max} в зимозан-индуцированном тесте с люминолом (p=0,027) (в первые сутки после КШ), T_{max} в спонтанном (p=0,015) и зимозан-индуцированном (p=0,021) тесте с люминолом, а также I_{max} и S в зимозан-индуцированном тесте с люминолом (p=0,042 и p=0,036 соответственно) и люцигенином (p=0,039 и p=0,01 соответственно) (на 8–10-е сутки после КШ). У нейтрофилов в группе рАСК (ДАТ) в первые сутки после КШ снизилось T_{max} (p=0,048) в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином, а на 8–10-е сутки после операции в зимозан-индуцированном тесте с люминолом повысились такие показатели, как T_{max} (p=0,043) и I_{max} (p=0,043).

В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с группой чАСК у тромбоцитов значения показателей ИА ($p=0,006$) в тесте с люцигенином в первые сутки после операции КШ, а также Tmax ($p=0,006$) в АДФ-индуцированном тесте с люминолом и Tmax ($p=0,006$) в спонтанном тесте с люцигенином на 8–10-е сутки после операции КШ были достоверно ниже. У нейтрофилов оказалось выше лишь Tmax ($p=0,01$) в спонтанном тесте с люминолом на 8–10-е сутки после операции КШ.

В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с рАСК (монотерапия АСК) у тромбоцитов оказалось выше значение показателя S ($p=0,025$) в АДФ-индуцированном тесте с люминолом до операции КШ, а у нейтрофилов на 8–10-е сутки после КШ были выше такие показатели, как Tmax в спонтанном ($p=0,032$) и зимозан-индуцированном ($p=0,04$) тесте с люминолом, а также S ($p=0,032$) в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином. У рАСК пациентов с ИБС (вне зависимости от терапии) уровень и интенсивность продукции АФК тромбоцитами ниже, чем у чАСК [Grinshtein Yu.I. et al., 2020]. То есть чувствительность связана с повышенной метаболической активностью тромбоцитов по продукции АФК, в том числе в отношении АК. Получается, что при разделении пациентов с ИБС на группы в зависимости от антиагрегантной терапии в нашем исследовании такая картина остается явно выраженной у группы рАСК (монотерапия АСК), тогда как у рАСК (ДАТ) снижено лишь время наработки АФК и только на 8–10-е сутки после КШ относительно чАСК, что может быть связано с воздействием клопидогрела на тромбоцитарные рецепторы к АДФ. В остальном после операции КШ и на фоне приема АСК и клопидогрела тромбоциты и нейтрофилы продуцируют повышенные базовые и индуцированные уровни первичных и вторичных АФК относительно контрольных значений на уровне чАСК, что указывает на влияние данных факторов на метаболические процессы внутри тромбоцитов у пациентов с ИБС. Кроме того, тромбоциты чАСК и рАСК (ДАТ) до операции КШ продуцируют при стимуляции больше вторичных АФК, чем рАСК (монотерапия АСК). Эти данные указывают на то, что ХЛ активность тромбоцитов рАСК (ДАТ) находится на уровне чАСК пациентов с ИБС, то есть благодаря ДАТ удается преодолеть резистентность к АСК, если смотреть с позиции продукции АФК. Благодаря ДАТ блокируются сразу два пути активации тромбоцитов, но это может компенсироваться усиленным их контактом с нейтрофилами как сразу после операции, так и на фоне приема антиагрегантных препаратов посредством передачи активных веществ в микровезикулах, но не через рецептор-опосредованное образование клеточных комплексов, так как количество таких агрегатов существенно снижается вместе с провоспалительными функциями тромбоцитов на терапии АСК и клопидогрелом у пациентов с ИБС, сепсисом [Wang X. et al., 2019; Denorme F. et al., 2021] (рисунок 2).

