

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Красноярский государственный медицинский  
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**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)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор  
Гринштейн Юрий Исаевич

Красноярск – 2024

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	16
1.1 Общая характеристика ишемической болезни сердца, операция коронарного шунтирования.....	16
1.2 Тромбоциты, нейтрофилы и активные формы кислорода. Хемилюминесцентный анализ в детекции активных форм кислорода ....	22
1.3 Взаимодействие тромбоцитов и лейкоцитов между собой.....	33
1.4 Ацетилсалициловая кислота и клопидогрел. Резистентность тромбоцитов к антиагрегантам и ее причины.....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	48
2.1 Дизайн исследования.....	48
2.2 Материал исследования .....	52
2.3 Определение агрегации тромбоцитов и резистентности к ацетилсалициловой кислоте .....	52
2.4 Выделение тромбоцитов из периферической крови и определение их хемилюминесцентной активности .....	53
2.5 Выделение нейтрофилов из периферической крови и определение их хемилюминесцентной активности .....	54
2.6 Статистический анализ .....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	57
3.1 Показатели агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с ИБС в зависимости от их чувствительности к АСК. Хемилюминесцентный метод диагностики резистентности тромбоцитов к АСК.....	57
3.2 Показатели хемилюминесценции тромбоцитов у пациентов с ИБС, в том числе в зависимости от их чувствительности к АСК .....	61
3.3 Показатели хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с ИБС, в том числе в зависимости от их чувствительности к АСК .....	68

3.4	Взаимосвязь показателей агрегации и хемилюминесценции тромбоцитов у пациентов с ИБС, в том числе в зависимости от их чувствительности к АСК .....	75
3.5	Взаимосвязь показателей хемилюминесценции тромбоцитов и нейтрофилов у пациентов с ИБС, в том числе в зависимости от их чувствительности к АСК.....	78
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....		80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....		92
ВЫВОДЫ .....		94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....		96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		98
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА .....		127
Рисунки.....		127
Таблицы.....		128

## ВВЕДЕНИЕ

### 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) [6, 20, 125, 144]. 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 [147]. 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 [76, 124, 164]. 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) [113, 125, 210]. 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 % [60, 107].

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 [28, 121, 245]. Низкая чувствительность к АСК при коронарной болезни сердца в одних исследованиях незначительна, в других наблюдается в 50 % случаев либо принимает промежуточные значения [28, 194, 220]. 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 [26]. Пролонгированный прием АСК больными с высоким риском ССЗ снижает вероятность развития ИМ и инсультов, в то время как у аспирина-резистентных пациентов возрастает риск данных событий [22, 104, 197].

### **Степень разработанности темы исследования**

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. [4, 21, 153, 171]. Феномен аспирина-резистентности 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 [40, 64, 149, 175]. 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 [187, 217]. Причем в это время происходит взаимная активация клеток, а истощение функций нейтрофилов приводит к снижению привлечения (хемотаксиса) тромбоцитов в очаг и наоборот [96, 165]. 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 [68, 175, 231]. 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 [180, 198, 233]. 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 [49, 73, 218]. 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.

### **Научная гипотеза**

На состояние тромбоцитов значительно влияет их микроокружение, представленное клетками крови, эндотелием сосудов и разнообразными активными веществами. От этого зависит функциональное поведение

тромбоцитов, их ответ на воздействие многих стимулирующих либо ингибирующих факторов и агентов, в том числе антиагрегантной терапии, в частности ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела. Для атеросклероза, являющегося причиной ИБС, характерен неспецифический воспалительный процесс, инициирующий контакт тромбоцитов с нейтрофилами. Между этими клетками существуют тесные взаимодействия, сила и характер которых могут влиять на ответ тромбоцитов при антиагрегантной терапии. Критерием функциональной активности тромбоцитов и нейтрофилов являются продуцируемые клетками активные формы кислорода, влияющие как на межклеточное взаимодействие, так и на чувствительность тромбоцитов к антиагрегантам. Возможно, продукция и уровень активных форм кислорода влияет на агрегацию тромбоцитов и взаимосвязана с таковой в нейтрофилах.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработан методический подход к оценке генерации АФК тромбоцитами с помощью ХЛ метода с определением оптимального содержания реакционной смеси [1].

Разработан и запатентован «Способ определения чувствительности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте» у пациентов с ИБС, который позволяет определить степень чувствительности тромбоцитов к применяемым препаратам АСК [47]. 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 А<sub>2</sub>. 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**

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 «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии», г. Красноярск (главный врач – д.м.н., профессор В. А. Сакович), являющемся клинической базой ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский

университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (ректор – д.м.н., профессор А.В. Протопопов). Все пациенты со II-III функциональным классом стенокардии напряжения согласно Канадской классификации. У всех пациентов атеросклеротическое поражение коронарных артерий подтверждено коронароангиографией. Всем пациентам выполнялась операция КШ. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в данном исследовании. В контрольную группу были включены 32 здоровых донора, сопоставимых по полу и возрасту, не предъявлявшие на момент обследования жалоб соматического профиля, не имеющие в анамнезе хронических инфекционных заболеваний. Выполненная работа была одобрена локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого (протокол 76/2016 от 04.05.2017).

Исследование проводилось в клинико-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. С помощью оптического метода определяли агрегацию тромбоцитов с индукторами (АДФ, коллагеном, адреналином) и резистентность к ацетилсалициловой кислоте в тесте с арахидоновой кислотой (АК) (при уровне агрегации  $\geq 20\%$  от максимально возможной амплитуды хотя бы в одной точке наблюдения (на фоне приема препарата пациентом или после инкубации тромбоцитов с АСК (3,36 мМ) *in vitro* в течение 3 минут при температуре 37<sup>0</sup>С)). Продукцию АФК определяли с помощью ХЛ метода на биохемилюминесцентном анализаторе с люминолом и люцигенином в спонтанных и индуцированных тестах.

### **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**

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».

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).

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.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, в своем составе имеет 10 таблиц и 12 рисунков. По структуре имеет 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.

### **Личное участие автора**

Автор всем пациентам трижды (до КШ, на 1-е сутки и на 8–10-е сутки после операции) определял агрегацию тромбоцитов с коллагеном, АДФ, адреналином и АК методом оптической агрегометрии, определял аспиринорезистентность тромбоцитов при инкубации с АСК методом оптической агрегометрии с АК. Для части пациентов автор проводил измерение показателей спонтанной и индуцированной ХЛ тромбоцитов и нейтрофилов. Автор провел и подготовил обзор, систематизацию имеющихся в литературе данных по теме исследования,

выполнил анализ, оценку и статистическую обработку полученных данных, по результатам чего были сформулированы выводы диссертационной работы.

Выражаю особую благодарность доктору медицинских наук, профессору Савченко Андрею Анатольевичу, заведующему кафедрой физиологии имени профессора А.Т. Пшоника 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общая характеристика ишемической болезни сердца, операция коронарного шунтирования

Хроническая ишемическая (коронарная) болезнь сердца (ИБС) представляет собой заболевание, характерными признаками которого является недостаточное поступление крови к миокарду в результате поражения коронарных артерий атеросклерозом или атеротромбозом либо на фоне ангиоспазма или микроваскулярной дисфункции. Ишемия миокарда возникает, когда метаболические потребности сердечной мышцы не могут быть в полной мере удовлетворены имеющимся объемом коронарного кровотока [125].

В России смертность от ССЗ в последние годы составляет около 48 % от общего количества смертей. При этом всего 40 – 50% больных ИБС получают лечение, зная о своем заболевании. В остальных же 50 – 60 % случаев заболевание остается недиагностированным, так как люди зачастую не обращаются за медицинской помощью при легких симптомах из-за недостаточного санитарного просвещения населения [5].

Одной из основных причин возникновения ИБС являются атеросклеротические бляшки или атеротромботические образования, которые могут как частично, так и полностью перекрывать просвет кровеносных сосудов, приводя к недостаточному кровоснабжению сердца, развитию ишемии и некроза миокарда. Вместе с тем возможно развитие спазма коронарных артерий как на эпикардиальном уровне, так и на уровне микроваскулярного русла, что также ведет к ишемии миокарда. Причиной ишемии миокарда могут быть и врожденные аномалии коронарных артерий, дефицит кровоснабжения сердца при выраженной патологии аортального клапана, эмболии коронарных артерий и др. Существуют факторы риска ИБС. К контролируемым факторам риска относится гиперхолестеринемия, артериальная гипертония, сахарный диабет, курение, низкая физическая активность (гиподинамия), ожирение [3]. К неизменяемым же

факторам можно отнести мужской пол, возраст (старше 50 – 60 лет) и отягощенный семейный анамнез. Кроме всего прочего, сниженная фракция выброса левого желудочка и поражения большого числа сосудов с более выраженными клиническими проявлениями дают худший прогноз заболевания [23, 128, 142].

При сниженном снабжении кардиомиоцитов кислородом происходит нарушение всех функций сердечной мышцы (биохимической, электрической, механической). Страдает структура клеток, а вследствие этого и их функции. При недостатке молекул кислорода из глюкозы начинает образовываться лактат, жирные кислоты перестают окисляться, кислотность повышается, концентрации креатинфосфата и АТФ падают, нарушается нормальное соотношение ионов калия и натрия в результате поражений мембран клеток. В зависимости от снабжаемого участка пораженного сосуда зависит объем поражения. Все это приводит к нарушению сократительной способности миокарда. Сердце перестает в полной мере выполнять свою функцию по обеспечению всех органов кровью с кислородом и питательными веществами, в результате чего страдает организм в целом [65].

Согласно современным представлениям, выделяют острые и хронические коронарные синдромы. К острым коронарным синдромам (ОКС) относятся: ОКС с подъемом сегмента ST, ОКС без подъема сегмента ST, нестабильная стенокардия. ИМ, вызванный атеротромботическими поражениями при ИБС, относится к 1 типу по клинической классификации инфаркта миокарда, в основе которого лежит нестабильность атеросклеротической бляшки. Ко 2 типу относится неатеротромботический ИМ, при котором есть несоответствие между доставкой и потребностью в кислороде. Внезапная коронарная смерть относится к 3 типу, к 4 типу – ИМ, ассоциированный с чрезкожным коронарным вмешательством, а к 5 типу – ИМ, ассоциированный с АКШ [132]. К хроническим (стабильным) коронарным синдромам относят: хроническую обструктивную коронарную болезнь сердца, в основе которой лежат гемодинамически значимые стенозы, обусловленные атеросклерозом/атеротромбозом, и хроническую

ишемию миокарда при отсутствии обструктивного поражения эпикардальных коронарных артерий [17]. Данное разделение строится на том факте, что при коронароангиографии мы можем оценить только состояние эпикардальных артерий среднего и небольшого калибра, которые визуализируются при контрастировании, а это всего лишь 5 – 10% от всего кровоснабжения сердца. Состояние пре-артериол, артериол и капилляров, которые составляют 90 процентов кровоснабжения сердца мы не видим при коронароангиографии и можем оценить только с помощью дополнительных методов исследования, как неинвазивных (стресс-эхокардиография, стресс-магнитно-резонансная томография, стресс-однофотонная эмиссионная компьютерная томография, стресс-позитронная эмиссионная компьютерная томография), так и инвазивных (коронароангиография с определением функционального резерва кровотока и медикаментозными пробами) [52, 125].

Клиническим проявлением ИБС является стенокардия. Она представляет собой синдром, при котором возникает чувство дискомфорта или определенные болевые ощущения в загрудинном пространстве при разнообразных ситуациях. Возникновению приступов способствует физическая нагрузка разной интенсивности и тяжести, эмоциональное напряжение. Распространенность данного синдрома увеличивается с возрастом как у мужчин, так и среди женщин: в среднем с 6 – 7 % в возрасте 45 – 64 лет до 12 – 13 % в возрасте 65 – 84 лет. Это связано с прогрессированием атеросклероза во второй половине жизни. Распространенность стенокардии среди мужчин выше в возрасте до 45– 50 лет, а по достижении климакса у женщин частота стенокардии в гендерном отношении выравнивается. Микроваскулярная дисфункция чаще наблюдается у женщин [30, 236]. Выделяют стабильную и нестабильную стенокардию. Стабильная стенокардия, согласно классификации Канадского кардиоваскулярного общества, делится на четыре функциональных класса:

*Класс I.* Привычная физическая активность не провоцирует приступ стенокардии.

*Класс II.* Незначительное ограничение привычной активности. Приступ возникает при ходьбе на расстояние более 300 метров, подъеме более чем на один этаж. Вероятность возникновения приступа увеличивается при физической нагрузке, после еды, в холодную или ветреную погоду, после эмоциональных стрессов или в течение нескольких часов после пробуждения.

*Класс III.* Значительное ограничение привычной физической активности (ходьба на 150 – 300 метров, подъем на один этаж в нормальном состоянии и в нормальном темпе).

*Класс IV.* Невозможность выполнять любую физическую активность без дискомфорта, боли могут возникать и в покое.

Нестабильная стенокардия подразумевает впервые возникшую стенокардию, прогрессирующую стенокардию, раннюю постинфарктную стенокардию и стенокардию, возникшую впервые в покое [39].

В современных рекомендациях Европейского общества кардиологов (2019) по хроническим коронарным синдромам (клинико-патоморфологическое и патофизиологическое состояние, возникающее с момента образования атеросклеротической бляшки до функциональных нарушений коронарных артерий, которое может характеризоваться как наличием явных клинических проявлений, так и их полным отсутствием) выделяется многообразие форм стабильной ИБС:

1. Пациенты с высокой вероятностью болезни коронарных артерий и стабильными ангинальными симптомами и/или одышкой.
2. Пациенты с вновь возникшей сердечной недостаточностью или дисфункцией левого желудочка и подозрением на ИБС.
3. Бессимптомные пациенты или со стабильными симптомами <1 года после ОКС или пациенты с недавней реваскуляризацией.
4. Бессимптомные пациенты или со стабильными симптомами >1 года после начального диагноза или реваскуляризации.
5. Пациенты со стенокардией и подозрением на вазоспастическую или микроваскулярную болезнь (стенокардию).

6. Бессимптомные субъекты, у которых коронарная болезнь выявлена при скрининге [125].

Помимо корректировки модифицируемых факторов риска ИБС и медикаментозного лечения различных вариантов хронического коронарного синдрома, направленного на купирование стенокардии и улучшение прогноза заболевания, в ряде случаев возможно использование хирургических методов реваскуляризации миокарда (если заболевание не поддается терапии, если по данным коронарографии имеется стеноз ствола левой венечной артерии, двух и трех основных артерий сердца более 70 %). Если левожелудочковая фракция выброса <45 %, поражен ствол левой коронарной артерии, у пациента имеется сахарный диабет, поражены три и более коронарные артерии, то это является дополнительным фактором в пользу применения коронарного шунтирования (КШ).

Целью хирургического лечения ИБС является улучшение или восстановление кровотока в зонах ишемии. В случае успешного проведения операции не только устраняются симптомы стенокардии, но и улучшается качество жизни пациента.

Суть КШ в том, что с помощью сосудистых трансплантатов (шунтов) создается обход не кровоснабжающих сердце коронарных артерий для восстановления общего кровообращения в данном органе. Для данных целей используются собственные артерии и вены пациента. При выполнении КШ часть подкожной вены ноги используют для вшивания между восходящей аортой и пораженной артерией сердца, немного дистальнее самого стеноза. В современной кардиохирургии чаще выполняют маммарокоронарное шунтирование, когда используют внутреннюю грудную артерию для формирования анастомоза. Артериальные шунты надежнее венозных и остаются функциональными более длительное время. Проподимость таких шунтов составляет 80 – 90 % даже через 10 лет после операции, в то время как проподимость венозных шунтов порядком падает со временем (в первый год проподимость сохраняется в 90 % случаев, в первые 5 лет – уже в 80 %, а через 10 лет – только в 60 %). Наибольшая

эффективность наблюдается, когда при ИК и кардиоплегии в максимальном количестве берутся внутренние грудные артерии для шунтов [127]. Показана прямая взаимосвязь между хорошей проходимостью шунта с использованием внутренней грудной артерии и выживаемостью после КШ. Такая позитивная тенденция наблюдается даже на втором и третьем десятке лет после операции, в том числе у больных сахарным диабетом [234, 248].

Вместе с тем, у 40 % пациентов отмечаются асимптомные окклюзии шунтов спустя один год после КШ (3,4 % пациента – симптомные окклюзии) с уровнем смертности при асимптомной окклюзии до 9 % [107].

В исследовании SYNTAX trial частота неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в течение пяти лет после КШ составляла 23,2 %, смерть от инфаркта или инсульта – 18,6 %, повторная реваскуляризация – 6,7 %, тромбоз стента или окклюзия графта – 4,2 % [105]. Это связано с продолжающимся прогрессированием атеросклероза сосудов с реактивным воспалением, активацией свертывания крови и тромбозом, травмой кондуита, надрывом интимы, влиянием на стенку венозного шунта артериального давления, со спазмом и гиперплазией кондуита из лучевой артерии, что в итоге приводит к несостоятельности шунтов. К тому же ряд сопутствующих заболеваний (сахарный диабет, артериальная гипертензия) усугубляет данный процесс, зависящий также от антиагрегантной терапии [158].

После операции КШ больные в течение последующей жизни должны соблюдать диету со сниженным содержанием липидов, выполнять ежедневную посильную физическую нагрузку на уровне около 70 % от максимальной. Кроме того, они должны принимать терапию для снижения риска прогрессирования атеросклероза и вероятного тромбоза шунтов. Лечение направлено на профилактику прогрессирования атеросклероза и улучшение прогноза заболевания. К таковому относятся антиагрегантные препараты (АСК, клопидогрел и др.), статины, контролирующие уровень липидов крови, блокаторы ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. При возобновлении стенокардии добавляется терапия, направленная на купирование болевого синдрома, а именно

используются  $\beta$ -адреноблокаторы, ивабрадин, никорандил, ранолазин, триметазидин, нитраты [24].

Таким образом, только эффективная профилактика, оптимальная медикаментозная терапия, а при показаниях и хирургическая реваскуляризация миокарда способны улучшить качество жизни и прогноз при хронической коронарной болезни сердца.

## 1.2 Тромбоциты, нейтрофилы и активные формы кислорода.

### Хемилюминесцентный анализ в детекции активных форм кислорода

Практически все процессы жизнедеятельности живых структур часто сопровождаются излучением, которое иногда называют сверхслабым свечением или собственным излучением клеток и тканей. Более 100 лет назад, в 1923 году, А. Г. Гурвич обнаружил опытным путем очень слабое, едва уловимое «ультрафиолетовое излучение, сопровождающее экзотермические химические реакции, идущие как в различных живых тканях, так и *in vitro*», а в 1973 году Роберт Эллан открыл сверхслабое свечение лейкоцитов крови человека, которые предварительно были активированы бактериальными агентами. В обоих упомянутых случаях такое свечение было связано с образованием и превращением АФК (небольших высокорепреактивных молекул с неспаренным электроном на внешнем электронном уровне) [9]. К данной группе реактивных веществ относят ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси (первичный метаболит активированного кислорода - супероксидный анион-радикал  $\cdot\text{OO}^-$ , а в качестве вторичных радикалов выступает пероксид водорода  $\text{HOOH}$ , гидроксил радикал  $\cdot\text{OH}$ , пероксил радикалы  $\text{ROO}\cdot$ , алкоксил радикалы  $\text{RO}\cdot$ , гидропероксил радикал  $\text{HOO}\cdot$ , гипохлорит  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{O}_3$ , синглетный кислород  $^1\text{O}_2$ , пероксинитрит  $\text{ONOO}^-$ ), которые могут вызывать окисление активных групп белковых молекул и перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот [109, 163]. Также первичным активным радикалом является монооксид азота (NO), образованный

NO-синтазами клеток. Главными продуцентами в организме человека и животных служат клетки фагоцитарного ряда, их пероксисомы как накопительный резервуар: гранулоциты и моноциты крови, тканевые макрофаги. Кроме того, продукция АФК обнаружена и в тромбоцитах, что дает возможность предполагать участие этих молекул в большом разнообразии сигнальных путей многих клеток человеческого организма. В результате реакций и превращений АФК могут взаимодействовать друг с другом, а также и с другими молекулами с испусканием квантов.

Основным источником АФК в клетках является дыхательная цепь в митохондриях (за счет утечки электронов, которые восстанавливают молекулу кислорода с образованием супероксид анион-радикала), а также НАДФН-оксидазная система в мембранах (благодаря окислению цитоплазматического НАДФН также образуется  $O_2 \cdot^-$ ) [16, 122]. После этого супероксид анион-радикал начинает атаковать различные молекулы, входящие в структурные компоненты клеток, в результате чего образуются вторичные активные радикалы. Данные процессы происходят и при участии таких ферментов, как супероксиддисмутаза, миелопероксидаза, циклооксигеназа (ЦОГ), липоксигеназа, ксантиноксидаза.

Свечение тел, вызванное химическим воздействием или возникающее при протекании химической реакции, называют хемилюминесценцией (ХЛ). Частным случаем ХЛ можно считать излучение света, сопровождающее реакции с участием свободных радикалов. Обычным химическим методом нельзя измерить радикалы, так как они обладают высокой реакционной способностью. Существует прямой метод анализа радикалов – электронный парамагнитный резонанс, но в живых системах его применение невозможно из-за низкого базового, не стимулированного уровня АФК. Основным преимуществом ХЛ метода является отсутствие его связи с изменениями протекающих процессов в различных исследуемых системах (клетках, тканях, растворах), а также этот метод очень чувствителен при обнаружении именно высокорекреационных радикалов (определяется не концентрация, а скорость реакции их образования) [9].

Изучение изменения функциональной активности клеток имеет большое значение в медицине. Исследование и измерение активных метаболитов кислорода дает возможность увидеть потенциал клеток, а также их состояние в конкретно определенный момент времени, при определенном физиологическом или патологическом процессе. Все это требует тщательного изучения механизма продукции активных молекул, разработки методов их обнаружения и средств нейтрализации. Чтобы выявить слабое базальное свечение в биологических объектах и повысить специфичность метода ХЛ, используют так называемые активаторы (химические и физические). Физические не вмешиваются в ход протекающей реакции, но все равно усиливают интенсивность свечения. Химические же реагируют с АФК, в результате чего образуются молекулы в возбужденном состоянии, переходящие в дальнейшем в основное состояние с испусканием фотонов, которые подлежат регистрации. К таким химическим зондам относятся люминол и люцигенин. В отличие от люцигенина, который окисляется только с супероксид-радикалом, люминол способен проходить через клеточную мембрану и взаимодействовать со всеми АФК (первичными и вторичными) [168, 173, 177]. Чтобы определить потенциальные функциональные возможности клеток при измерении ХЛ, для стимуляции к ним добавляют определенные специфические активаторы. Так, например, к нейтрофилам для мобилизации дыхательного «взрыва» добавляют зимозан, представляющий вещество бактериальной природы (полисахарид дрожжевой оболочки, получаемый из культуры *Saccharomyces cerevisiae*). При исследовании же тромбоцитарных клеток в качестве индукторов чаще всего используют аденозиндифосфат (АДФ), арахидоновую кислоту (АК), тромбин, фактор активации тромбоцитов (активаторы, которые способны связываться с мембранными рецепторами) [74].

Любое оперативное вмешательство, в том числе и КШ, является определенным стрессом для человеческого организма, который отвечает на нарушение гомеостаза и целостности своих структур воспалительной реакцией, как общей, так и местной, активировать прокоагулянтные свойства для

отграничения очага. При воспалительном процессе в очаге происходит мобилизация запасов тромбоцитов, клеток лейкоцитарного ряда, в частности, зрелых нейтрофилов, быстрая дифференцировка предшественников в костном мозге [204]. Одним из основных проявлений активации нейтрофильных гранулоцитов является «кислородный взрыв» и наработка свободных радикалов [41].

Нейтрофилы представляют собой самый многочисленный подвид гранулоцитарных лейкоцитов крови (50–75%), которые участвуют в воспалительных реакциях неинфекционной и инфекционной природы, а также в непосредственной защите организма от проникших различных инфекций (поиск, захват и разрушение микроорганизмов). Эти клетки способны к активному амебоидному перемещению и хемотаксису, то есть они могут покидать кровеносное русло (где продолжительность их жизни достигает 8–20 часов) и выходить в ткани (продолжительность жизни до 2 суток), где в дальнейшем происходит их апоптоз. В очаге воспаления апоптоз может блокироваться, что приводит к увеличению продолжительности жизнедеятельности данных клеток [111]. В цитоплазме зрелых нейтрофилов находится сегментированное (3–5 сегментов) ядро и гранулы (кислород-зависимые и кислород-независимые), которые содержат множество активных веществ, благодаря чему осуществляется специфическая функция данных клеток (рисунок 1) [184].



Рисунок 1. Ультрамикроскопическое строение нейтрофильного гранулоцита

К кислород-независимым относятся азурофильные (первичные), специфические (вторичные), желатиназные и секреторные гранулы с различными ферментами, а кислород-зависимые гранулы депонируют АФК. Все содержимое оказывает цитолитический, цитотоксический и микробицидный эффекты [54]. Помимо этого, активная наработка супероксид-аниона, происходящая при мобилизации нейтрофилов, запускается при работе мембранной НАДФН-оксидазы, которая участвует в противомикробной защите [148].

ХЛ активность нейтрофилов изучается при реакциях воспаления различной этиологии. Большое количество исследований посвящено изучению ХЛ нейтрофилов при активировании их различными стимулами. Так, один из острофазных белков – фибриноген, усиливает интенсивность стимулированной зимозаном люминолзависимой ХЛ нейтрофилов периферической крови, что может также указывать на взаимосвязь участников воспаления и системы гемостаза [19]. При распространенном гнойном перитоните было показано достоверное увеличение в разы максимума интенсивности как спонтанной, так и зимозан-индуцированной ХЛ нейтрофилов (усиление с люминолом и люцигенином). Эти данные говорят об увеличении продукции как первичных, так и вторичных АФК при воспалении и активном участии этих клеток в рассматриваемом процессе [57]. При хроническом риносинусите увеличение ХЛ нейтрофилов наблюдалось только при усилении люминолом (как в спонтанном, так и в индуцированном тесте), но не при использовании люцигенина, что свидетельствует о преобладании миелопероксидазного пути образования вторичных АФК [27]. В исследовании ХЛ нейтрофильных гранулоцитов при внебольничной пневмонии у больных был выявлен повышенный уровень «респираторного взрыва» в клетках. При этом интенсивность продукции первичных АФК незначительно зависит, а вторичных в большей степени связана со степенью тяжести заболевания [71]. Помимо всего вышесказанного, исследование ХЛ нейтрофилов используют и в аллергодиагностике, при миеломной болезни, для прогноза длительности и осложнений тяжелых инфекций [12, 59, 62].

Takeshita et al. показали усиление метаболизма нейтрофилов в тесте ХЛ у пациентов со стенокардией при ИБС [241]. Есть данные по снижению ХЛ активности нейтрофилов при использовании различных лекарственных препаратов: лидокаина, тиопентала, стероидов [143]. С помощью метода ХЛ было установлено, что иммуноглобулин G и инсулин повышают окислительную активность нейтрофилов, а с помощью температуры через рецепторы к прогестерону у женщин и гистамину у женщин и мужчин можно контролировать активность НАДФН-оксидазы (фермента, участвующего в образовании супероксид радикала) [11]. Выходит, что при многих патологиях происходит перестройка внутренних метаболических и регуляторных систем нейтрофилов, что характеризуется, в частности, изменениями в продукции разных фракций АФК и может оказывать как протективное, так и усугубляющее влияние на патогенез.

В настоящее время показано, что, несмотря на свой размер и прямую спецификацию, тромбоциты крови человека принимают активное участие не только в гемостатических процессах, но и в воспалительных, иммунологических, трофических и репарационных (на это также указывает тот факт, что для выполнения свертывающей функции достаточно  $30\text{--}50 \cdot 10^9$  тромбоцитов в литре крови, тогда как в норме количество этих клеток в разы больше –  $150\text{--}400 \cdot 10^9$  в литре крови) [14, 137, 150, 191]. Это сферические тельца, которые отшнуровываются от мегакариоцитов в костном мозге и выходят в кровоток. Не имея ядра, но имея на своей мембране рецепторы к многочисленным активным веществам (АДФ, серотонину, тромбоксану  $A_2$ , тромбину, коллагену, адреналину и др.) (таблица 1), тромбоциты могут активироваться по многообразным разветвленным сигнальным путям, что в конечном счете приводит к изменению их метаболизма и перестройке мембраны [160].

Таблица 1 – Агонисты и соответствующие рецепторы тромбоцитов

Агонист 1	Рецепторы 2
Тромбин	Рецепторы PAR1, PAR4; GPIIb-V-IX
Коллаген	GPII VI, GPIIa-IIa
АДФ	P2Y12, P2Y2
Тромбоксан A2	Тромбоксановый рецептор
Адреналин	$\alpha$ 2-адренорецептор
фактор Виллебранда	GPIIb-V-IX

Примечание. Здесь и в табл. 4: АДФ – аденозиндифосфат, GPII – гликопротеин, PAR – рецепторы, активируемые протеазами.

Кроме того, тромбоциты в течение своего жизненного цикла (8–10 дней) могут синтезировать различные белки в достаточной для выполнения биологической роли концентрации (некоторые факторы свертывания, фибриноген, интерлейкины) в зависимости от характера стимула [257]. Цитоплазма содержит лизосомы, альфа-гранулы и плотные гранулы, в которых находятся активные вещества (фактор 4 тромбоцитов, Р-селектин, бета-тромбоглобулин, тромбоспондин, фибронектин, тромбоцитный фибриноген, фактор Виллебранда, факторы роста, АТФ, сератонин, ионы кальция, гидролазы) (рисунок 2).

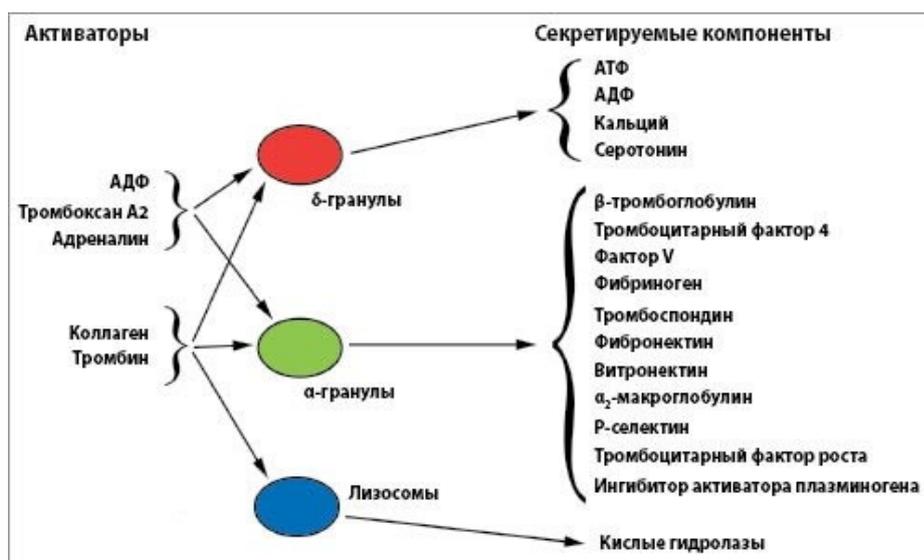


Рисунок 2. Гранулы тромбоцитов и секретируемые ими факторы

Примечание. Здесь и на рис. 5-7: АДФ – аденозиндифосфат, АТФ – аденозинтрифосфат.

Мембрана тромбоцитов представлена большим количеством канальцев, которые вплетаются во внутреннюю структуру клеток, что способствует увеличению общей площади поверхности мембраны и играет важную роль при секреции содержимого гранул и при активации и взаимодействии с различными клетками и структурами [56].

При ССЗ наблюдается стимуляция тромбоцитопоза за счет ускорения продукции и оборота кровяных пластинок, а в кровеносном русле появляются их более активные молодые формы с повышенным содержанием рецепторов, секреторных гранул, что приводит к их повышенной агрегационной активности [34]. Продукция супероксид-радикала происходит при участии мембранной НАДФН-оксидазы, а также наработка высокореактивных радикалов начинается при связывании рецепторов мембраны с соответствующими лигандами, что дополнительно усиливает активацию тромбоцитов. В частности, при действии тромбина и АФК на рецепторы ГПШ $\alpha$  и рецептор, активируемый протеазами 4 (PAR4), индуцируется наработка АФК, также, как и взаимодействие коллагена с его рецептором GPII [174, 178, 182, 230, 249]. Присутствие митохондрий в тромбоцитах свидетельствует о возможности образования АФК при работе дыхательной цепи. Наличие же пероксисом в цитоплазме указывает на не последнюю роль АФК в жизнедеятельности тромбоцитов. Функция активных радикалов сейчас рассматривается не только как цитотоксическая, но и как регуляторная. Они могут выступать в роли второстепенных мессенджеров активации тромбоцитов при мобилизации кальция, инактивации оксида азота, синтезе простагландинов из АК. При образовании тромбоксана A<sub>2</sub> (активатор тромбоцитов, обладает прокоагулянтным эффектом) из АК в тромбоците в качестве промежуточных продуктов также синтезируются эндопероксиды и АФК. При активации, например, тромбоциты выделяют перекись водорода. Е. Н. Лойко с соавт. показали, что сигнальная роль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в регуляции функции тромбоцитов имеет различный эффект в зависимости от концентрации (в низких дозах – ингибирование агрегации, в более высоких дозах – инициирование агрегации) [32, 33, 151]. При воздействии пептида, активирующего рецептор тромбина на

тромбоцитах, повышается продукция АФК и экспрессия Р-селектина, в то время как сниженные уровни провоспалительных молекул в тромбоцитах коррелируют с низким уровнем внутритромбоцитарных АФК [140].

Таким образом, в тромбоцитах наработка АФК начинается при активации НАДФН-оксидазы, ксантинооксидазы, при метаболизме АК и работе переносчиков электронов дыхательной цепи митохондрий [159, 178]. Фермент NO-синтаза участвует в образовании оксида азота. Механизм действия оксида азота на тромбоциты полностью известен: он усиливает синтез цГМФ, стимулируя растворимую гуанилатциклазу; цГМФ, в свою очередь, активирует протеинкиназы G, приводя к активации фосфопротеина, стимулируемого вазодилататорами и киназы цГМФ, ассоциированной с инозитол-трифосфатным рецептором [202] Активация этих факторов ингибирует активацию тромбоцита. Установлено, что интактные тромбоциты способны постоянно генерировать супероксидные радикалы, что имеет значение в норме и патологии, а изменение концентраций АФК в тромбоцитах связано с их функциональной активностью, которая может быть нарушена при действии антиоксидантов [258]. Аномальное повышение продукции АФК тромбоцитами связано с окислительным стрессом и наблюдается при таких заболеваниях, как атеросклероз, диабет, нейродегенерация, а также в процессе старения организма, причем в зависимости от патологии роль АФК может кардинально отличаться [99, 131]. Исследование влияния АФК при сахарном диабете и артериальной гипертензии показало, что реактивные радикалы, продуцируемые внеклеточной системой ксантин-ксантинооксидазой, при добавлении коллагена повышают агрегационную активность тромбоцитов у больных и снижают ее у здоровых, тем самым в ряде случаев это может усугублять течение основного заболевания в связи с повышенным тромбогенным фоном [10]. Ряд исследователей в итоге своих работ пришли к выводу, что понимание основных механизмов образования и влияния АФК в тромбоцитах является очень важным. Взаимодействие поверхностных рецепторов с лигандами (коллагеном, фактором Виллебранда), инициирующее образование тромбов, приводит и к быстрому увеличению внутриклеточных АФК

выше базального уровня, что является ключевым моментом в активации самих тромбоцитов. Ингибирование же НАДФН-оксидазы, участвующей в образовании супероксидного радикала, значительно затрудняет активацию тромбоцитов, их агрегацию, приток кальция и образование тромбов [222]. А активность данного фермента связывают с активацией и агрегационной способностью тромбоцитов, причем данная взаимосвязь наиболее тесно выражена при атеросклеротических процессах [167, 237].

При различных заболеваниях, ассоциированных с повышенной склонностью к тромбозам, наилучший эффект окажет регулирование и поддержание определенного уровня АФК в тромбоците, нежели использование антиоксидантов, так как полное исключение присутствия АФК может привести к тромботическим событиям [227, 252].

Хоть «собственное свечение» тромбоцитов гораздо меньше, чем у нейтрофилов, данный метод все же используют для изучения их активности. Было показано, что в присутствии люминола можно оценить исходное состояние тромбоцитов, а при стимуляции АДФ выявить их функциональный потенциал (при анализе увеличения ХЛ) [75]. Применение же ингибиторов свободнорадикального окисления, например, церулоплазмина в тромбоцитах снижает их ХЛ и агрегацию, также, как и использование тролокса и ресвератрола [58, 85].

При ОКС у больных наблюдается повышенный уровень усиленной люминолом ХЛ тромбоцитов, что говорит об их активации при данном заболевании. Также увеличивается ХЛ при добавлении к клеткам фактора активации тромбоцитов, что указывает на их потенциальную возможность при дополнительной стимуляции при остром ИМ [73]. Человеческие тромбоциты показывают всплеск ХЛ во время инкубации с АК. При этом большая часть супероксид-аниона образуется внутри тромбоцитов при работе ферментов, преобразовывающих АК. Величина светового излучения непосредственно связана с количеством тромбоцитов в реакционной смеси и мало отличалась для одного и того же человека в разные дни. Выявлено, что и другие полиненасыщенные

жирные кислоты, в том числе не являющиеся предшественниками простагландинов, также индуцируют ХЛ тромбоцитов. Действие аспирина заметно снижает ХЛ свечение, вызванное арахидоновой и линолевой кислотой (независимо от того, этот аспирин был принят пациентом либо же добавлен непосредственно к тромбоцитам в пробирку). Салициловая и сульфосалициловая кислота не оказывают ингибирующего действия, что свидетельствует о природе происхождения АФК именно при работе ЦОГ [18]. При исследовании усиленной люминолом ХЛ тромбоцитов с фактором активации тромбоцитов (ФАТ) при ИБС было обнаружено, что аспирин (как при приеме внутрь, так и при добавлении в пробирку) в некоторых случаях может увеличивать интенсивность свечения, что не поддается логическому объяснению и требует дальнейших исследований. Помимо этого, АСК по-разному оказывает влияние на продукцию тромбоцитами АФК при различных воспалительных заболеваниях. Так, у больных, перенесших открытую абдоминальную операцию, АСК подавляет ХЛ тромбоцитов, усиленную ФАТ, а аспириновые чувствительные пациенты с астмой никак не реагируют на добавление этого фактора, однако после инкубации с АСК наблюдается резкий подъем ХЛ с ФАТ. У больных бронхиальной астмой, толерантных к АСК, добавление ФАТ никак не влияет на ХЛ, независимо от присутствия или отсутствия АСК [82, 90]. Кроме всего этого, есть некоторые исследования, указывающие, что простая активация изолированных тромбоцитов не вызывает должную генерацию АФК, так как при этом регистрировалась низкая ХЛ, усиленная люминолом. Производство высокого уровня АФК возможно лишь при их взаимодействии с другими клетками, например, с лейкоцитами, когда происходит взаимная активация участников межклеточных контактов [83].