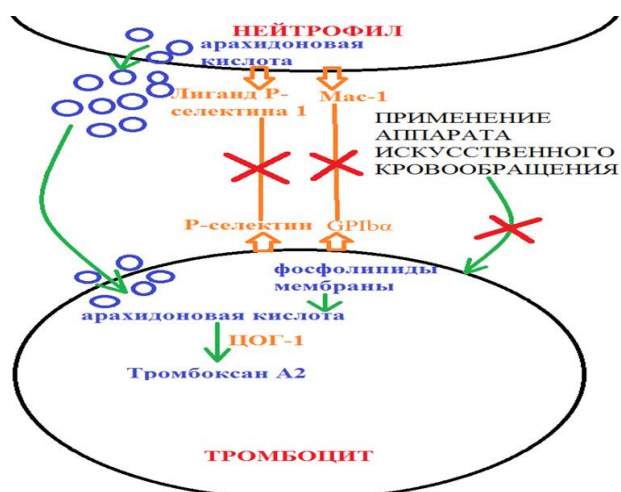


Рисунок 2. Предполагаемое взаимодействие тромбоцитов и нейтрофилов у резистентных к АСК или АСК и клопидогрелу пациентов с ИБС при терапии АСК и клопидогрелом

Примечание: GP – гликопротеин, Mac-1 – макрофагальный антиген-1.

Из-за этого может увеличиться количество субстрата - АК, при метаболизме которой и происходит наработка АФК. Изменений по продукции АФК тромбоцитами и нейтрофилами рАСК (ДАТ) в послеоперационном периоде по сравнению с периодом до КШ обнаружено не было, значит, можно предположить по аналогии с рАСК (монотерапия АСК), что тромбоциты таких пациентов имеют низкую восприимчивость не только к АСК, но и неэндотелиальной поверхности ИК. Так как у этой группы пациентов с ИБС наблюдается резистентность ЦОГ-1 к действию АСК, то высокие уровни субстрата способствуют повышенному образованию АФК, а основной антиагрегантный эффект обеспечивается не АСК, а клопидогрелом. Пуриновые рецепторы к АДФ присутствуют и на иммунных клетках лейкоцитарного ряда [Головкин А. С. с соавт. 2018]. Они участвуют во многих процессах, в том числе в адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам при воспалении и атеросклерозе, поэтому тоже блокируются клопидогрелом, что приводит к нарушению образования межклеточных «мостиков».

Кроме того, лейкоцитарно-тромбоцитарные комплексы, образование которых не нарушено у чАСК пациентов, способны сами продуцировать АФК, а образующийся при этом оксид азота может снижать агрегационную активность тромбоцитов, тем самым предотвращает повторные тромбозы [Zang et al., 2018]. Поэтому у рАСК (ДАТ) клинические исходы могут быть более благоприятными ввиду наличия клопидогрела. Добавление клопидогрела к АСК не влияет на само явление аспиринорезистентности, но выполняет противовоспалительную и дополнительную антиагрегантную функцию, противодействует опосредованному тромбоцитами ускорению прогрессирования атеросклеротического поражения за счет нарушения взаимодействия тромбоцитов и лейкоцитов и последующей активации лейкоцитов, инфильтрации, воспаления и накопления липидов [Schrottmaier W.C. et al., 2015]. Вероятные нарушения межклеточных контактов у рАСК (монотерапия АСК) пациентов с ИБС по всем путям (через рецепторы и микровезикулы) нивелируют антиагрегантный эффект АСК ввиду недостаточного

количества АК в тромбоцитах, что и обуславливает сниженную чувствительность таких пациентов к АСК.

Вышеизложенные предположения подтверждаются данными корреляционного анализа между показателями ХЛ тромбоцитов и нейтрофилов. Так, в контрольной группе обратные умеренные корреляции определялись по $I_{\max}$ и S в спонтанном тесте с люминолом ($r=-0,46$, $p=0,01$ и $r=-0,45$, $p=0,015$ соответственно). В группе чАСК выявлены прямые корреляции между показателями ХЛ нейтрофилов и тромбоцитов и в спонтанных, и в индуцированных тестах с люцигенином до КШ и в первые сутки после КШ (таблица 2). Это свидетельствует о налаженном контакте тромбоцитов и нейтрофилов, когда высокая активность по продукции первичных АФК одних клеток стимулирует продукцию АФК другими клетками, а антиагрегантная терапия приводит к разрушению таких связей ввиду чувствительности клеток к терапии (проявляется в отсутствии корреляций на 8–10-е сутки после КШ).