Таким образом, метод ХЛ находит очень широкое применение в разных областях исследований в медицинской отрасли. Сюда относятся и исследования функций фагоцитирующих клеток при разнообразных воспалительных реакциях и сепсисе различных этиологий, связи ХЛ клеток с возможными осложнениями, прогнозом и течением некоторых заболеваний. Встречаются работы и по определению содержания эндотоксина с помощью ХЛ нейтрофильных

гранулоцитов, более того, существуют даже такие тест системы. ХЛ метод используют и для установления иммунодефицитных состояний, аллергических реакций. Этот метод показывает базальную и индуцированную продукцию АФК клетками у онкологических больных, позволяет оценить влияние лекарственных препаратов и оперативных вмешательств на функциональную активность клеток [42].

На основании всего вышеизложенного можно сказать, что данная методика является перспективной в настоящее время и в ближайшем будущем, что делает ее привлекательной в поиске новых маркеров и взаимосвязей при различных процессах и патологиях.

### **1.3 Взаимодействие тромбоцитов и лейкоцитов между собой**

Одной из главных причин ИБС является атеросклероз коронарных артерий. Долгое время в патогенезе данного процесса ведущую роль отводили накоплению липидов в стенке сосудов. В настоящее же время сформулирована окислительно-восстановительная теория атерогенеза, указывающая на активацию врожденного иммунитета при этом процессе, что сопровождается оксидативным стрессом, побочным эффектом которого является окисление липопротеидов низкой плотности, их фагоцитоз, приводящие к воспалительной реакции в стенках сосудов, что в итоге выражается в дисфункции эндотелия (это вялотекущее воспаление в стенках сосудов, в результате которого образуются атеросклеротические бляшки и тромбы) [155]. В результате окислительных процессов в участке воспаления сосудов и привлечения фагоцитирующих клеток из них образуются так называемые пенистые клетки, насыщенные липидами и образующие липидное ядро, которые начинают производить митогены и факторы роста, приводящие к разрастанию соединительной ткани и построению фиброзного каркаса атеросклеротической бляшки [253]. Чем активнее воспалительный процесс, тем тяжелее выражен стеноз коронарных артерий и тем

выше риск разрыва атеросклеротической бляшки при определенных обстоятельствах с последующими нежелательными сосудистыми событиями [54, 156]. Как и при любом повреждении тканей, при воспалении в эндотелии происходит его тесная связь с клеточными элементами, которые мигрируют из циркуляции. В первые 2–3 часа после ИМ половину объема образующегося тромба составляют фибриновые нити, вторая половина состоит из эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов, но количество тромбоцитов является максимальным. Эти нити служат связующими элементами не только между тромбоцитами, но и между другими клетками крови. В дальнейшем содержание фибрина растет, а число тромбоцитов постепенно падает, что говорит о пусковой начальной роли взаимодействия этих клеток с поврежденным эндотелием [103]. Таким образом, получается, что в процесс атерогенеза вовлечено множество клеток крови, как тромбоцитов, так и клеток лейкоцитарного ряда. Shah et al. в большом исследовании (включало 775 231 человека, у 55 004 из которых в течение 4 лет развились ССЗ) показали, что общее количество нейтрофилов (даже в пределах нормального диапазона) как показатель хронического воспаления тесно связано с частотой возникновения некоторых ССЗ, это указывает на роль последних при таких патологиях [183]. Нейтрофилы способны продуцировать пептиды и белки (например, липокаин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой и нейтрофильная эластаза), АФК, образовывать внеклеточные ловушки (нетоз), в результате чего происходит перекисное окисление липидов, накопление комплексов белки-липиды, повреждение эндотелия и дестабилизация атеросклеротической бляшки [185, 186, 213].

Тромбоциты взаимодействуют с различными видами лейкоцитов и эндотелиальными клетками с помощью огромного количества поверхностных рецепторов, что приводит к воспалению при поражении сосудов, причем провоспалительная функция тромбоцитов заключается как в инициировании процесса, так и в его распространении [157, 212]. Эти процессы обычно происходят в областях сосудистой сети с низким сдвигом, где образуются благоприятные условия для лейкоцитарно-тромбоцитарных и лейкоцитарно-

эндотелиальных взаимодействий, особенно при эрозии, нестабильности и разрыве атеросклеротической бляшки [84, 129, 189]. Одним из главных рецепторов на эндотелиальных клетках и тромбоцитах является Р-селектин, связывающийся с Р-селектин гликопротеиновым лигандом-1 (PSGL-1) на поверхности нейтрофилов. При заболеваниях сердечно-сосудистой системы встречается растворимая форма Р-селектина, которая усиливает образующиеся взаимодействия. Межклеточный контакт усиливается за счет взаимодействия макрофагального антигена-1 (интегрин Mac-1), лейкоцитарного функционального антигена 1 (LFA 1) на нейтрофиле и тромбоцитарного гликопротеина Iba, адгезивной молекулой ICAM-2 соответственно [162]. Мост между нейтрофилом и тромбоцитом может образовываться и за счет фибриновых нитей. Тромбоциты способны регулировать эффекторные функции нейтрофилов (образование АФК, секреция гранул, фагоцитоз, нетоз), а активирование тромбоцитов тромбином приводит к респираторному взрыву в интактных нейтрофилах [110, 141]. Кроме всего этого, тромбоциты в своих гранулах содержат регуляторы воспалительных процессов (Р-селектин, TNF- $\beta$ , тромбоспондин-1, RANTES (фактор, регулирующий активацию Т-клеток), тромбоцитарный фактор-4, NAF-2 (фактор активации нейтрофилов-2)). Данные активные молекулы способствуют хемотаксису нейтрофилов, моноцитов, фибробластов в очаг воспаления. Это усиливает адгезию нейтрофилов к нестимулированному эндотелию, высвобождение содержимого вторичных гранул, приводящее к повышению проницаемости сосудистой стенки, что говорит о непосредственном взаимодействии и влиянии друг на друга данных клеток [224, 232]. Образование плотных контактов между клетками также способствует роллингу лейкоцитов по поверхности эндотелиальных клеток и адгезированных тромбоцитов [7]. Во всех этих процессах клеточных контактов играют роль и АФК в качестве регуляторов экспрессии и лиганд-связывающей функции рецепторов на мембранах взаимодействующих клеток [116].

Формирование агрегатов в виде взаимодействий между собой различных клеток крови – распространенное явление при патологии, указывающее на

ответную реакцию организма на повреждение. Для образования таких множественных связей необходима предшествующая активация участвующих клеток. M. G. Egbrink et al. показали, что связь лейкоцитов и тромбоцитов наиболее выражена там, где имеется повреждение сосудистой стенки [226]. В результате разрыва атеросклеротической бляшки активированные тромбоциты начинают адгезировать, агрегировать и формируют тромб благодаря своим многообразным рецепторам, секретируемым цитокинам, метаболитам АК и т.д. Тромбоциты способны образовывать сигнальные и адгезионные взаимодействия с нейтрофилами, лимфоцитами и моноцитами, что обеспечивает миграцию данных клеток в зону повреждения и развития там иммунных и восстановительных реакций. Адгезия нейтрофилов к активированным тромбоцитам протекает через мембранные выступы, которые образуются от прилипших тромбоцитов в условиях потока. Помимо увеличения площади тесного контакта, это способствует обмену различными метаболитами между клетками [95, 130]. Показано образование лейкоцитарно-тромбоцитарных комплексов (ЛТК), которое может являться связующим элементом между тромбообразованием, воспалением и репаративными процессами при патологиях (указывает на участие тромбоцитов не только в гемостазе, но и в воспалительных реакциях) [239]. Пусковым элементом для образования этих комплексов могут служить как тромбоциты, так и лейкоциты. При активации тромбоцитов происходит усиление местного воспаления, повреждение и тромбообразование, обусловленное также и тромбоцитарно-лейкоцитарными связями. Появление ЛТК считается однозначным признаком активации тромбоцитов. Кроме того, как участники воспалительного ответа, тромбоциты способны к генерации АФК, имеют на плазмолемме *Toll*-подобные рецепторы, они продуцируют липидные медиаторы воспаления и взаимодействуют с системой комплемента, а также участвуют в иммунном ответе благодаря коллагеновым рецепторам GPII [207, 211].

ЛТК могут образовываться как пристеночно, так и в центральном потоке крови. У здоровых людей в крови 2,5 % нейтрофилов связаны с тромбоцитами (на одном нейтрофиле от 1 до 4 тромбоцитов), а у больных ИБС до 50 % лейкоцитов

содержат на своей поверхности до 6 тромбоцитов [31, 246]. С возрастом количество агрегатов (тромбоциты+гранулоциты) увеличивается (4,36 % в возрасте 18–25 лет и почти 9 % в возрасте 45–55 лет), также, как и увеличивается экспрессия ими Р-селектина, что может быть связано с усилением хронического вялотекущего воспаления в сосудистой стенке с возрастом [69]. Образование ЛТК происходит и за счет так называемых экстраклеточных везикул (ЭВ), которые несут на своей поверхности специфичные для тромбоцитов антигены, причем активность таких везикул выше активности самих тромбоцитов за счет концентрированного расположения поверхностных рецепторов. Стимулом для их продукции могут выступать такие агенты, как тромбин, АФК, провоспалительные медиаторы, а также стресс и гипоксия [67]. Микровезикулы нейтрофильного происхождения могут приводить к активации коагуляции и адгезии тромбоцитов, к образованию микротромбов в сосудистом русле и системному воспалению сосудов [38]. Белки, РНК и различные маленькие молекулы переносятся между клетками с помощью этих везикул. Такие взаимодействия помогают синхронизировать функции клеток одного типа и координировать функции клеток разных типов. Была показана способность тромбоцитарных ЭВ («тромбоцитарная пыль») связываться с гранулоцитами, причем в них могут переноситься некодирующие регуляторные РНК, модулирующие функции лейкоцитарных клеток [115, 243]. Существует два возможных различных способа доставки содержимого ЭВ к клеткам-мишеням: путем слияния мембран и передачи сигнала через рецепторы [133, 170]. ЭВ являются важной и одной из главных частей воспалительного и коагуляционного процессов, выступая в качестве переносчиков нуклеиновых кислот и различных белковых молекул между взаимодействующими клетками. При ССЗ увеличение тромбоцитарных ЭВ говорит об активации этих клеток, усиливается контакт между нейтрофилами, а в исследовании М. С. Вагида с соавт. у больных с ОКС было выявлено значительное количество ЭВ с экспрессией на поверхности CD41a-антигена, что указывает на их тромбоцитарное происхождение, причем общее число таких везикул было достоверно выше в группе больных, а не у здоровых. Это говорит

об активации тромбоцитов при ОКС, что сопровождается повышенным выделением ЭВ [2, 199].

При взаимодействии же лимфоцитов и тромбоцитов связующую роль играют молекулы клеточной адгезии ICAM, интегрины, селектины, а активация тромбоцитов с помощью коллагена и АДФ приводит к повышению ЛТК. Исследование таких агрегатов позволяет прогнозировать течение патологического процесса и своевременно отменять иммуномодулирующие препараты. Такие межклеточные взаимодействия способствуют проникновению клеток вместе с тромбоцитами непосредственно в ткани, в пораженный участок [8]. АФК, продуцируемые тромбоцитами и нейтрофилами, усиливают прочность рецепторной связи клеток между собой. Кроме того, сами ЛТК начинают продуцировать повышенное количество оксида азота, являющегося первичной АФК и обладающего антиагрегационной активностью [63, 138].

При взаимодействии нейтрофилов и тромбоцитов определенную роль играет соединение триггерного рецептора на поверхности нейтрофила и соответствующего тромбоцитарного лиганда. Это усиливает активацию гранулоцитов. Помимо этого, взаимодействие таких клеток между собой наблюдается при нетозе, то есть образовании нейтрофилами внеклеточных ловушек при активации иммунных реакций организма и при взаимодействии с активированными тромбоцитами [146, 240].

В острой фазе ИМ при увеличении ХЛ тромбоцитов на их поверхности обнаруживается лейкоцитарный антиген CD45, который был получен в результате межклеточного взаимодействия с лейкоцитами или с помощью ЭВ [83]. Степень продукции АФК имеет прямую зависимость от активации тромбоцитов и высвобождения ими содержимого гранул в популяциях CD45+ и CD45-, в то время как лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты (CD45+) генерируют более высокие уровни АФК, чем отдельные тромбоциты (CD45-) [225]. Медиаторами сигнальной взаимосвязи тромбоцитов и лейкоцитов являются хемокины. При ИМ интенсивность лейкоцитарно-тромбоцитарной адгезии возрастает в группе больных относительно группы здоровых людей. При различных заболеваниях

повышается экспрессия Р-селектина. В частности, гиперхолестеринемия приводит к повышению данного белка, что способствует предрасположенности к тромботическим событиям.

У больных с ИБС обнаруженное в периферической крови большое число ЛТК может быть показателем системного воспаления, а также воспалительных процессов в сосудистой стенке, что может приводить к последующему развитию атеротромбоза [214]. Сами тромбоциты являются участниками регенеративных процессов поврежденных участков сосудов путем привлечения костномозговых клеток предшественников. При всем этом, при ОКС ЛТК являются более ранним маркером, нежели стандартные лабораторные тесты повреждения сердечной мышцы [188, 250].

Таким образом, тромбоциты и нейтрофилы способны взаимодействовать друг с другом через рецепторный аппарат (через Р-селектин с его лигандом PSGL-1 на нейтрофилах, рецептор ГПІb $\alpha$  тромбоцитов и Mac-1 CD11b/CD18 на нейтрофилах и другие) либо с помощью обмена веществами в микровезикулах (нейтрофилы способны передавать АК тромбоцитам, что увеличивает ее метаболизм в них). В результате тромбоциты усиливают активацию нейтрофилов путем высвобождения CCL5 (RANTES) и тромбоцитарного фактора 4, а нейтрофилы стимулируют активацию тромбоцитов (путем высвобождения эластазы и катепсина G). Последствия тромбоцитарно-нейтрофильного взаимодействия включают увеличение фагоцитарной активности, увеличение производства АФК, хемотаксис клеток, производство различных биологически активных веществ путем дегрануляции, активацию коагуляции с помощью тканевого фактора, репарацию тканей и генерацию нейтрофилами внеклеточных ловушек, рекрутинг и экстравазацию нейтрофилов (рисунок 3) [97, 117, 162].

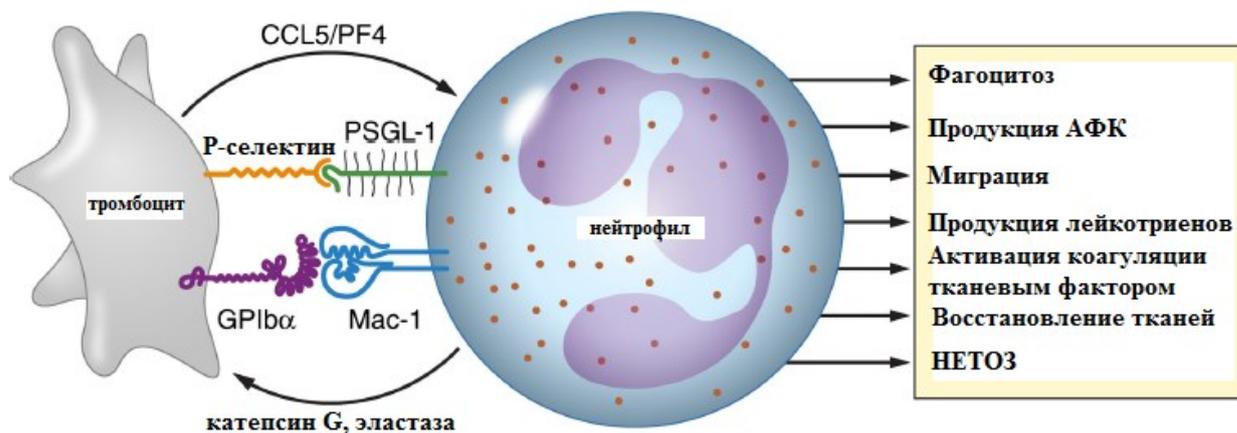


Рисунок 3. Взаимодействие тромбоцитов и нейтрофилов

Примечание. Здесь и на рис. 11, 12: АФК – активные формы кислорода, CCL5 – хемокин, выделяемый Т-клетками при активации, GP – гликопротеин, Mac-1 – макрофагальный антиген-1, PF4 – тромбоцитарный фактор 4, PSGL-1 – Р-селектин гликопротеиновый лиганд-1.

В контексте ОКС образование ЛТК является ранним чувствительным маркером атеротромбоза, а повышение их количества в периферической крови ранним маркером острого ИМ. При сравнении пациентов с нестабильной и стабильной стенокардией было выявлено повышенное содержание ЛТК у первой группы больных. Прием аспирина и клопидогрела приводит к ослаблению взаимодействия тромбоцитов и лейкоцитов, а значит, и к снижению ЛТК, уменьшению воспаления [89, 209].

Несмотря на широкое изучение таких комплексов при сердечно-сосудистой патологии, до конца остается неясным их окончательное влияние и роль: это участники системного ответа организма при повреждениях или местного воспалительного ответа в коронарных сосудах [48].

#### 1.4 Ацетилсалициловая кислота и клопидогрел.

##### Резистентность тромбоцитов к антиагрегантам и ее причины

Ацетилсалициловая кислота (АСК, аспирин) представляет собой лекарственное средство, которое оказывает анальгезирующее, противовоспалительное, жаропонижающее и антиагрегантное действие. Несмотря

на то, что данный препарат был открыт и в дальнейшем синтезирован в доступной для использования в медицинских целях форме более ста лет назад, антиагрегантные свойства АСК были выявлены лишь через пятьдесят лет после начала повсеместного применения аспирина в качестве обезболивающего. Была определена оптимальная доза, при которой АСК имеет максимальную эффективность при минимальных побочных действиях, – 75–150 мг/сутки. Данный препарат оказывает влияние на фермент ЦОГ-1 и ЦОГ-2, но его активность в сотни раз выше в отношении первого изофермента в тромбоцитах. В результате такого действия на тромбоцитарный фермент происходит его необратимое ингибирование, так как тромбоциты не способны заново его синтезировать. В конечном счете прекращается основная реакция, контролируемая ЦОГ-1, превращения АК в активные метаболиты, в том числе тромбоксан А<sub>2</sub> – сильный индуктор агрегации тромбоцитов [81, 88].