Таблица 2 – Корреляция между показателями хемилюминесценции нейтрофилов и тромбоцитов с люцигенином в группе чувствительных к АСК или АСК и клопидогрелу пациентов с ИБС

Показатель 1		Коэффициент корреляции (r) 2	Уровень значимости (p) 3
До КШ			
$I_{\max}$	Спонтанная ХЛ	0,40	0,008
	Индукцированная ХЛ	0,34	0,008
S	Спонтанная ХЛ	0,27	0,036
	Индукцированная ХЛ	0,34	0,008
Первые сутки после КШ			
$I_{\max}$	Спонтанная ХЛ	0,40	0,003
	Индукцированная ХЛ	0,44	0,002
S	Спонтанная ХЛ	0,43	0,002
	Индукцированная ХЛ	0,41	0,004

В группе рАСК (монотерапия АСК) также обнаружены прямые взаимосвязи между показателями ХЛ нейтрофилов и тромбоцитов в основном в индуцированных тестах с люцигенином, что может быть связано со стабильной не меняющейся во времени на уровне контрольной группы продукцией АФК по сравнению с чАСК (таблица 3).

В группе рАСК (ДАТ) корреляций между показателями ХЛ нейтрофилов и тромбоцитов обнаружено не было. Это может свидетельствовать о нарушении тесных контактов между нейтрофилами и тромбоцитами при участии АФК.

Таблица 3 – Корреляция между показателями хемилюминесценции нейтрофилов и тромбоцитов с люцигенином в группе резистентных к АСК пациентов с ИБС на монотерапии АСК

Показатель 1		Коэффициент корреляции (r) 2	Уровень значимости (p) 3
Первые сутки после КШ			
I_{max}	Спонтанная ХЛ	0,60	0,030
	Индукцированная ХЛ	0,68	0,010
ИА		0,64	0,019
8-10-е сутки после КШ			
I_{max}	Индукцированная ХЛ	0,64	0,023
S	Индукцированная ХЛ	0,78	0,003

Мы получили корреляции между показателями ХЛ тромбоцитов и уровнями их агрегации с различными стимуляторами (для чувствительных пациентов касается агрегации с адреналином, для резистентных – с адреналином, коллагеном, АДФ и арахидоновой кислотой). У чАСК и рАСК (монотерапия АСК) эти связи в основном отрицательные, а у рАСК (ДАТ) положительные. Учитывая уровни АФК тромбоцитов, получается, что действие АФК у чувствительных к АСК или АСК+клопидогрел пациентов с ИБС направлено на снижение агрегационного потенциала тромбоцитов благодаря усилению активности аденилатциклазы и снижению концентрации внутриклеточного кальция, а у резистентных к АСК или АСК+клопидогрел пациентов с ИБС уровни АФК соответствуют повышенной агрегации тромбоцитов, что может быть связано с высокой активностью фосфолипазы C, A2 и/или низкой активностью аденилатциклазы.

Заключение

Проведенное нами исследование выявило, что вариабельность чувствительности тромбоцитов к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом у пациентов с ИБС может быть обусловлена целым рядом факторов, имеющим место при выполнении операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения, а также назначаемой после операции антиагрегантной терапией.

Применение биохемилюминисцентного метода дает возможность диагностировать у пациентов с ИБС чувствительность к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом еще до начала антиагрегантной терапии и операции КШ. Это связано с тем, что у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, продукция первичных и вторичных активных форм кислорода существенно превышает таковую у здоровых людей и у пациентов с ИБС, резистентных к АСК при монотерапии.

У пациентов с ИБС продукция активных форм кислорода тромбоцитами связана с их агрегационной активностью с различными индукторами [Masselli E. et al., 2021]. Так, у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, высокая продукция вторичных активных форм кислорода тромбоцитами соответствует их низкой агрегации с адреналином, вероятно,

вследствие высокой активности аденилатциклазы, приводящей к снижению концентрации внутриклеточного кальция.

Высокая продукция первичных и вторичных активных форм кислорода тромбоцитами у пациентов с ИБС, резистентных к комбинации АСК с клопидогрелом при двойной антиагрегантной терапии, и низкие уровни у пациентов с ИБС, резистентных к АСК при монотерапии, соответствуют высокой агрегации тромбоцитов с адреналином, коллагеном, АДФ и арахидоновой кислотой, вероятно, вследствие высокой активности фосфолипазы C, фосфолипазы A2 и/или низкой активности аденилатциклазы. Активные формы кислорода в одних случаях могут инактивировать ферменты в результате окислительно-восстановительных реакций, в других – могут выступать в роли вторичных мессенджеров активации тромбоцитов при мобилизации кальция.