Аспирин всасывается путем пассивной диффузии в желудочно-кишечном тракте, биологическая доступность составляет порядка 50 %, а в системе воротной вены и в печени происходит гидролиз, где метаболизируется 50–80 % перорально принятой кислоты. Там же случается и первый контакт с тромбоцитами. Это, в сочетании с быстрым периодом полураспада около 20 минут, снижает действие вещества на ЦОГ эндотелия сосудов, где синтезируется простоциклин, антагонист тромбоксана А<sub>2</sub>. Антиагрегантное действие оказывает именно сама молекула АСК, а остальные воздействия препарата связаны с его активным метаболитом – салициловой кислотой. Применение кишечнорастворимых форм, в отличие от желудочнорастворимых, увеличивает объем пресистемной трансформации, что снижает концентрацию АСК в кровотоке и эффект ингибирования синтеза тромбоксана А<sub>2</sub> [200].

Согласно рекомендациям Европейского кардиологического общества по диагностике и лечению хронических коронарных синдромов, после перенесенного ИМ и/или чрескожного коронарного вмешательства для достижения оптимального антиагрегантного эффекта назначается ДАТ аспирином и пероральным ингибитором P2Y<sub>12</sub>, к которым, в частности, относят и

клопидогрел [25, 125, 221]. Рекомендованной продолжительностью такой терапии является 12-ти месячный период после ОКС, после чрескожного коронарного вмешательства – 6-ти месячный период [77,134, 127]. Показана ДАТ в течение 12 месяцев после КШ с применением аппарата ИК у пациентов со стабильным течением ИБС, а также такая терапия должна быть рассмотрена у пациентов после КШ на работающем сердце, так как при этом проходимость шунта на фоне одновременного приема АСК и клопидогрела оказывается лучше, чем при монотерапии аспирином [79, 119, 235].

Клопидогрел – тиеноперидин, является предшественником активной формы лекарства, необратимо ингибирующего рецептор АДФ P2Y<sub>12</sub>. Предварительно клопидогрел подвергается воздействию кишечных и печеночных ферментов. Около 80–90 % клопидогрела после всасывания инактивируется, а оставшаяся часть окисляется с помощью печеночных энзимов цитохрома P450. В результате образуется тиоловый метаболит, который уже и оказывает своё непосредственное действие на рецептор [50, 66].

Несмотря на большие успехи в медицине, на многочисленные достижения в профилактике осложнений после различных хирургических манипуляций, в кардиологии актуальным остается вопрос тромбозов после операций КШ. По данным Н. М. Nathoe et al., спустя 1 год после подобных операций окклюзию шунтов имеют до 45 % пациентов (из них около 40 % бессимптомные и около 5 % с выраженной симптоматикой) [98]. Одной из причин возникновения данных событий является недостаточный ответ тромбоцитов на антиагрегантную терапию, в частности, препаратами АСК [145]. Понятие резистентности к АСК и клопидогрелу используется довольно часто в литературе, но этот вопрос остается открытым и недостаточно изученным. Снижение чувствительности тромбоцитов проявляется на биохимическом и/или клиническом уровне (сохранение тромбоцитами своих функций на фоне приема препарата и/или возникновение тромботического эпизода, соответственно). Высокая остаточная реактивность тромбоцитов при приеме антиагрегантной терапии является прогностическим фактором ретромбозов. Риск таких событий выше в 2,5–3,5 раза, чем у

чувствительных пациентов. На данный момент нет определенного стандартизированного метода определения резистентности, что ставит под вопрос необходимость использования метода оптической агрегации тромбоцитов для выявления остаточной активности тромбоцитов, так как по данным разных исследований частота устойчивости к АСК широко варьирует, от 5 до 50 % [93, 118, 242]. К клопидогрелу частота встречаемости сниженной чувствительности тромбоцитов также высокая и достигает 30 % [86]. Так, у больных ОКС с подъемом сегмента ST было показано, что резистентность к аспирину наблюдается в 28,9 % случаев. При стабильной стенокардии этот показатель составляет от 0,4 до 29,9 % и вызван, помимо всего прочего, активацией тромбоцитопоза. Также было выяснено, что наличие сопутствующего сахарного диабета у таких больных увеличивает частоту резистентности и достигает 71,4 %, по сравнению с больными ОКС без нарушений углеводного обмена. Глюкоза уменьшает влияние аспирина на агрегацию тромбоцитов, что сопровождается увеличением продукции АФК [91, 161]. Кроме того, функциональная активность тромбоцитов при этом заболевании остается высокой за счет их повышенной чувствительности к индукторам агрегации, а также из-за нарушений в углеводном и липидном обмене [102]. В исследовании больных с подозреваемым ИМ и принимающих аспирин резистентность была выявлена у 38 % с подтвердившимся диагнозом и у 18 % без ИМ [219]. Разные авторы используют разные критерии в лабораторных тестах по определению резистентности. Известен способ диагностики резистентности к АСК, суть которого заключается в том, что у больных ИБС до начала терапии АСК исследуют АДФ-индуцированную и АСК-зависимую агрегацию тромбоцитов и по их разнице находят величину коэффициента ингибирования агрегации (КИА). Величина КИА <24% свидетельствует о резистентности к АСК, при КИА ≥24% – о чувствительности к АСК [45]. При оптическом измерении индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов некоторые исследователи принимают за порог уровень 70 %, при АДФ-агрегации – 60–70 % (либо смотрят разницу между обычной агрегацией с АДФ и при добавлении АСК в пробирку), при агрегации с АК – 20 %, при

агрегации в цельной крови импедансным методом – 18 Ом [13, 15, 80, 204]. Другие исследователи предполагают, что действительной причиной аспиринорезистентности является продолжение выработки тромбоксана А<sub>2</sub> при приеме АСК в качестве антиагрегантного препарата. Если следовать логике, то целесообразным является измерение его содержания, но такой способ является весьма сложным и затратным в контексте финансов и времени. Поэтому используют количественный анализ содержания в моче одного из его метаболитов – 11-дегидротромбоксана В<sub>2</sub>. Выявлена положительная корреляция между концентрацией этого метаболита в моче и частотой сердечно-сосудистых событий на фоне приема аспирина. Чем выше наблюдалась концентрация 11-дегидротромбоксана В<sub>2</sub>, тем выше был риск инсультов и ИМ [94]. У больных с ИБС резистентность к АСК диагностируют с помощью измерения активности до начала терапии НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в тромбоцитах. При этом вычисляется коэффициент кофакторной активности. Однако данный тест трудоемкий и требует немалых затрат, что не дает возможности его применения в рутинной практике при необходимости [44]. Запатентован метод импедансного определения агрегации с коллагеном и с одновременным измерением динамики высвобождения АТФ из гранул тромбоцитов люминесцентным методом при инкубации с АСК. Далее на основании полученных данных рассчитывается индекс резистентности [46]. М. М. Танамян с соавт. предлагают индивидуализировать терапию аспирином путем объединения измерения салицилатов в крови и изучения агрегации тромбоцитов. По их мнению, это позволит убрать фактор недобросовестного соблюдения пациентом графика приема препарата и обнаружить фармакокинетическую невосприимчивость [61]. У всех этих способов определения невосприимчивости клеток к действию аспирина есть свои достоинства и недостатки, которые влияют на их преимущественное использование при разных имеющихся условиях и возможностях.

Выявлено немало причин резистентности к АСК и клопидогрелу. Сюда относят снижение биодоступности (зависит от состояния пациента и от формы

лекарственного средства), одновременное применение других препаратов, функциональное состояние тромбоцитов, их взаимодействие с другими клетками крови, генетическую и эпигенетическую причину, операционную травму, использование ИК во время операции, курение, физическую нагрузку и стресс, системное воспаление [172]. Снижение биодоступности включает в себя низкую приверженность лечению, малую долю всасываемой АСК через желудочно-кишечный тракт (кишечнорастворимая форма), недостижение оптимальной дозы препарата, плохую абсорбцию и конкуренцию с другими лекарствами. Остаточная реактивность может быть результатом повышенного выброса из пула в кровоток тромбоцитов, на которые АСК не воздействовала. У ряда больных возможен усиленный метаболизм АК, повышенная экспрессия ЦОГ-1, существенно превалирующая над базальной продукцией [78, 166]. Помимо этого, в тромбоцитах возможна стресс-индуцированная экспрессия ЦОГ-2, в меньшей степени подвергающаяся влиянию АСК. Также обнаружена способность тромбоцитов синтезировать ЦОГ-1 *de novo* при их стимуляции тромбином или фибриногеном [108]. Возможно снижение синтеза простоциклина из-за превалирования липооксигеназного пути превращения АК над циклооксигеназным. Обнаружены единичные нуклеотидные полиморфизмы генов, отвечающих за синтез ферментов ЦОГ-1 (изменяется взаимодействие с аспирином), ЦОГ-2, тромбоксансинтетазы и рецепторов ГПШб/Ша (повышенное сродство к фибриногену), ГШа (аллель *807T* – фактор риска), коллагена, фактора Виллебранда, приводящие к возникновению аспиринорезистентности тромбоцитов [106, 194]. Интересными являются результаты исследования T. Mattiello et al., где причиной результата снижения чувствительности тромбоцитов к АСК у пациентов после КШ была выявлена высокая экспрессия белка множественной лекарственной устойчивости-4 этими клетками. Данный белок, являясь однонаправленным переносчиком органических анионов, может переносить АСК из тромбоцитов, тем самым снижать ее воздействие на ЦОГ-1 [176, 208].

Резистентность к клопидогрелу также связана с множеством факторов. Одними из самых значимых являются генетические полиморфизмы гена CYP2C19 «с утратой функции», что сопровождается нарушениями метаболизма препарата и, как следствие, высокой активностью тромбоцитов с повышенным риском сердечно-сосудистых событий. Одновременное использование с ингибиторами протонной помпы, которые также метаболизируются через CYP2C19, вызывает межлекарственное фармакокинетическое взаимодействие, приводящее к сниженному ответу тромбоцитов на клопидогрел [35, 36].

Метаболический синдром с сахарным диабетом также были отнесены к возможным причинам возникновения сниженной чувствительности тромбоцитов. Примерно у 30 % таких больных наблюдается подобный феномен. Такое состояние связывают, с одной стороны, с повышенным содержанием глюкозы в крови, вызывающим гликирование факторов свертывания и белков тромбоцитов, участвующих в реакциях свертывания крови. С другой стороны, гиперлипидемия вызывает снижение чувствительности мембранных рецепторов тромбоцитарных клеток, что тоже приводит к аспиринорезистентности и наблюдается в 70 % подобных случаев [114]. В ряде исследований были выявлены метаболические нарушения в тромбоцитах при исследовании больных со стабильной стенокардией. Эти нарушения нарастают по мере увеличения функционального класса и более всего выражены у аспиринорезистентных больных [37].

Zimmerman et al. показали, что у пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование (АКШ), оперативное вмешательство снижает эффект аспирина, а именно чувствительные до операции больные становятся резистентными сразу после операции. Лишь к десятому дню после АКШ возвращается восприимчивость тромбоцитов к АСК [136].

Некоторые исследования показали, что с помощью увеличения в опыте концентрации аспирина, добавляемого в пробирку, можно практически полностью преодолеть резистентность к данному препарату [154]. Еще было показано, что у резистентных людей устойчивость пропадает при обследовании спустя некоторое время, и наоборот, чувствительные испытуемые вдруг

становились резистентными. Было выявлено, что в 80 % случаев резистентность является временным явлением, которое можно нивелировать, устранив причину такого выявленного состояния [153]. Прием таблеток без покрытия, укорочение времени между взятием крови и измерением устойчивости, четкое соблюдение схемы приема препарата, учет одновременного применения других лекарственных средств, разделение всей дневной дозы АСК на несколько приемов, улучшение состояния мембран тромбоцитов с помощью веществ мембранотропного действия ( $\omega$ -3 полиненасыщенные жирные кислоты) – все это способствует переходу обследуемого пациента из резистентной группы в чувствительную [51, 193].

Таким образом, несмотря на фактическое понимание существующей проблемы аспиринорезистентности и выявления множества причин этого процесса, механизм недостаточного ответа тромбоцитов на АСК остается недостаточно изученным, а методика определения данного феномена нуждается в дальнейшей разработке. Решение этой проблемы позволит оптимизировать антиагрегантную терапию у пациентов с ИБС и уменьшить количество тромбозов шунтов после КШ.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Дизайн 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 «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии», г. Красноярск (главный врач – д.м.н., профессор В. А. Сакович), являющимся клинической базой ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» (ректор – д.м.н., профессор А. В. Протопопов). Включение пациентов в диссертационное исследование осуществляли при непосредственном участии врача-кардиолога Т. С. Монгуш. 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 2). На терапии АСК находились 64 пациента и 40 пациентов на ДАТ (АСК+клопидогрел). Всем пациентам выполнялась операция КШ.

Таблица 2 – Клинико-лабораторная характеристика пациентов на фоне терапии АСК и ДАТ (Me (C25-C75))

Характеристика 1	Все пациенты с ИБС (n=104) 2	На терапии АСК (n=64) 3	На терапии ДАТ (n=40) 4	P 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

Продолжение таблицы 2 – Клинико-лабораторная характеристика пациентов на терапии АСК и ДАТ (Ме (С25-С75))

1	2	3	4	5
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 <sup>9</sup> /л	7,57 (6,44-8,60)	7,73 (6,56-8,60)	7,40 (6,10-8,50)	p=0,523
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	228,0 (203,0-276,0)	229,0 (206,0-265,5)	224,5 (199,0-290,5)	p=0,572
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /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

Продолжение таблицы 2 – Клинико-лабораторная характеристика пациентов на терапии АСК и ДАТ (Ме (С25-С75))

1	2	3	4	5
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. Здесь и в табл. 3-10: АСК – ацетилсалициловая кислота, ДАТ – двойная антиагрегантная терапия, ИБС – ишемическая болезнь сердца.

Минимум за пять суток до операции 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 являлась стабильная стенокардия II-III функционального класса, атеросклероз коронарных артерий, подтвержденный коронароангиографией, подписанное информированное согласие.

Критериями исключения являлись почечная недостаточность (скорость клубочковой фильтрации ниже или равная 60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>), 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 «Красноярского краевого центра крови № 1» (главный врач – д.м.н. Н. Г. Филина), сопоставимых по полу и возрасту, не предъявлявшие на момент обследования жалоб соматического профиля, не имеющие в анамнезе хронических инфекционных заболеваний. Дизайн исследования представлен на рисунке 4.

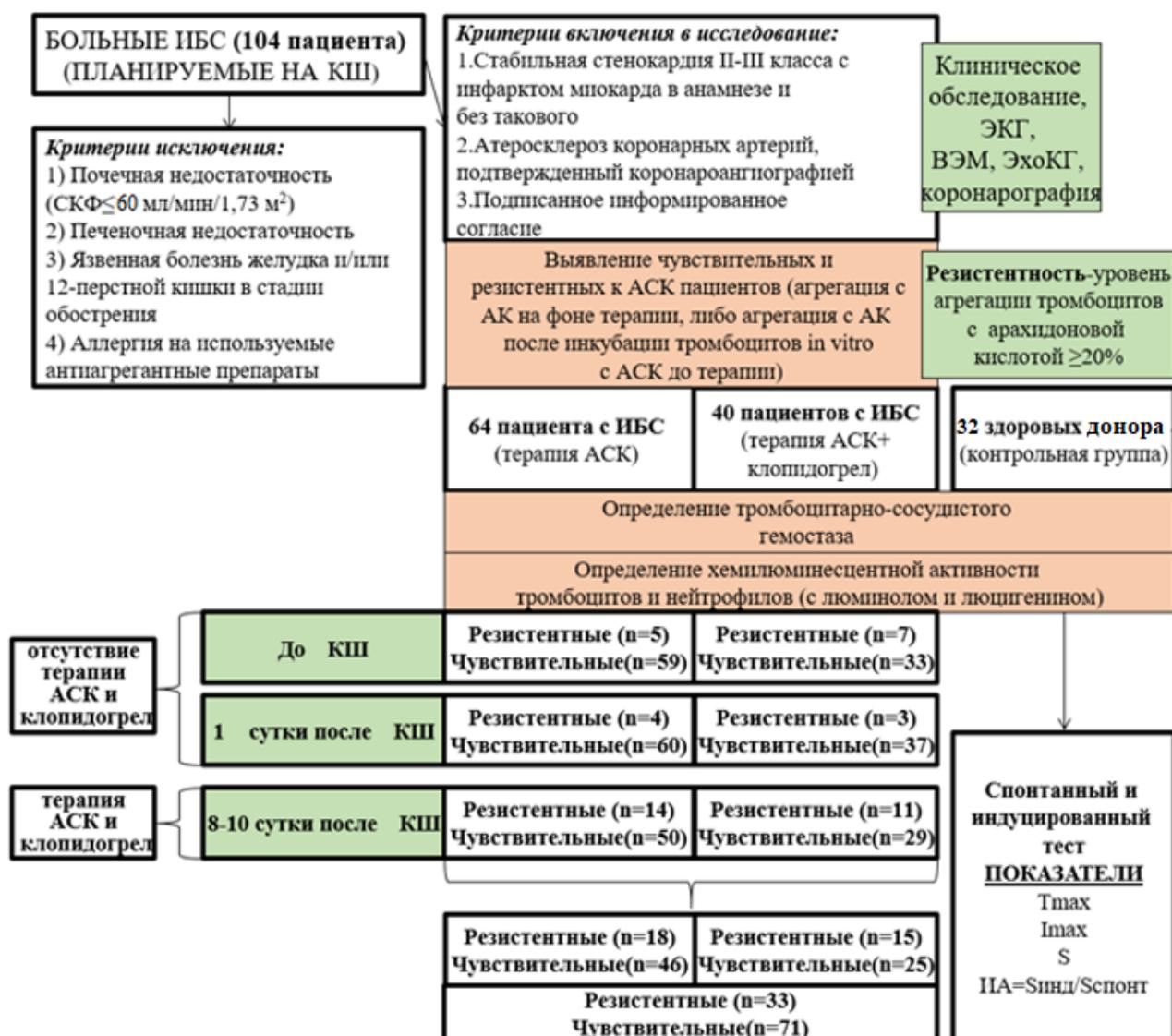


Рисунок 4. Схема алгоритма исследования пациентов с ИБС

Примечание. Здесь и на рис. 5-11: АСК – ацетилсалициловая кислота, АК – арахидоновая кислота, ВЭМ – велоэргометрия, ИА – индекс активации, ИБС – ишемическая болезнь сердца, КШ – коронарное шунтирование, СКФ – скорость клубочковой фильтрации, ХЛ – хемиллюминесценция, ЭКГ – электрокардиография, ЭхоКГ – эхокардиография, I<sub>max</sub> – максимальное значение интенсивности хемиллюминесценции, S – площадь под кривой хемиллюминесценции, T<sub>max</sub> – время выхода на максимум хемиллюминесценции.

Протокол проведения исследования был одобрен локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 76/2016 от 04.05.2017). Исследование было выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и «Правилами

клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в данном исследовании.

## **2.2 Материал исследования**

Материалом исследования являлась венозная кровь пациентов с ИБС и здоровых доноров. Взятие крови (у пациентов с ИБС – трижды) проводили из локтевой вены путем пункции в три вакутейнера с цитратом натрия 3,2 % (5 мл) в соотношении 9:1 и один вакутейнер с гепарином лития (6 мл). Исследование проводилось в клиничко-диагностической лаборатории ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» (г. Красноярск) (заведующий – врач клинической лабораторной диагностики Д. А. Грищенко) и лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии (руководитель – д.м.н., профессор А. А. Савченко) ФГБНУ ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск (директор – д.м.н., профессор Э. В. Каспаров).

## **2.3 Определение агрегации тромбоцитов и резистентности к ацетилсалициловой кислоте**

Кровь из 2 вакутейнеров с цитратом натрия использовали для получения плазмы, богатой тромбоцитами (центрифугирование крови при 140 g в течение 10 минут, при температуре 24<sup>0</sup>C), и плазмы, бедной тромбоцитами (центрифугирование крови при 1500 g в течение 15 минут, температура 24<sup>0</sup>C). В богатой тромбоцитами плазме измеряли агрегацию с АДФ (5 мкМ), коллагеном (2 мкг/мл), адреналином (10 мкМ) и АК (0,5 мМ) на агрегометре Chronolog 490 (США) согласно инструкции к реагентам CHRONO-PAR (США). Если измерение проводилось до начала терапии АСК, то агрегация тромбоцитов с АК

определялась после их инкубации с АСК (3,36 мМ) *in vitro* в течение 3 минут при температуре 37<sup>0</sup>С для прогнозирования аспиринорезистентности [45]. Для инкубации *in vitro* использовалась чистая субстанция АСК ( $\geq 99.0\%$ , А5376 Sigma Aldrich).

Резистентность к АСК определялась при уровне агрегации тромбоцитов с АК  $\geq 20\%$  от максимально возможной амплитуды хотя бы в одной точке наблюдения: на антиагрегантной терапии после КШ или при инкубации, обогащенной тромбоцитами плазмы пациента с АСК *in vitro* до начала оперативного вмешательства и лечения АСК.

## **2.4 Выделение тромбоцитов из периферической крови и определение их хемилюминесцентной активности**

Для определения хемилюминесцентной активности тромбоцитов их предварительно выделяли из одной пробирки венозной крови, смешанной с 3,2 % цитратом натрия [43].

Обогащенную тромбоцитами плазму, после стояния крови в термостате в течение 30 минут, получали путем центрифугирования стабилизированной крови при 140 g в течение 10 минут. Супернатант отбирали и переносили в пластиковую пробирку, доводили буфером № 1 (90 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 36мМ цитрата натрия, 10 мМ ЭДТА, рН 7,2) до разведения в 2 раза. Полученную смесь центрифугировали при 400 g в течение 15 минут. Осадок ресуспендировали в буфере № 1 (5 мл) и повторно центрифугировали при 400 g в течение 1 минуты. Полученный супернатант вновь центрифугировали при 400 g в течение 15 минут. Супернатант аккуратно сливали, к осадку добавляли 10 мл буфера №2 (0,13 М NaCl, 0,02 М трис-НСl-буфера, 0,03 М ЭДТА, 0,015 М глюкозы, рН 7,4). Центрифугировали 50 секунд при 140 g. Оценка количества выделенных тромбоцитов в супернатанте проводилась на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-5000 (Sysmex Inc., США).

Для определения хемилюминесцентной активности тромбоцитов использовали их в количестве  $2 \times 10^7$  клеток на пробу. Реакционная смесь также включала 50 мкл люцигенина или люминола в концентрации 50 мкг/мл, 50 мкл АДФ 0,1 М (для оценки индуцированной продукции АФК) и 250 мкл (для оценки спонтанной продукции АФК) или 200 мкл (для оценки АДФ-индуцированной продукции АФК) буфера (0,13 М NaCl, 0,02 М Трис-HCl буфера, 0,03 М ЭДТА, 0,015 М глюкозы, pH=7,4). Оценку спонтанной и АДФ-индуцированной ХЛ осуществляли 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, индуцированной АДФ, оценивали отношением площади под кривой индуцированной ХЛ к площади под кривой спонтанной ХЛ и определяли как индекс активации (ИА).

## **2.5 Выделение нейтрофилов из периферической крови и определение их хемилюминесцентной активности**

Выделение нейтрофилов осуществляли из крови с гепарином лития по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-урографина с последующей очисткой от прилипающих клеток [72].

Вначале создавали двойной градиент фиколл-урографина: первым в пробирку вносили раствор фиколл-урографина, имеющий плотность  $\rho=1,119$  г/см<sup>3</sup>, затем на него аккуратно наслаивали раствор фиколла с плотностью  $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>. Гепаринизированную кровь наслаивали на двойной градиент фиколл-урографина, центрифугировали 45 минут при 400 g. После центрифугирования полученное нижнее кольцо нейтрофилов отбирали в чистые центрифужные пробирки. Добавляли избыток физиологического раствора и центрифугировали 5 минут при 400 g. Смывали супернатант и к осадку клеток добавляли 1 мл

раствора Хэнкса. Оценка количества выделенных нейтрофилов проводилась на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-5000 (Sysmex Inc., США).

Реакционная смесь для определения хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов состояла из 20 мкл донорской сыворотки АВ(IV)Rh(-), 50 мкл люминола или люцигенина («Sigma», США) в концентрации  $10^{-5}$  М, 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 200 мкл взвеси нейтрофилов ( $4 \times 10^5$  клеток на пробу) и 240 мкл раствора Хэнкса («ПанЭко», Россия) для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хэнкса – для индуцированной. Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на биофлуориметрическом 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 хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной ХЛ к площади под кривой спонтанной ХЛ и определяли как индекс активации (ИА).

## 2.6 Статистический анализ

Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007) и «Microsoft Excel» 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-anamnestических характеристик между группами пациентов использовали непараметрический критерий Краскела – Уоллиса. Для сравнения категориальных переменных использовали критерий  $\chi^2$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 Показатели агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с ИБС в зависимости от их чувствительности к АСК. Хемилюминесцентный метод диагностики резистентности тромбоцитов к АСК

В рамках запланированной работы все обследованные пациенты с ИБС были разделены на две группы в зависимости от результата оптической агрегации тромбоцитов с АК (при предварительной инкубации *in vitro* с АСК или на фоне терапии препаратами АСК). В первую группу был отнесен 71 чувствительный к АСК или АСК+клопидогрел пациент с ИБС (чАСК) (68,3 %), а во вторую группу было отнесено 33 резистентных к АСК или АСК+клопидогрел пациента с ИБС (рАСК) (31,7 %) (проявили резистентность хотя бы в одной точке наблюдения). 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 некоторых пациентов с ИБС в разные периоды наблюдения менялась. Поэтому количество рАСК отличается до начала терапии (12 (11,5 %): 5 на монотерапии АСК и 7 на ДАТ), после КШ (7 (6,7 %): 4 на монотерапии АСК и 3 на ДАТ) и на фоне приема АСК на 8–10-е сутки после КШ (25 (24 %): 14 на монотерапии АСК и 11 на ДАТ) (рисунок 4). Из всех рАСК только 3 (9 %) оказались резистентными на протяжении всего времени наблюдения, то есть при всех трех измерениях. Из 33 рАСК 18 (54,5 %) проявили себя таковыми только на 8–10-е сутки после КШ, то есть на фоне терапии препаратами АСК, но не при инкубации тромбоцитов *in vitro* с АСК. А 9 рАСК, наоборот, проявили свою резистентность к АСК только после инкубации их тромбоцитов *in vitro* с АСК до приема АСК внутрь. Таким образом, 30 рАСК пациентов с ИБС на протяжении исследования меняли свою чувствительность к АСК или АСК+клопидогрел.

По результатам исследования было выявлено, что резистентность тромбоцитов к АСК у пациентов с ИБС можно определять с помощью ХЛ. Это

отображено в патенте нашей научной группы «Способ определения чувствительности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте». Принцип метода заключается в том, что у пациентов с ИБС до начала приема АСК исследуют АДФ-индуцированную люцигенин-зависимую ХЛ тромбоцитов. По значению площади под кривой ХЛ определяют чувствительность тромбоцитов к АСК:  $S < 360000$  у.ед. указывает на недостаточный ответ тромбоцитов, если же  $S \geq 360000$ , то говорят о чувствительности к АСК. То есть ХЛ метод позволяет обнаружить до назначения лечения даже тех резистентных к АСК пациентов с ИБС, которые проявляют данное свойство лишь при приеме лекарственного средства, а в пробирочной пробе с АК до КШ показывают себя чувствительными к АСК. Пограничное значение  $S = 360000$  у.ед. было получено опытным путем сопоставления результатов группы чувствительных и резистентных к АСК пациентов, у которых наблюдались статистически значимые различия по показателю S. Резистентность и чувствительность к АСК подтверждали измерением агрегации тромбоцитов с АК до и после инкубации с АСК до начала лечения антиагрегантами и на 8–10-е сутки лечения (таблица 3).

Таблица 3 – Сравнение предлагаемого способа с лабораторными данными чувствительности к АСК

№ 1	Чувствительность по предполагаемому способу 2	S 3	Чувствительность по оптическому методу с арахидоновой кислотой 4
1	чАСК	2039000	чАСК
2	рАСК	202900	рАСК
3	чАСК	432800	чАСК
4	чАСК	428900	чАСК
5	чАСК	444800	чАСК
6	рАСК	242300	рАСК
7	рАСК	309000	рАСК
8	чАСК	955300	чАСК
9	рАСК	146900	рАСК
10	чАСК	9401000	чАСК
11	чАСК	587500	чАСК

Продолжение таблицы 3 – Сравнение предлагаемого способа с лабораторными данными чувствительности к АСК

1	2	3	4
12	чАСК	702300	чАСК
13	чАСК	629900	чАСК
14	рАСК	314200	рАСК
15	чАСК	656600	чАСК
16	чАСК	6072000	чАСК
17	рАСК	354500	рАСК
18	чАСК	11490000	чАСК
19	рАСК	320100	рАСК
20	чАСК	11850000	чАСК
21	рАСК	312000	рАСК
22	чАСК	11670000	чАСК
23	чАСК	609800	чАСК
24	чАСК	463500	чАСК
25	чАСК	407000	чАСК
26	рАСК	226600	рАСК
27	чАСК	1144000	чАСК
28	чАСК	697300	чАСК
29	чАСК	378400	чАСК
30	рАСК	268700	рАСК
31	рАСК	234200	рАСК
32	чАСК	1651000	чАСК
33	чАСК	398900	чАСК
34	чАСК	582200	рАСК

Примечание. Здесь и в табл. 4-10: рАСК – резистентный к АСК и/или АСК и клопидогрелу пациент с ИБС, чАСК – чувствительный к АСК и/или АСК и клопидогрелу пациент с ИБС, S – площадь под кривой хемилюминесценции.

При сравнении агрегационной активности тромбоцитов всех групп пациентов с контрольной группой было выявлено, что до операции КШ амплитуда агрегационной кривой с АДФ у пациентов с ИБС ниже. У чАСК снижена амплитуда агрегационной кривой с АК, а у всех рАСК повышена амплитуда агрегационной кривой с АК после предварительной инкубации тромбоцитов с АСК. После операции КШ у всех пациентов, независимо от чувствительности к АСК, снижены амплитуды агрегационных кривых с коллагеном, АДФ, адреналином и АК, а в первые сутки после КШ у рАСК (монотерапия АСК) сохраняется повышенной еще и амплитуда агрегационной

кривой с АК после предварительной инкубации тромбоцитов с АСК. У чАСК на 8–10-е сутки после КШ на фоне терапии АСК снижена амплитуда агрегационной кривой с АК после предварительной инкубации тромбоцитов с АСК в сравнении с контрольной группой (таблица 4).

В группах рАСК, независимо от антиагрегантной терапии, до операции КШ амплитуда агрегационной активности с АК после предварительной инкубации тромбоцитов с АСК оказалась выше по сравнению с группой чАСК. Такая же картина наблюдается и на 8–10-е сутки после КШ, кроме того у рАСК повышена амплитуда агрегационной активности с АК на фоне приема препаратов АСК, до инкубации тромбоцитов с АСК, а в группе рАСК (ДАТ) наблюдается еще и снижение амплитуды агрегационной активности с АДФ. В первые сутки после КШ в группе рАСК (монотерапия АСК) повышена амплитуда агрегационной активности с АК до и после инкубации тромбоцитов с АСК по сравнению с группой чАСК (таблица 4).

Среди рАСК значимых различий между амплитудами агрегационных кривых в зависимости от антиагрегантной терапии выявлено не было.

Таблица 4 – Агрегационная активность тромбоцитов у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

Амплитуда агрегационной кривой, % 1	Контроль (n=32) 2	чАСК (n=71) 3	рАСК (монотерапия АСК) (n=18) 4	рАСК (ДАТ) (n=15) 5
<b>До КШ</b>				
Коллаген	65 (61-72)	65 (56-75)	64 (59-70)	57 (44-68);
АДФ	69 (59-78)	51 (31-63); $p_1 < 0,001$	60 (52-69); $p_1 = 0,012$	60 (50-65); $p_1 = 0,007$
Адреналин	59 (38-83)	55 (28-68)	63 (42-72)	47 (25-68)
АК	63 (59-69)	55 (42-67); $p_1 = 0,046$	58 (44-65)	56 (41-69)
АК + АСК	4 (2-5)	4 (3-6)	8 (5-16); $p_1 < 0,001$ ; $p_2 = 0,001$	8 (6-25); $p_1 = 0,001$ ; $p_2 = 0,002$

Продолжение таблицы 4 – Агрегационная активность тромбоцитов у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

1	2	3	4	5
<b>Первые сутки после КШ</b>				
Коллаген	65 (61-72)	43 (24-60); $p_1 < 0,001$	47 (26-67); $p_1 = 0,011$	39 (25-59); $p_1 = 0,001$
АДФ	69 (59-78)	45 (34-51); $p_1 < 0,001$	41 (17-66); $p_1 < 0,001$	41 (27-56); $p_1 < 0,001$
Адреналин	59 (38-83)	30 (20-45); $p_1 < 0,001$	41 (17-51); $p_1 = 0,01$	25 (15-45); $p_1 = 0,003$
АК	63 (59-69)	20 (7-47); $p_1 < 0,001$	46 (27-61); $p_1 = 0,001$ ; $p_2 = 0,008$	25 (18-44); $p_1 < 0,001$
АК + АСК	4 (2-5)	4 (2-7)	10 (5-16); $p_1 = 0,007$ ; $p_2 = 0,003$	5 (3-8)
<b>8-10-е сутки после КШ на фоне терапии АСК</b>				
Коллаген	65 (61-72)	42 (26-50); $p_1 < 0,001$	41 (36-61); $p_1 = 0,001$	37 (15-54); $p_1 < 0,001$
АДФ	69 (59-78)	31 (21-43); $p_1 < 0,001$	39 (30-49); $p_1 < 0,001$	19 (14-25); $p_1 < 0,001$ ; $p_2 = 0,014$
Адреналин	59 (38-83)	26 (15-42); $p_1 < 0,001$	33 (19-55); $p_1 = 0,014$	36 (25-41); $p_1 = 0,019$
АК	63 (59-69)	4 (2-8); $p_1 < 0,001$	35 (19-55); $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,001$	28 (19-40); $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,001$
АК + АСК	4 (2-5)	2 (1-3); $p_1 < 0,001$	5 (3-11); $p_2 < 0,001$	4 (2-6); $p_2 = 0,003$

Примечание:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы;  $p_2$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями группы ЧАСК пациентов с ИБС. Здесь и в табл. 5-10: АК – арахидоновая кислота, КШ – коронарное шунтирование.

### 3.2 Показатели хемилюминесценции тромбоцитов у пациентов с ИБС, в том числе в зависимости от их чувствительности к АСК

В качестве индикатора продукции тромбоцитами АФК как показателя их активности у пациентов с ИБС исследованы параметры ХЛ этих клеток крови с люминолом и люцигенином в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте.

До операции КШ, на фоне отсутствующей терапии антиагрегантными препаратами обнаружены достоверные отличия между контрольной группой и пациентами с ИБС в таких показателях ХЛ тромбоцитов, как  $I_{max}$  ХЛ с

люминолом и люцигенином (в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте), а также Tmax ХЛ с люцигенином (в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте) (рисунок 5). Продукция АФК оказалась выше у пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми людьми.

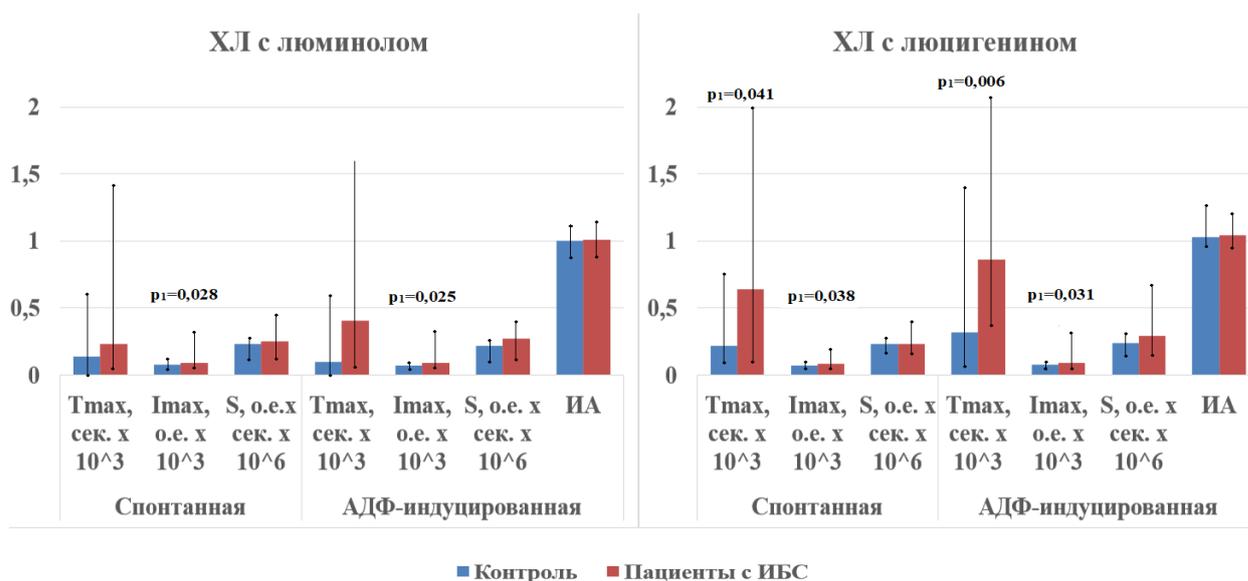


Рисунок 5. Хемилюминесцентные показатели тромбоцитов у пациентов с ИБС до КШ (Ме (С25-С75))

Примечание:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы;  $p_2$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями периода наблюдения до КШ у пациентов с ИБС.