Предполагается также возможная роль передачи арахидоновой кислоты нейтрофилами тромбоцитам с помощью микровезикул в итоговой продукции первичных и вторичных активных форм кислорода тромбоцитами при метаболизме данного субстрата [Серебряная Н. Б. с соавт., 2019].

Такое межклеточное взаимодействие может быть образовано между тромбоцитами и нейтрофилами у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом и резистентных к антиагрегантам при двойной антиагрегантной терапии. Для пациентов с ИБС, резистентных к АСК при монотерапии, предполагается отсутствие контактов как на уровне рецепторов, так и на уровне микровезикул. Это подтверждается полученными данными, так как высокая активность тромбоцитов и нейтрофилов в отношении продукции активных форм кислорода наблюдается в группе пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом и резистентных к антиагрегантам при двойной антиагрегантной терапии. В группе же пациентов с ИБС, резистентных к АСК при монотерапии, выявлена низкая активность тромбоцитов и нейтрофилов по продукции активных форм кислорода.

Таким образом, продукция тромбоцитами активных форм кислорода отражает их функциональное состояние у пациентов с ИБС. Она зависит от операции коронарного шунтирования, взаимодействия тромбоцитов с нейтрофилами и особенностей антиагрегантной терапии. Определение активных форм кислорода в тромбоцитах до операции коронарного шунтирования позволит выявить наличие резистентности к препарату АСК и уточнить характер антиагрегантной терапии в виде назначения АСК или комбинации АСК с клопидогрелом в послеоперационном периоде.

Выводы

1. У пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), чувствительных к ацетилсалициловой кислоте (АСК) или к комбинации АСК с клопидогрелом, до коронарного шунтирования тромбоциты продуцируют высокие уровни первичных и вторичных активных форм кислорода, а нейтрофилы – первичных активных форм кислорода относительно нормы. Резервные возможности тромбоцитов по продукции вторичных активных форм кислорода при стимуляции АДФ выше у

пациентов с ИБС, резистентных к терапии АСК в комбинации с клопидогрелом, чем у пациентов, резистентных к монотерапии АСК.

2. После коронарного шунтирования у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, спонтанная продукция вторичных активных форм кислорода в тромбоцитах соответствует их высокому дооперационному уровню при снижении резервных возможностей клеток при стимуляции АДФ, а в нейтрофилах – еще более возрастает на фоне увеличения их резервных возможностей при стимуляции зимозаном.

3. При резистентности пациентов с ИБС к АСК при монотерапии продукция первичных и вторичных активных форм кислорода в тромбоцитах после коронарного шунтирования сохраняется в пределах дооперационных физиологических значений, а при резистентности к комбинации АСК с клопидогрелом их уровень превышает норму. В нейтрофилах у пациентов с ИБС, резистентных к АСК, при монотерапии спонтанная и индуцированная продукция первичных и вторичных активных форм кислорода после коронарного шунтирования не достигают значений чувствительных к антиагрегантной терапии пациентов; при резистентности к комбинации АСК с клопидогрелом – резерв продукции вторичных активных форм кислорода превышает норму, в отличие от периода до операции.

4. На фоне антиагрегантной терапии у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, тромбоциты усиливают повышенную на дооперационном этапе способность продуцировать вторичные активные формы кислорода.

5. На фоне антиагрегантной терапии у пациентов с ИБС, резистентных к АСК при монотерапии, спонтанная и индуцированная продукция активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами остается на физиологическом уровне, а при резистентности к комбинации АСК с клопидогрелом повышена относительно нормы продукция преимущественно вторичных активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами в сочетании со значительным замедлением активации нейтрофилов.

6. Гиперпродукция первичных и вторичных активных форм кислорода в тромбоцитах у пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, до операции взаимосвязана со снижением агрегации тромбоцитов (с АДФ и арахидоновой кислотой). Прием антиагрегантов снижает агрегационный потенциал тромбоцитов (с коллагеном, АДФ, адреналином, арахидоновой кислотой) в сочетании с ростом продукции первичных и вторичных активных форм кислорода в клетках. У пациентов с ИБС, резистентных к антиагрегантной терапии, напротив, агрегация тромбоцитов (с арахидоновой кислотой при инкубации с АСК) до операции повышена в условиях физиологической продукции активных форм кислорода, а после назначения антиагрегантов нормализуется.