В первые сутки после КШ в группе пациентов с ИБС сохраняется тенденция высоких показателей ХЛ тромбоцитов с люминолом (Imax, S в спонтанном тесте и Imax в АДФ-индуцированном тесте) и Tmax ХЛ с люцигенином в спонтанном тесте (рисунок 6).

Похожие результаты выявлены и на 8–10-е сутки после КШ на фоне антиагрегантной терапии. В этот период наблюдения значения показателей ХЛ тромбоцитов у пациентов с ИБС оказались достоверно выше, чем у людей из контрольной группы. К таким параметрам относится Imax ХЛ с люминолом и люцигенином (в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте), S в спонтанном тесте с люминолом и Tmax АДФ-индуцированной ХЛ с люминолом (рисунок 7).

У пациентов с ИБС в первые сутки после КШ значения таких показателей АДФ-индуцированной ХЛ с люцигенином, как  $I_{max}$  и  $T_{max}$ , оказались статистически значимо ниже аналогичных параметров до операции КШ (рисунок 5,6). На 8–10-е сутки после КШ на фоне терапии антиагрегантами S с люминолом в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте были выше, чем до операции КШ (рисунок 5,7).

Сравнение ХЛ показателей тромбоцитов проводилось также в зависимости от чувствительности пациентов с ИБС к АСК или АСК+клопидогрел и терапии антиагрегантными препаратами. По результатам исследования было обнаружено, что у чАСК статистически значимо выше значения многих показателей ХЛ тромбоцитов по сравнению с контрольной группой. До операции КШ это ХЛ с люцигенином ( $T_{max}$  и  $I_{max}$  в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте) и люминолом ( $I_{max}$  в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте и S в АДФ-индуцированном тесте). В первые сутки после операции КШ это ХЛ с люцигенином ( $T_{max}$  и  $I_{max}$  в спонтанном тесте) и люминолом ( $I_{max}$  и S в спонтанном тесте,  $T_{max}$  и  $I_{max}$  в АДФ-индуцированном тесте). На 8–10-е сутки после операции КШ это ХЛ с люцигенином ( $T_{max}$  и  $I_{max}$  в спонтанном тесте,  $I_{max}$  и S в АДФ-индуцированном тесте) и люминолом ( $I_{max}$  и S в спонтанном тесте,  $T_{max}$ ,  $I_{max}$  и S в АДФ-индуцированном тесте) (таблицы 5, 6).

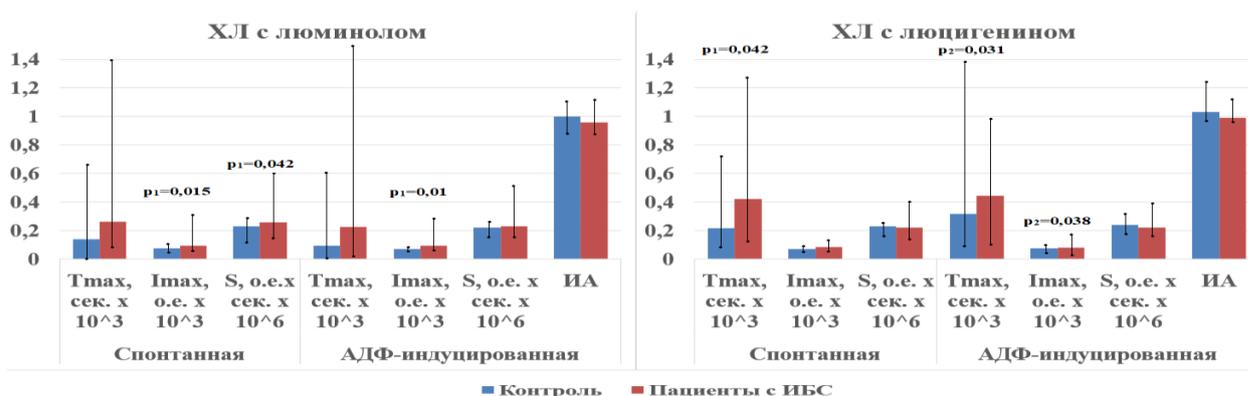


Рисунок 6. Хемилюминесцентные показатели тромбоцитов у пациентов с ИБС в первые сутки после КШ (Ме (С25-С75))

Примечание: то же, что и для рисунка 5.

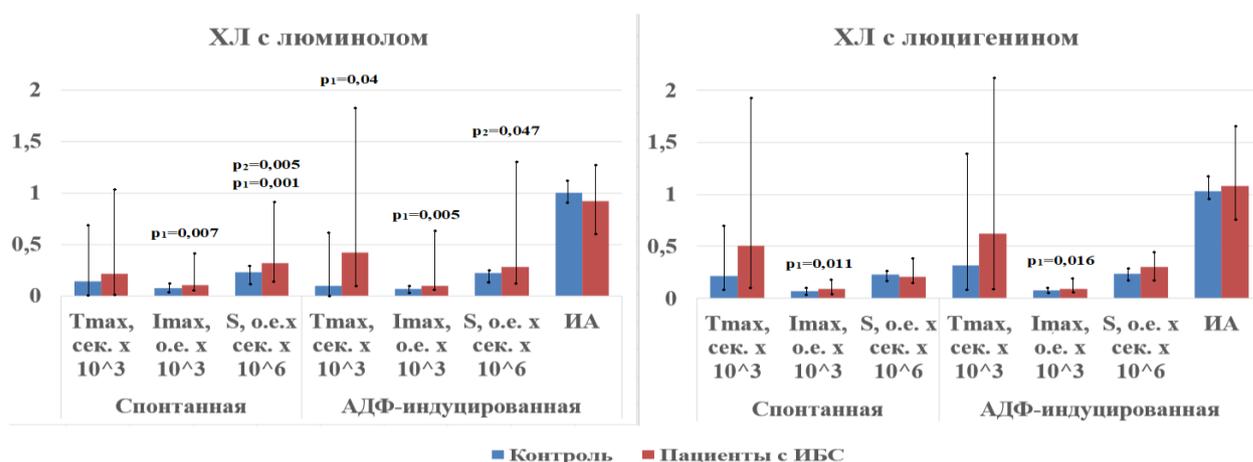


Рисунок 7. Хемилюминесцентные показатели тромбоцитов у пациентов с ИБС на 8-10-е сутки после КШ (Ме (С25-С75))

Примечание: то же, что и для рисунка 5.

Таблица 5 – Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люцигенином у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

Показатели 1	Контроль (n=32) 2	чАСК (n=71) 3	рАСК (монотерапия АСК) (n=18) 4	рАСК (ДАТ) (n=15) 5
<b>До КШ</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	219 (80-799)	713 (79-2581); p <sub>1</sub> =0,027	611 (286-1782)	212 (70-560)
Imax, о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,074 (0,059- 0,087)	0,080 (0,072- 0,350); p <sub>1</sub> =0,006	0,061 (0,045- 0,078); p <sub>2</sub> =0,006	0,088 (0,070-0,096)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,225 (0,171- 0,266)	0,280 (0,160- 0,550)	0,136 (0,110- 0,290)	0,227 (0,162-0,233)
Индукционная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	319 (71-1410)	887 (346-2965); p <sub>1</sub> =0,004	764 (509-1928)	636 (287-1201)
Imax, о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,076 (0,061- 0,082)	0,100 (0,059- 0,400); p <sub>1</sub> =0,013	0,071 (0,050- 0,160)	0,100 (0,075-0,132)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,241 (0,161- 0,298)	0,310 (0,140- 0,700);	0,234 (0,175- 0,408)	0,270 (0,202-0,312)
ИА	1,03 (0,96- 1,25)	1,05 (0,89-1,18)	1,13 (0,98-1,35)	0,98 (0,93-1,65)

Продолжение таблицы 5 – Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люцигенином у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

1	2	3	4	5
<b>Первые сутки после КШ</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
Т <sub>max</sub> , сек.	219 (80-799)	555 (261-1978); p <sub>1</sub> =0,008	408 (95-710)	212 (89-382)
И <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,074 (0,059-0,087)	0,090 (0,069-0,132); p <sub>1</sub> =0,036; p <sub>4</sub> =0,04	0,065 (0,050-0,077); p <sub>2</sub> =0,006	0,097 (0,086-0,117); p <sub>1</sub> =0,049
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,225 (0,171-0,266)	0,259 (0,145-0,534);	0,182 (0,120-0,246)	0,360 (0,220-0,400)
Индукцированная хемилюминесценция				
Т <sub>max</sub> , сек.	319 (71-1410)	435 (137-981); p <sub>4</sub> =0,004	509 (66-799)	282 (178-2519)
И <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,076 (0,061-0,082)	0,090 (0,063-0,286)	0,058 (0,054-0,080); p <sub>2</sub> =0,006	0,090 (0,072-0,097)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,241 (0,161-0,298)	0,276 (0,145-0,610)	0,176 (0,162-0,218)	0,314 (0,156-0,354)
ИА	1,03 (0,96-1,25)	1,03 (0,96-1,17)	0,92 (0,81-1,02)	0,89 (0,79-0,99); p <sub>2</sub> =0,006
<b>8-10 сутки после КШ на фоне терапии АСК</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
Т <sub>max</sub> , сек.	219 (80-799)	714 (180-2042); p <sub>1</sub> =0,015	212 (88-713)	124 (0-464); p <sub>2</sub> =0,006
И <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,074 (0,059-0,087)	0,100 (0,078-0,295); p <sub>1</sub> =0,002	0,064 (0,055-0,092)	0,085 (0,078-0,111)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,225 (0,171-0,266)	0,251 (0,115-0,658)	0,172 (0,155-0,214)	0,310 (0,215-0,335)
Индукцированная хемилюминесценция				
Т <sub>max</sub> , сек.	319 (71-1410)	716 (78-2708)	574 (51-1147)	302 (35-1232)
И <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,076 (0,061-0,082)	0,110 (0,080-0,316); p <sub>1</sub> =0,001	0,058 (0,050-0,097); p <sub>2</sub> =0,006	0,086 (0,076-0,118)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,241 (0,161-0,298)	0,330 (0,180-0,480); p <sub>1</sub> =0,037	0,136 (0,075-0,323); p <sub>2</sub> =0,006; p <sub>4</sub> =0,037	0,244 (0,124-0,329)
ИА	1,03 (0,96-1,25)	1,10 (0,88-2,01); p <sub>4</sub> =0,025	1,02 (0,43-1,38)	0,92 (0,50-1,10)

Примечание: p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями контрольной группы; p<sub>2</sub> – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями чАСК пациентов с ИБС; p<sub>3</sub> – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями рАСК

пациентов с ИБС (монотерапия АСК);  $p_4$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями периода наблюдения до КШ у пациентов с ИБС. Здесь и в табл. 6-10: ИА – индекс активации,  $I_{\max}$  – максимальное значение интенсивности хемилюминесценции,  $T_{\max}$  – время выхода на максимум хемилюминесценции.

В группе рАСК (монотерапия АСК) по сравнению с контрольной группой выше оказался лишь показатель  $T_{\max}$  в АДФ-индуцированном тесте с люминолом до операции КШ (таблица 6). В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с контрольной группой выше оказались такие показатели ХЛ:  $I_{\max}$  в спонтанном тесте с люцигенином и  $I_{\max}$  в АДФ-индуцированном тесте и S в спонтанном тесте с люминолом (в первые сутки после операции КШ),  $I_{\max}$  в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте с люминолом (на 8–10-е сутки после операции КШ) (таблицы 5,6).

В группе рАСК (монотерапия АСК) по сравнению с группой чАСК значения показателей S в АДФ-индуцированном тесте с люминолом и  $I_{\max}$  в спонтанном тесте с люцигенином до операции КШ оказались достоверно ниже (таблицы 5,6). Такая же тенденция наблюдалась и в первые сутки после операции КШ в отношении  $I_{\max}$  в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте с люцигенином (таблица 5), а также на 8–10-е сутки после операции КШ в отношении  $I_{\max}$  в АДФ-индуцированном тесте с люминолом и люцигенином и S в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином (таблицы 5,6).

В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с группой чАСК значения показателей ИА в тесте с люцигенином в первые сутки после операции КШ (таблица 5), а также  $T_{\max}$  в АДФ-индуцированном тесте с люминолом и  $T_{\max}$  в спонтанном тесте с люцигенином на 8–10-е сутки после операции КШ были достоверно ниже (таблицы 5,6).

Статистически значимые различия между группами рАСК на монотерапии АСК и терапии АСК+клопидогрел были обнаружены лишь по показателю S в АДФ-индуцированном тесте с люминолом до операции КШ. Он оказался выше в группе рАСК (ДАТ) (таблица 6).

У чАСК по сравнению с периодом до КШ в первые сутки после КШ снизились S в АДФ-индуцированном тесте с люминолом, Tmax в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином и повысилась Imax в спонтанном тесте с люцигенином, а к 8–10-м суткам после операции повысились S в спонтанном тесте с люминолом и ИА с люцигенином, снизилось Tmax в спонтанном тесте с люминолом (таблицы 5,6). В группе рАСК (монотерапия АСК) на 8-10 сутки после операции снизилась S в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином по сравнению с периодом до КШ (таблица 5).

Таблица 6 – Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люминолом у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

Показатели 1	Контроль (n=32) 2	чАСК (n=71) 3	рАСК (монотерапия АСК) (n=18) 4	рАСК (ДАТ) (n=15) 5
<b>До КШ</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	141 (0-738)	349 (45-1666)	255 (74-1748)	95 (71-319);
Imax, о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,077 (0,057-0,085)	0,100 (0,070-0,385); p <sub>1</sub> =0,01	0,060 (0,047-0,273)	0,081 (0,079-0,339)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,226 (0,110-0,287)	0,270 (0,125-0,812)	0,142 (0,084-0,258)	0,300 (0,210-0,350)
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	95 (0-637)	349 (0-1653);	710 (88-2197); p <sub>1</sub> =0,024	776 (61-1426)
Imax, о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,070 (0,059-0,081)	0,092 (0,067-0,417); p <sub>1</sub> =0,008	0,060 (0,051-0,093)	0,100 (0,072-0,434)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,222 (0,146-0,258)	0,280 (0,180-0,594) p <sub>1</sub> =0,041	0,148 (0,115-0,260) p <sub>2</sub> =0,006	0,313 (0,182-0,367); p <sub>3</sub> =0,025
ИА	1,00 (0,86-1,10)	0,98 (0,86-1,13)	1,09 (0,98-1,19)	1,02 (0,67-1,11)
<b>Первые сутки после КШ</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	141 (0-738)	267 (0-1120)	159 (90-2189)	141 (51-976)
Imax, о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,077 (0,057-0,085)	0,110 (0,069-0,330); p <sub>1</sub> =0,012	0,072 (0,049-0,088)	0,093 (0,084-0,185)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,226 (0,110-0,287)	0,262 (0,165-0,763); p <sub>1</sub> =0,043	0,210 (0,085-0,329)	0,340 (0,299-0,445); p <sub>1</sub> =0,015

Продолжение таблицы 6 – Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люминолом у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

1	2	3	4	5
<b>Индукцированная хемилюминесценция</b>				
Tmax, сек.	95 (0-637)	533 (71-1653); p <sub>1</sub> =0,046	89 (0-1514)	71 (0-266)
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,070 (0,059-0,081)	0,096 (0,067-0,300); p <sub>1</sub> =0,011	0,077 (0,053-0,103)	0,083 (0,078-0,293); p <sub>1</sub> =0,024
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,222 (0,146-0,258)	0,237 (0,138-0,610); p <sub>4</sub> =0,014	0,170 (0,114-0,234)	0,326 (0,155-0,360)
ИА	1,00 (0,86-1,10)	0,96 (0,83-1,10)	0,96 (0,84-1,17)	0,99 (0,81-1,19)
<b>8-10 сутки после КШ на фоне терапии АСК</b>				
<b>Спонтанная хемилюминесценция</b>				
Tmax, сек.	141 (0-738)	238 (26-1484); p <sub>4</sub> =0,046	382 (0-1018)	71 (0-699)
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,077 (0,057-0,085)	0,110 (0,079-1,100); p <sub>1</sub> =0,001	0,060 (0,056-0,125)	0,135 (0,081-0,157); p <sub>1</sub> =0,035
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,226 (0,110-0,287)	0,380 (0,236-1,880); p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>4</sub> =0,041	0,190 (0,170-0,340)	0,304 (0,170-0,388)
<b>Индукцированная хемилюминесценция</b>				
Tmax, сек.	95 (0-637)	564 (85-1902); p <sub>1</sub> =0,01	355 (71-2007)	36 (0-468); p <sub>2</sub> =0,006
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,070 (0,059-0,081)	0,100 (0,080-1,230); p <sub>1</sub> <0,001	0,062 (0,048-0,107); p <sub>2</sub> =0,006	0,118 (0,077-0,135); p <sub>1</sub> =0,041
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	0,222 (0,146-0,258)	0,340 (0,150-2,040); p <sub>1</sub> =0,038	0,190 (0,103-0,383)	0,247 (0,129-0,360)
ИА	1,00 (0,86-1,10)	0,88 (0,56-1,42)	0,92 (0,50-1,06)	0,83 (0,55-1,26)

Примечание: то же, что и для таблицы 5.

### 3.3 Показатели хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с ИБС, в том числе в зависимости от их чувствительности к АСК

В качестве индикатора продукции нейтрофилами АФК как показателя их активности у пациентов с ИБС исследованы параметры ХЛ этих клеток крови с люминолом и люцигенином в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте.

До операции КШ на фоне отсутствующей терапии антиагрегантными препаратами в группе пациентов с ИБС выявлены достоверно высокие значения параметров ХЛ нейтрофилов относительно здоровой группы. К таким параметрам относится  $T_{max}$  зимозан-индуцированной ХЛ и ИА с люминолом,  $T_{max}$  в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте с люцигенином, а также  $S$  зимозан-индуцированной ХЛ с люцигенином (рисунок 8).

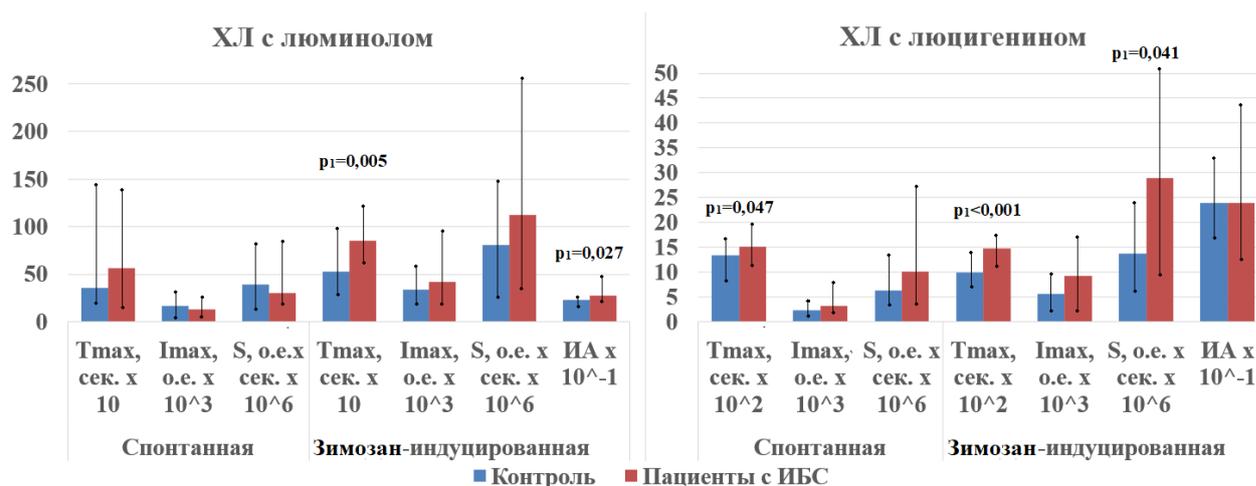


Рисунок 8. Хемилюминесцентные показатели нейтрофилов у пациентов с ИБС до КШ (Ме (С25-С75))  
Примечание: то же, что и для рисунка 5.

В первые сутки после КШ количество показателей ХЛ нейтрофилов, значения которых оказались значительно выше у пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми людьми, увеличилось. Это касается параметров зимозан-индуцированной ХЛ с люминолом ( $T_{max}$ ,  $I_{max}$ ,  $S$  и ИА) и ХЛ с люцигенином в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте ( $I_{max}$  и  $S$ ) (рисунок 9).

На 8–10-е сутки после КШ на фоне антиагрегантной терапии  $T_{max}$  зимозан-индуцированной ХЛ с люминолом и люцигенином,  $I_{max}$  спонтанной ХЛ с люцигенином,  $S$  ХЛ с люцигенином в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте оказались значимо выше в группе пациентов с ИБС в отличие от группы сравнения (рисунок 10).

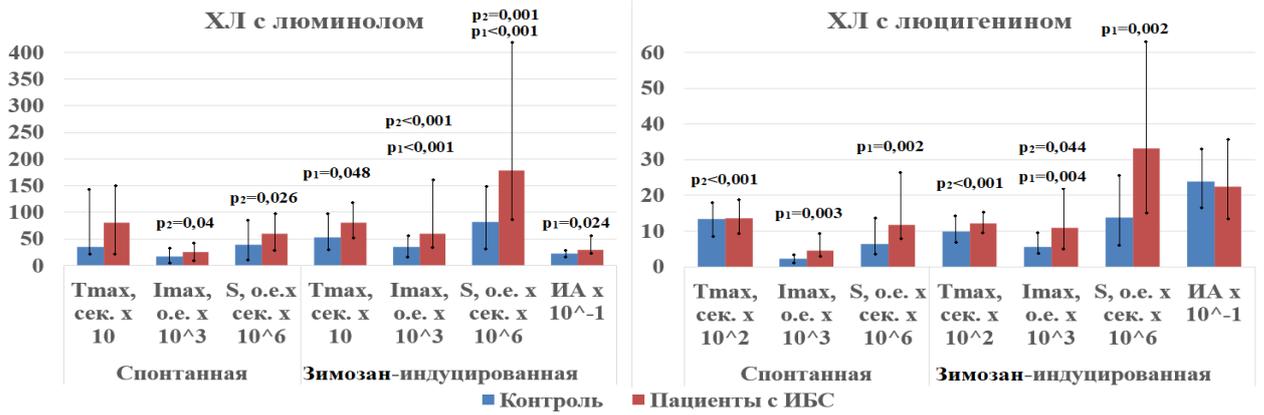


Рисунок 9. Хемилюминесцентные показатели нейтрофилов у пациентов с ИБС в первые сутки после КШ (Ме (С25-С75))  
Примечание: то же, что и для рисунка 5.

У пациентов с ИБС в первые сутки после КШ наблюдались статистически значимые различия в параметрах ХЛ с люминолом (увеличение Imax и S в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте) и ХЛ с люцигенином (укорочение Tmax в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте и увеличение Imax в зимозан-индуцированном тесте) по сравнению с аналогичными показателями до операции КШ (рисунок 9). На 8–10-е сутки после КШ на фоне терапии антиагрегантами выявлено лишь укорочение Tmax зимозан-индуцированной ХЛ с люцигенином по сравнению с аналогичными показателями периода наблюдения до КШ (рисунок 10).

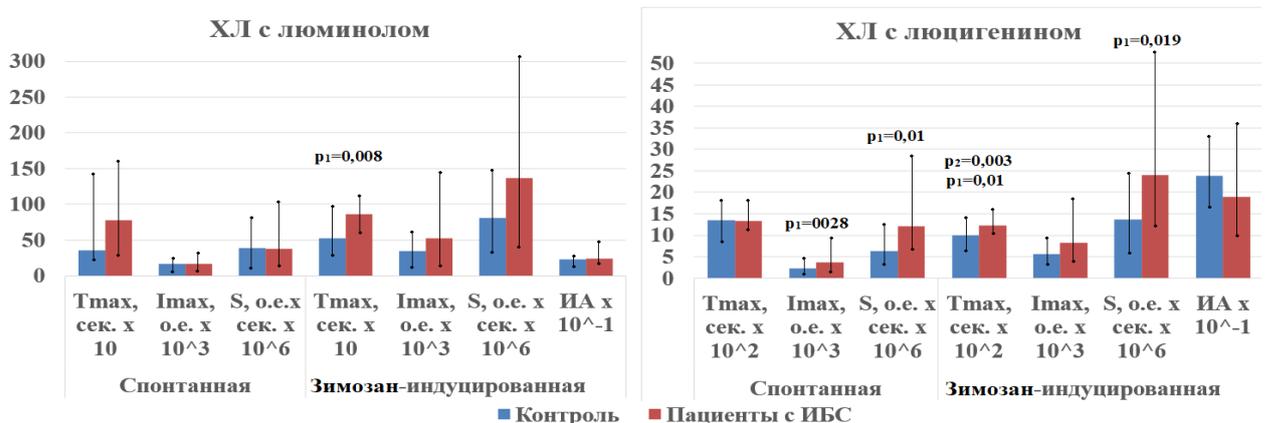


Рисунок 10. Хемилюминесцентные показатели нейтрофилов у пациентов с ИБС на 8–10-е сутки после КШ (Ме (С25-С75))  
Примечание: то же, что и для рисунка 5.

Сравнение ХЛ показателей нейтрофилов проводилось также в зависимости от чувствительности пациентов с ИБС к АСК или АСК+клопидогрел и терапии антиагрегантными препаратами. По результатам исследования было обнаружено, что у чАСК статистически значимо выше значения многих показателей ХЛ нейтрофилов по сравнению с контрольной группой. До операции КШ это ХЛ с люцигенином (Тmax и S в зимозан-индуцированном тесте) и люминолом (Тmax в зимозан-индуцированном тесте и ИА). В первые сутки после операции КШ это ХЛ с люцигенином и люминолом (I<sub>max</sub> и S в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте). На 8–10-е сутки после операции КШ это ХЛ с люцигенином (I<sub>max</sub> и S в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте и Тmax в зимозан-индуцированном тесте) и люминолом (Тmax в зимозан-индуцированном тесте) (таблицы 7,8).

В группе рАСК (монотерапия АСК) по сравнению с контрольной группой выше оказались показатели Тmax в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте с люцигенином до операции КШ и ИА в тесте с люминолом до КШ и в первые сутки после КШ (таблицы 7,8). В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с контрольной группой выше оказались такие показатели ХЛ, как Тmax в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином (до КШ), I<sub>max</sub> в зимозан-индуцированном тесте с люминолом (в первые сутки после КШ), Тmax в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте с люминолом, а также I<sub>max</sub> и S в зимозан-индуцированном тесте с люминолом и люцигенином (на 8–10-е сутки после КШ) (таблицы 7,8).

В группе рАСК (монотерапия АСК) по сравнению с группой чАСК достоверно ниже оказались такие показатели, как I<sub>max</sub> в спонтанном тесте с люцигенином (до КШ), I<sub>max</sub> и S в спонтанном тесте с люминолом и люцигенином, а также I<sub>max</sub> и S в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином (в первые сутки после КШ) (таблицы 7,8).

В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с группой чАСК оказалось выше лишь Тmax в спонтанном тесте с люминолом на 8–10-е сутки после операции КШ (таблица 8).

Таблица 7 – Хемилюминесцентная активность нейтрофилов с люцигенином у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

Показатели 1	Контроль (n=32) 2	чАСК (n=71) 3	рАСК (монотерапия АСК) (n=18) 4	рАСК (ДАТ) (n=15) 5
<b>До КШ</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	1344 (837-1731)	1512 (1130-1935)	1730 (1155-2571); p <sub>1</sub> =0,026	1585 (1282-2185)
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	2,30 (1,12-4,36)	3,50 (1,30-7,60)	1,20 (0,43-2,90); p <sub>2</sub> =0,026	4,90 (1,26-18,30)
S, о.е. × сек. × 10 <sup>6</sup>	5,39 (3,19-13,68)	12,20 (3,90-27,30)	4,44 (1,65-9,99)	14,92 (4,05-51,33)
Индукцированная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	996 (622-1447)	1541 (1147-1784); p <sub>1</sub> <0,001	1237 (1065-1807); p <sub>1</sub> =0,035	1548 (1130-2026); p <sub>1</sub> =0,016
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	5,55 (3,03-10,29)	9,50 (3,80-16,90)	3,32 (1,14-11,30)	12,41 (3,59-32,13)
S, о.е. × сек. × 10 <sup>6</sup>	13,77 (5,75-25,22)	32,22 (10,50-48,30); p <sub>1</sub> =0,016	11,41 (3,38-33,80)	39,56 (9,77-120,15)
ИА	2,39 (1,60-3,39)	2,28 (1,24-4,68)	3,31 (2,65-4,37)	2,90 (1,22-5,61)
<b>Первые сутки после КШ</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	1344 (837-1731)	1272 (916-1809); p <sub>4</sub> =0,008	1375 (955-1935); p <sub>4</sub> =0,049	1530 (1155-2072)
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	2,30 (1,12-4,36)	6,45 (2,80-13,08); p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>4</sub> =0,036	2,76 (1,16-5,51); p <sub>2</sub> =0,022	4,04 (2,99-4,95)
S, о.е. × сек. × 10 <sup>6</sup>	5,39 (3,19-13,68)	19,43 (8,50-31,94); p <sub>1</sub> <0,001	5,60 (3,07-10,16); p <sub>2</sub> =0,009	15,51 (4,85-17,27)
Индукцированная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	996 (622-1447)	1201 (888-1482); p <sub>4</sub> <0,001	1222 (1107-1629)	1341 (977-1509); p <sub>4</sub> =0,048
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	5,55 (3,03-10,29)	15,08 (7,90-23,02); p <sub>1</sub> <0,001	3,42 (3,18-14,10); p <sub>2</sub> =0,038	9,88 (4,36-17,93)
S, о.е. × сек. × 10 <sup>6</sup>	13,77 (5,75-25,22)	37,84 (20,33-65,90); p <sub>1</sub> <0,001	11,48 (8,98-36,78); p <sub>2</sub> =0,022	31,91 (15,31-66,24)
ИА	2,39 (1,60-3,39)	2,18 (1,38-3,42)	2,54 (2,00-3,86)	2,45 (0,98-3,31)

Продолжение таблицы 7 – Хемилюминесцентная активность нейтрофилов с люцигенином у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

1	2	3	4	5
<b>8-10 сутки после КШ на фоне терапии АСК</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	1344 (837-1731)	1321 (1147-1816)	1221 (956-2130)	1377 (1100-1695)
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	2,30 (1,12-4,36)	3,55 (2,23-9,65); p <sub>1</sub> =0,035	5,24 (1,43-9,38)	9,14 (1,64-15,60)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	5,39 (3,19-13,68)	11,80 (6,52-26,63); p <sub>1</sub> =0,018	19,90 (4,95-30,27)	22,61 (5,32-49,57)
Индукцированная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	996 (622-1447)	1271 (1066-1509); p <sub>1</sub> =0,011; p <sub>4</sub> =0,026	1120 (956-1412); p <sub>4</sub> =0,037	1214 (974-1742)
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	5,55 (3,03-10,29)	9,45 (4,85-22,30); p <sub>1</sub> =0,027	4,70 (1,35-12,59)	16,20 (5,88-36,50); p <sub>1</sub> =0,039
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	13,77 (5,75-25,22)	27,44 (16,37-53,01); p <sub>1</sub> =0,01	14,77 (4,06-35,53)	47,53 (17,85-153,50); p <sub>1</sub> =0,01; p <sub>3</sub> =0,032
ИА	2,39 (1,60-3,39)	2,01 (1,20-3,67)	1,11 (0,65-2,63); p <sub>4</sub> =0,049	2,00 (0,82-13,80)

Примечание: то же, что и для таблицы 5.

Таблица 8 – Хемилюминесцентная активность нейтрофилов с люминолом у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

Показатели 1	Контроль (n=32) 2	чАСК (n=71) 3	рАСК (монотерапия АСК) (n=18) 4	рАСК (ДАТ) (n=15) 5
<b>До КШ</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	354 (226-1510)	642 (208-1565)	255 (93-1417)	414 (172-964)
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	17,21 (4,30-33,07)	13,43 (4,33-30,66)	6,87 (3,39-21,90)	17,10 (9,16-47,10)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	39,26 (9,74-77,93)	32,26 (13,19-79,76)	19,95 (4,64-33,06)	45,57 (22,79-80,10)
Индукцированная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	526 (268-977)	904 (660-1382); p <sub>1</sub> =0,002	735 (489-1107)	719 (391-845)
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	34,29 (13,04-58,47)	48,72 (13,30-94,84)	30,78 (8,70-65,04)	60,17 (14,63-108,93)
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	81,17 (26,64-157,50)	141,55 (40,32-255,00)	79,67 (16,64-135,55)	181,50 (30,93-373,00)

Продолжение таблицы 8 – Хемилюминесцентная активность нейтрофилов с люминолом у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

1	2	3	4	5
ИА	2,29 (1,61-2,66)	2,58 (1,86-4,33); p <sub>1</sub> =0,044	3,40 (2,30-6,73); p <sub>1</sub> =0,019	2,72 (1,46-8,22)
<b>Первые сутки после КШ</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	354 (226-1510)	888 (255-1510)	662 (204-1624)	285 (95-1477)
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	17,21 (4,30-33,07)	30,25 (14,69-41,68); p <sub>1</sub> =0,027; p <sub>4</sub> =0,01	10,13 (6,33-18,67); p <sub>2</sub> =0,003	43,10 (10,55-76,88)
S, о.е. × сек. × 10 <sup>6</sup>	39,26 (9,74-77,93)	65,31 (37,03-103,30); p <sub>1</sub> =0,02; p <sub>4</sub> =0,006	21,33 (6,79-38,73); p <sub>2</sub> =0,001	73,50 (27,13-285,40)
Индукцированная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	526 (268-977)	755 (478-1169)	662 (611-1276)	888 (764-1018)
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	34,29 (13,04-58,47)	98,74 (31,02-176,50); p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>4</sub> <0,001	47,39 (15,00-88,80)	82,57 (46,70-144,50); p <sub>1</sub> =0,027
S, о.е. × сек. × 10 <sup>6</sup>	81,17 (26,64-157,50)	250,10 (83,81-439,90); p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>4</sub> <0,001	132,40 (38,24-178,30)	266,10 (97,79-430,40)
ИА	2,29 (1,61-2,66)	2,77 (1,68-4,93)	4,60 (2,10-6,20); p <sub>1</sub> =0,029	3,02 (1,69-5,44)
<b>8-10-е сутки после КШ на фоне терапии АСК</b>				
Спонтанная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	354 (226-1510)	788 (253-1264)	267 (203-1816)	1801 (1106-2350); p <sub>1</sub> =0,015; p <sub>2</sub> =0,01; p <sub>3</sub> =0,032
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	17,21 (4,30-33,07)	16,50 (7,50-37,60)	16,50 (4,80-36,30)	27,87 (11,98-65,86)
S, о.е. × сек. × 10 <sup>6</sup>	39,26 (9,74-77,93)	36,82 (21,55-94,72)	23,91 (14,59-100,70)	85,18 (45,96-146,70)
Индукцированная хемилюминесценция				
T <sub>max</sub> , сек.	526 (268-977)	895 (695-1139); p <sub>1</sub> =0,009	621 (444-1271)	1165 (755-1384); p <sub>1</sub> =0,021; p <sub>3</sub> =0,04; p <sub>4</sub> =0,043
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	34,29 (13,04-58,47)	52,64 (14,29-150,70)	52,05 (34,16-92,16)	66,97 (42,90-145,90); p <sub>1</sub> =0,042; p <sub>4</sub> =0,043

Продолжение таблицы 8 – Хемилюминесцентная активность нейтрофилов с люминолом у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75))

1	2	3	4	5
S, о.е.× сек. × 10 <sup>6</sup>	81,17 (26,64- 157,50)	142,30 (37,80- 390,15)	132,20 (58,18- 232,10)	178,70 (122,83- 337,65); p <sub>1</sub> =0,036
ИА	2,29 (1,61- 2,66)	2,42 (1,72-4,32)	3,93 (1,31-4,94)	2,30 (1,55-3,72)

Примечание: то же, что и для таблицы 5.

В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с рАСК (монотерапия АСК) на 8–10-е сутки после КШ были выше Tmax в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте с люминолом и S в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином (таблицы 7,8).

У чАСК по сравнению с периодом до КШ в первые сутки после КШ наблюдалось повышение показателей Imax и S в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте с люминолом и Imax в спонтанном тесте с люцигенином, при этом Tmax в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте снизились, а к 8–10-м суткам после операции было лишь снижение Tmax в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином (таблицы 7,8). В группе рАСК (монотерапия АСК) в первые сутки после КШ снизилось Tmax в спонтанном тесте с люцигенином, а на 8–10-е сутки после операции снизились Tmax в зимозан-индуцированном тесте и ИА с люцигенином (таблица 7). В группе рАСК (ДАТ) в первые сутки после КШ снизилось Tmax в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином, а на 8–10-е сутки после операции в зимозан-индуцированном тесте с люминолом повысились Tmax и Imax (таблицы 7,8).

### **3.4 Взаимосвязь показателей агрегации и хемилюминесценции тромбоцитов у пациентов с ИБС, в том числе в зависимости от их чувствительности к АСК**

Вследствие того, что агрегация тромбоцитов и продукция ими АФК являются результатом функциональной активности данных клеток, между показателями ХЛ и агрегации тромбоцитов существуют взаимосвязи.

В контрольной группе были обнаружены положительные корреляции между:  $I_{\max}$  в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином и уровнем агрегации тромбоцитов с АДФ ( $r=0,55$ ,  $p=0,018$ ), ИА с люцигенином и уровнем агрегации тромбоцитов с адреналином ( $r=0,59$ ,  $p=0,010$ ),  $T_{\max}$  в АДФ-индуцированном тесте с люминолом и уровнем агрегации тромбоцитов с АК с добавлением АСК ( $r=0,54$ ,  $p=0,016$ ),  $T_{\max}$  в спонтанном тесте с люминолом и уровнем агрегации тромбоцитов с АК ( $r=0,57$ ,  $p=0,012$ ). В этой группе обнаружено большое количество отрицательных взаимосвязей между параметрами люминол-усиленной ХЛ и уровнем агрегации тромбоцитов с коллагеном. В частности, это  $I_{\max}$  и S в спонтанном тесте ( $r=-0,62$ ,  $p=0,005$  и  $r=-0,62$ ,  $p=0,004$  соответственно) и  $I_{\max}$  в АДФ-индуцированном тесте ( $r=-0,49$ ,  $p=0,032$ ).