7. У пациентов с ИБС, чувствительных к АСК или к комбинации АСК с клопидогрелом, наибольшее количество прямых взаимосвязей между показателями хемилюминесценции тромбоцитов и нейтрофилов выявлено в отношении образования первичных активных форм кислорода до и после

коронарного шунтирования, а применение антиагрегантной терапии приводит к разобщению этих взаимосвязей. У пациентов с ИБС, резистентных к АСК при монотерапии, подобные корреляции определяются после операции (на 1-е и 8–10-е сутки) в основном в индуцированных тестах.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. Гончаров, М.Д. Состояние гемостаза у больных с разной чувствительностью к ацетилсалициловой кислоте при ишемической болезни сердца / Гончаров М.Д., Веселов А.Е., Пац Ю.С. // **Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture**. – 2019. – Т. 11, № 5-2. – С. 34-39. (ИФ РИНЦ 0,437).
2. Дубынина, Ю.А. Особенности хемилюминесцентной активности тромбоцитов в норме и при ишемической болезни сердца / Дубынина Ю.А., Гвоздев И.И., Гончаров М.Д. // **Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture**. – 2019. – Т. 11, №5-2. – С. 40-44. (ИФ РИНЦ 0,437).
3. Коронарное шунтирование: исходы и эффективность антитромбоцитарной терапии / Гринштейн Ю.И., Косинова А.А., Монгуш Т.С., Гончаров М.Д. // **Креативная кардиология**. – 2020. – Т. 14, № 2. – С. 138-149. (ИФ РИНЦ 0,439).
4. Resistance to Acetylsalicylic Acid in Patients with Coronary Heart Disease Is the Result of Metabolic Activity of Platelets / Grinshtein Yu.I., Savchenko A.A., Kosinova A.A., Goncharov M.D. // **Pharmaceuticals**. – 2020. – Vol. 13, № 8. – P. 178. (IF 4,6).
5. Chemiluminescent Analysis of Reactive Oxygen Species Synthesis by Platelets from Patients with Coronary Heart Disease / Savchenko A.A., Goncharov M.D., Grinshtein Yu.I., Gvozdev I.I., Mongush T.S., Kosinova A.A. // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. – 2020. – Vol. 169, № 4. – P. 535-538. (IF 0,7).
6. Аспиринорезистентность как результат нарушения взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов у пациентов с ишемической болезнью сердца / Гончаров М.Д., Савченко А.А., Гринштейн Ю.И., Гвоздев И.И., Косинова А.А., Монгуш Т.С. // **Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии**. – 2021. – Т. 17, №1. – С. 16-22. (ИФ РИНЦ 0,885).
7. Хемилюминесцентная активность и агрегация тромбоцитов при хронической коронарной болезни сердца на фоне терапии ацетилсалициловой кислотой до и после коронарного шунтирования / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Косинова А.А. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2021. – Т. 65, № 1. – С. 42-51. (ИФ РИНЦ 0,434).
8. Молекулярно-метаболические особенности изменения чувствительности тромбоцитов к антитромбоцитарной терапии у больных с ишемической болезнью сердца до и после коронарного шунтирования / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Косинова А.А. // **Российский кардиологический журнал**. – 2021. – Т. 26, № 6. – С. 24-32. (ИФ РИНЦ 1,583).
9. Гончаров, М.Д. Особенности продукции активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами в формировании недостаточного ответа на ацетилсалициловую кислоту у пациентов с ишемической болезнью сердца после операции коронарного

шунтирования / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А. // **Трансляционная медицина.** – 2022. – Т. 9, № 1. – С. 12-28. (ИФ РИНЦ 0,614).

Тезисы:

1. Особенности хемилюминесцентной активности тромбоцитов у больных ИБС до и после коронарного шунтирования на терапии ацетилсалициловой кислотой / Гончаров М.Д., Савченко А.А., Монгуш Т.С., Косинова А.А., Грищенко Д.А., Гринштейн Ю.И. // Материалы Российского национального конгресса кардиологов (с международным участием) «Новые технологии - в практику здравоохранения». 25-28 сентября, 2018 г. – Москва, 2018. – С. 666.
2. Показатели хемилюминесценции тромбоцитов у чувствительных и резистентных к ацетилсалициловой кислоте больных ишемической болезнью сердца до и после коронарного шунтирования / Гончаров М.Д., Монгуш Т.С., Савченко А.А., Грищенко Д.А., Косинова А.А., Гринштейн Ю.И. // Лабораторная Служба. – 2019. – Т.8, №1. – С. 23. (ИФ РИНЦ 0,244).
3. К вопросу межклеточного взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов при недостаточном ответе тромбоцитов на ацетилсалициловую кислоту у пациентов с ИБС / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Косинова А.А., Монгуш Т.С., Савченко А.А. // Материалы Российского национального конгресса кардиологов «РКО для профессионалов и пациентов - от первичной помощи к новейшим технологиям». 24-26 сентября, 2019 г. – Екатеринбург, 2019. – С. 328.
4. Взаимное влияние клеток крови и его возможная роль в снижении чувствительности тромбоцитов к действию ацетилсалициловой кислоты / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Монгуш Т.С. // Материалы VIII Съезда кардиологов Сибирского федерального округа «От первичной профилактики до высоких технологий в кардиологии». 10-11 октября 2019 г. – Кемерово. **Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.** – 2019. – Т.8, №3. – С. 31. (ИФ РИНЦ 0,897).
5. Влияние искусственного кровообращения на хемилюминесцентную активность тромбоцитов в зависимости от их чувствительности к ацетилсалициловой кислоте в пробе in vitro у больных ИБС / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Монгуш Т.С. // Материалы Российского национального конгресса кардиологов «Кардиология 2020 - новые вызовы и новые решения». 29 сентября-01 октября 2020 г. – Казань, 2020. – С. 777.
6. Связь чувствительности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте с продукцией активных форм кислорода у пациентов с ишемической болезнью сердца на антитромбоцитарной терапии / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Косинова А.А. // **Кардиологический вестник.** – 2021. – Т. 16, спецвыпуск. – С. 28-29. (ИФ РИНЦ 0,282).
7. The influence of metabolic activity of platelets on sensitivity ty Acetylsalicylic acid in patients with coronary heart disease / Kosinova A., Grinshtein Y., Savchenko A., Goncharov M. // **European Heart Journal.** - 2021. - Vol.42, №1. - P.3225. (IF 39,3).
8. Изменение продукции активных форм кислорода тромбоцитами в генезе их недостаточного ответа на антитромбоцитарную терапию при коронарной реваскуляризации / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Косинова

А.А. // **Атеросклероз.** Материалы IX съезда кардиологов Сибирского федерального округа. – 2021. – Т.17, № 3. – С. 61-62. (ИФ РИНЦ 0,353).

9. Продукция активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами, их межклеточное взаимодействие у чувствительных и резистентных к ацетилсалициловой кислоте пациентов с ишемической болезнью сердца после коронарного шунтирования / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Косинова А.А. // Материалы Российского национального конгресса кардиологов «Кардиология 2022: новая стратегия в новой реальности – открытость, единство, суверенитет». 29 сентября-01 октября 2022 г. – Казань, 2022. – С. 302.

Патент на изобретения по теме диссертации

Пат. 2699569 С1. Российская Федерация: МПК А61К 31/16, А61К 35/19, А61Р 9/10, G01N 33/49. Способ определения чувствительности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте / Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Гончаров М.Д., Косинова А.А., Гвоздев И.И. Заявитель и патентообладатель: ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого. – № 2018143960; опубли. 06.09.2019. Бюл. № 25. – 9 с.

Выражаю особую благодарность доктору медицинских наук, профессору Савченко Андрею Анатольевичу, заведующему кафедрой физиологии имени профессора А.Т. Пшоники ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России за помощь в освоении метода хемилюминесценции, за значимые замечания, важные советы при проведении исследования и оформлении данной диссертационной работы.

Список использованных сокращений

АДФ – аденозиндифосфат
 АСК – ацетилсалициловая кислота
 АК – арахидоновая кислота
 АФК – активные формы кислорода
 ДАТ – двойная антиагрегантная терапия
 ИА – индекс активации
 ИБС – ишемическая болезнь сердца
 ИК – искусственное кровообращение
 КШ – коронарное шунтирование
 рАСК – резистентный к АСК и/или АСК и клопидогрелу пациент с ИБС
 ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
 ХЛ – хемилюминесценция
 ЦОГ – циклооксигеназа
 чАСК – чувствительный к АСК и/или АСК и клопидогрелу пациент с ИБС
 CD – кластер дифференцировки
 I_{max} – максимальное значение интенсивности хемилюминесценции
 S – площадь под кривой хемилюминесценции
 T_{max} – время выхода на максимум хемилюминесценции