У чАСК до КШ выявлены только отрицательные корреляции между показателями ХЛ и уровнем агрегации тромбоцитов с различными активаторами. Было обнаружено, что до КШ величина  $I_{\max}$  в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином слабо коррелировала с уровнями агрегации тромбоцитов с АК с добавлением АСК ( $r=-0,27$ ,  $p=0,035$ ) и агрегации тромбоцитов с АДФ ( $r=-0,25$ ,  $p=0,047$ ). При этом последняя из указанных связей была обратной по сравнению с выявленной в контрольной группе. Кроме того,  $I_{\max}$  в АДФ-индуцированном тесте с люминолом коррелировала с уровнями АДФ- ( $r=-0,26$ ,  $p=0,038$ ), адреналин-индуцированной ( $r=-0,28$ ,  $p=0,027$ ), а также индуцированной АК агрегации тромбоцитов с добавлением АСК ( $r=-0,27$ ,  $p=0,033$ ),  $I_{\max}$  в спонтанном тесте с люцигенином слабо коррелировала с уровнем агрегации с АДФ ( $r=-0,25$ ,  $p=0,046$ ) и адреналином ( $r=-0,27$ ,  $p=0,037$ ). Только одна умеренная корреляция была обнаружена у пациентов данной группы в первые сутки после КШ: между  $T_{\max}$  в спонтанном тесте с люцигенином и уровнем агрегации тромбоцитов с АК с добавлением АСК ( $r=-0,35$ ,  $p=0,016$ ). Отрицательные умеренные корреляции ИА в тесте с люцигенином наблюдались с уровнями агрегации тромбоцитов с коллагеном ( $r=-0,35$ ,  $p=0,033$ ), АДФ ( $r=-0,40$ ,  $p=0,012$ ) и адреналином ( $r=-0,32$ ,  $p=0,048$ ) на 8–10-е сутки после КШ. Также была обнаружена корреляция между  $T_{\max}$  в АДФ-индуцированном тесте с люминолом и уровнем агрегации

тромбоцитов с АК с добавлением АСК ( $r=-0,35$ ,  $p=0,029$ ). Более того, последние две из этих корреляций были обратными по сравнению с корреляциями, обнаруженными в контрольной группе.

У рАСК (монотерапия АСК) до КШ была обнаружена лишь умеренная отрицательная взаимосвязь между  $T_{max}$  в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином и уровнем агрегации тромбоцитов с адреналином ( $r=-0,58$ ,  $p=0,047$ ), в первые сутки после КШ была только одна корреляция (но уже положительная) между  $S$  в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином и уровнем агрегации тромбоцитов с АК с добавлением АСК ( $r=0,61$ ,  $p=0,026$ ). У этих пациентов отрицательные корреляции были обнаружены на 8–10-е сутки после КШ между ИА в тесте с люминолом и уровнями агрегации тромбоцитов с коллагеном и адреналином ( $r=-0,68$ ,  $p=0,015$  для обоих), между  $S$  в спонтанном тесте с люцигенином и уровнем агрегации тромбоцитов с АК ( $r=-0,66$ ,  $p=0,020$ ) и  $T_{max}$  в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином и уровнем агрегации тромбоцитов с адреналином ( $r=-0,69$ ,  $p=0,012$ ).

У рАСК (ДАТ) выявлены только положительные связи между показателями ХЛ и агрегационной активности тромбоцитов. Так, до КШ  $S$  в спонтанном тесте с люцигенином коррелировала с уровнями агрегации тромбоцитов с АДФ ( $r=0,78$ ,  $p=0,013$ ) и адреналином ( $r=0,70$ ,  $p=0,036$ ),  $S$  в АДФ-индуцированном тесте с люминолом имела сильную взаимосвязь с уровнями агрегации тромбоцитов с коллагеном ( $r=0,70$ ,  $p=0,038$ ), АДФ ( $r=0,80$ ,  $p=0,010$ ) и АК ( $r=0,81$ ,  $p=0,009$ ), а ИА с люминолом коррелировал с уровнем агрегации тромбоцитов с коллагеном ( $r=0,7$ ,  $p=0,038$ ). В первые сутки после КШ было обнаружено, что  $I_{max}$  положительно коррелировала в спонтанном тесте с люцигенином с уровнями агрегации тромбоцитов с коллагеном ( $r=0,68$ ,  $p=0,042$ ) и адреналином ( $r=0,70$ ,  $p=0,036$ ), а в АДФ-индуцированном тесте с уровнями агрегации тромбоцитов с АДФ и адреналином ( $r=0,7$ ,  $p=0,036$  для обоих).  $I_{max}$  положительно коррелировала в спонтанном тесте с люминолом с уровнями агрегации тромбоцитов с коллагеном ( $r=0,85$ ,  $p=0,004$ ), АДФ ( $r=0,8$ ,  $p=0,001$ ), адреналином ( $r=0,72$ ,  $p=0,03$ ) и АК с АСК ( $r=0,7$ ,  $p=0,037$ ), а в АДФ-индуцированном тесте с

уровнями агрегации тромбоцитов с коллагеном ( $r=0,78$ ,  $p=0,013$ ) и АДФ ( $r=0,83$ ,  $p=0,005$ ). S положительно коррелировала в спонтанном тесте с люминолом с уровнями агрегации тромбоцитов с коллагеном ( $r=0,77$ ,  $p=0,016$ ), АДФ ( $r=0,9$ ,  $p=0,001$ ), адреналином ( $r=0,77$ ,  $p=0,016$ ), в АДФ-индуцированном тесте с уровнями агрегации тромбоцитов с АДФ ( $r=0,7$ ,  $p=0,036$ ) и адреналином ( $r=0,7$ ,  $p=0,036$ ), а в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином с уровнями агрегации тромбоцитов с АДФ ( $r=0,77$ ,  $p=0,016$ ) и адреналином ( $r=0,72$ ,  $p=0,03$ ). На 8–10-е сутки после КШ были обнаружены только две корреляции: между Tmax в спонтанном тесте с люминолом и уровнями агрегации тромбоцитов с коллагеном ( $r=0,93$ ,  $p=0,001$ ) и АДФ ( $r=0,72$ ,  $p=0,046$ ).

### **3.5 Взаимосвязь показателей хемилюминесценции тромбоцитов и нейтрофилов у пациентов с ИБС, в том числе в зависимости от их чувствительности к АСК**

В результате изучения показателей ХЛ тромбоцитов и нейтрофилов были обнаружены различные взаимосвязи между ними во всех обследуемых группах. Так, в контрольной группе обратные умеренные корреляции определялись по Tmax 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 9).

В группе рАСК (монотерапия АСК) также обнаружены прямые взаимосвязи между показателями ХЛ нейтрофилов и тромбоцитов и в спонтанных, и в индуцированных тестах с люцигенином, но уже не только в первые сутки после КШ, но и на 8–10-е сутки после КШ (таблица 10).

Таблица 9 – 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
<b>До КШ</b>			
<b>I<sub>max</sub></b>	Спонтанная ХЛ	0,40	0,008
	Индукцированная ХЛ	0,34	0,008
<b>S</b>	Спонтанная ХЛ	0,27	0,036
	Индукцированная ХЛ	0,34	0,008
<b>Первые сутки после КШ</b>			
<b>I<sub>max</sub></b>	Спонтанная ХЛ	0,40	0,003
	Индукцированная ХЛ	0,44	0,002
<b>S</b>	Спонтанная ХЛ	0,43	0,002
	Индукцированная ХЛ	0,41	0,004

Таблица 10 – 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
<b>Первые сутки после КШ</b>			
<b>I<sub>max</sub></b>	Спонтанная ХЛ	0,60	0,030
	Индукцированная ХЛ	0,68	0,010
<b>ИА</b>		0,64	0,019
<b>8-10-е сутки после КШ</b>			
<b>I<sub>max</sub></b>	Индукцированная ХЛ	0,64	0,023
<b>S</b>	Индукцированная ХЛ	0,78	0,003

В группе рАСК (ДАТ) корреляций между показателями ХЛ нейтрофилов и тромбоцитов обнаружено не было.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

ССЗ остаются в лидерах по распространенности, инвалидизации и причинам смертности населения в мире, а Российская Федерация относится к странам с очень высоким сердечно-сосудистым риском. Это значит, что для населения нашей страны существует большая вероятность фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых событий в ближайшие 10 лет. Несмотря на то, что фармакотерапия и хирургические методы лечения ССЗ улучшают качество жизни и значительно продлевают её срок, проблема оптимальной персонализированной терапии остается нерешенной [87, 139]. Это обусловлено рядом причин, одной из которых является недостаточный ответ тромбоцитов на антиагрегантные препараты, в частности АСК. Резистентность к АСК наблюдается при первичной и вторичной профилактике ССЗ и зависит от многих факторов, а именно несоблюдения режима приема лекарств, одновременного приема АСК и ингибиторов протонной помпы, генетических полиморфизмов, инактивация АСК эстеразой, потреблением АСК белком 4, связанным с множественной лекарственной устойчивостью после АКШ, высоким оборотом тромбоцитов с регенерацией ЦОГ-1, способностью тромбоцитов синтезировать ЦОГ-1 в ответ на действие фибриногена и тромбина, вклад микро РНК [92, 152, 169, 172]. На фоне этого устойчивость тромбоцитов к АСК может быть возможным фактором раннего или позднего отказа венозного трансплантата после КШ [123].

Пациенты с заболеваниями сердечно-сосудистой системы имеют высокие риски тромботических событий. Тромбоз шунтов после КШ непосредственно связан с активацией тромбоцитарного звена гемостаза. Однако помимо самих тромбоцитов в очаге повреждения и неспецифического воспалительного процесса при атеросклерозе, возникших в результате воздействия различных негативных факторов (свободные радикалы, продукты курения, токсины вирусной и бактериальной природы, гипертензия), присутствуют еще и клетки

лейкоцитарного звена, в том числе нейтрофилы [181]. Все участники этих процессов находятся в состоянии, отличном от покоя, и активно взаимодействуют друг с другом, главным образом через молекулы клеточной адгезии (P-селектин и PSGL-1, GPIIb/IIIa и Mac-1), что опосредует физический контакт и внутриклеточную передачу сигналов, приводящих к взаимному влиянию клеток на внутренние метаболические и энергетические процессы в них, в частности, к разному ответу тромбоцитов на АСК в зависимости от состояния микроокружения [215, 223]. Важно понимать, что в конечном счете чувствительность тромбоцитов определяется их функциональной активностью, а также активностью метаболических процессов, обеспечивающих энергетические и пластические субстраты в процессе жизнедеятельности этих клеток. Благодаря гармоничной слаженной работе всех внутренних механизмов осуществляется сборка рецепторов на мембране тромбоцитов, продукция и упаковка в гранулы активных веществ, а также обеспечение тромбоцитов энергетическими ресурсами. Здесь не последнюю роль играют как раз АФК, которые могут участвовать в качестве сигнальных молекул, а также активировать тромбоциты, их рецепторы [228]. Поскольку люцигенин излучает кванты света только при взаимодействии с супероксидным радикалом вне клетки, соответственно, усиленная люцигенином ХЛ характеризует активность НАДФН-оксидазы, продуктом деятельности которой и является данная АФК. Известно, что 7 типов НАДФН-оксидазы, идентифицированных в клетках млекопитающих, различаются клеточной специфичностью, а именно НАДФН-оксидаза 2 экспрессируется во внешней мембране тромбоцитов [135]. Доказано, что снижение уровня агрегации тромбоцитов наблюдается у пациентов с ССЗ при ингибировании НАДФН-оксидазы 2 [179, 196]. Синтез супероксидного радикала осуществляется в первую очередь в процессе респираторного взрыва, а, следовательно, эта форма определяется как первичная. Дальнейшая дисмутация первичных АФК осуществляется с использованием широкого набора ферментов, которые приводят к продукции вторичных АФК (гидроксильный радикал, перекись водорода, хлорноватистая кислота и др.). В этом случае активность и кинетика люминол-

усиленной ХЛ характеризует продукцию как первичных, так и вторичных АФК [255].

Очевидно, что уровень продукции АФК клетками крови во многом отражает их морфофункциональное состояние и межклеточные взаимодействия, а также вероятное участие в недостаточном ответе тромбоцитов на антиагрегантные препараты.

Поэтому целью нашего исследования было изучить взаимосвязь между показателями продукции АФК тромбоцитами и нейтрофилами до и после КШ у резистентных и чувствительных к АСК или АСК+клопидогрел пациентов с ИБС до и на фоне антиагрегантной терапии.

Было выявлено, что частота встречаемости явления резистентности тромбоцитов к АСК или АСК+клопидогрел среди пациентов с ИБС составляет 31,7 %. Причем из них только 9 % пациентов с ИБС оказались абсолютно устойчивыми к АСК на протяжении всего периода наблюдения, что может быть генетически обусловлено. В остальных же случаях данное явление носит переменный характер и индивидуально зависит от множества влияющих факторов (в нашем исследовании это в основном операция КШ и антиагрегантная терапия АСК и клопидогрелом), то есть один пациент мог быть чувствительным до операции, но стать резистентным после операции (вероятное влияние ИК, либо резистентность была обусловлена недостаточным ответом тромбоцитов на терапию АСК/АСК+клопидогрел) и, наоборот, резистентный в пробе *in vitro* до операции становился чувствительным на оптимальной антиагрегантной терапии. Полученные результаты согласуются с результатами некоторых работ и исследований, раскрывающих возможные клинические причины резистентности к АСК: условия ИК (связывают с увеличением количества индуцибельной изоформы ЦОГ в тромбоцитах после операции и воспалением, а также повышенным оборотом тромбоцитов после применения аппарата ИК), почечная дисфункция, дополнительное назначение других НПВС в послеоперационном периоде (объясняется подавлением продукции простаглицина и конкуренцией с АСК за связывание с активным центром ЦОГ-1), сниженная биодоступность

кишечнорастворимой формы АСК, воспалительный ответ (у лиц с сахарным диабетом и с избыточной массой тела за счет увеличения объема распределения препарата) [134, 244, 251]. 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.

Связь продукции АФК и функциональной активности тромбоцитов подкрепляется данными нашего исследования, где мы получили множественные прямые и обратные корреляции между показателями ХЛ тромбоцитов и уровнями их агрегации с различными стимуляторами. При этом сила и знак корреляций в большинстве своем отличался у пациентов с ИБС в зависимости от их чувствительности к АСК или АСК+клопидогрел и проводимой антиагрегантной терапии. Если у чАСК эти связи в основном отрицательные слабые и большинство из них до КШ, то у рАСК (монотерапия АСК) они отрицательные, но умеренной силы и в основном на 8–10-е сутки после КШ. Больше же всего таких корреляций наблюдалось у рАСК (ДАТ) до КШ и в первые сутки после КШ, но уже сильных и положительных. Исходя из этого, у чАСК до КШ существует обратная зависимость между уровнями продукции первичных и вторичных АФК и уровнем индуцированной агрегации тромбоцитов, а значит, метаболические и регуляторные особенности тромбоцитов у данной группы пациентов изменили роль активных форм для ингибирования активности агрегации тромбоцитов. Более того, взаимосвязь между уровнем АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов и  $I_{max}$  в АДФ-индуцированном тесте ХЛ с люцигенином у чАСК на этом этапе обследования была обратной по сравнению с контрольной группой, что также подтверждает изменение функций АФК у таких пациентов с ИБС. Сохраняющиеся обратные взаимосвязи на 8–10-е сутки после КШ указывают на нарушение влияния АФК в течение минимум 8–10 дней после операции. В первые сутки после КШ рАСК (монотерапия АСК) имели одну взаимосвязь между параметрами ХЛ и агрегации тромбоцитов. Более того, эта корреляция была положительной и характеризовала прямую зависимость

агрегации тромбоцитов, индуцированной АК с предварительной инкубацией с АСК, от общего уровня продукции супероксидных радикалов. Следовательно, регуляторное воздействие АФК на функциональную активность тромбоцитов у пациентов с рАСК (монотерапия АСК) в первые сутки после КШ проявилась практически в единственном механизме (через ЦОГ-1). Четыре корреляции между ХЛ параметрами и активностью агрегации тромбоцитов (все отрицательные) были обнаружены у пациентов рАСК (монотерапия АСК) через 8–10 дней после КШ. Следовательно, эти пациенты имели низкую регулируемую роль АФК в функциональной активности тромбоцитов. Все корреляции между параметрами ХЛ и активностью агрегации тромбоцитов у рАСК (ДАТ) были положительными, более того, все корреляции с коллаген-индуцированной агрегацией тромбоцитов у пациентов этой группы были обратными по сравнению с таковыми в контрольной группе. Следовательно, повышенный уровень продукции АФК тромбоцитами у рАСК (ДАТ) сочетался с усилением регуляторной функции АФК в отношении активности агрегации тромбоцитов. В связи с вышеизложенным, можно предположить, 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 повышенному агрегационному потенциалу тромбоцитов, что может быть связано с повышенной активностью фосфолипазы С, фосфолипазы А2 и/или низкой активностью аденилатциклазы.

Нами было установлено, что тромбоциты и нейтрофилы всех чАСК без дополнительной стимуляции и с ней продуцируют высокие уровни первичных и вторичных АФК как до операции и антиагрегантной терапии, так и после. При этом повышенная базовая и индуцированная метаболическая активность тромбоцитов и нейтрофилов, проявляющаяся в показателях продукции всех форм активных радикалов у чАСК на протяжении всего исследования, указывает на активированное состояние данных клеток и их потенциальных возможностей при

дополнительной стимуляции. В то же время  $T_{max}$  характеризует особенности кинетики развития ХЛ реакции, что определяется скоростью активации ферментов при продукции АФК. Следовательно, увеличенные значения  $T_{max}$  ХЛ тромбоцитов и нейтрофилов у чАСК до КШ и на 8–10-е сутки после КШ определялись медленной активацией НАДФН-оксидазы [192]. Это согласуется с теорией атеротромбоза, связанного с неспецифическим воспалением интимамедиа сосудистой стенки, дестабилизацией покрышки атеромы (диссекция, эрозия), запуском сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и межклеточного взаимодействия, что приводит к образованию тромбов и окклюзии сосудов, не исключая артериальные кондуиты. Активация тромбоцитов приводит к выделению CD40L, связывающегося с CD40 на нейтрофилах, что вызывает образование хемоаттрактантов, дополнительно увеличивающих экспрессию Mac-1, высвобождение миелопероксидазы и экстравазацию нейтрофилов, что сказывается на повышенной продукции АФК [195, 203, 216]. При этом операция КШ привела лишь к некоторому снижению продукции АФК тромбоцитами в АДФ-индуцированном тесте. Антиагрегантная терапия же в ряде случаев не вызывала истощения внутренних ресурсов, а сохраняющаяся высокая активность тромбоцитов могла инициировать повторные тромбозы [206]. Применение ИК при КШ сопровождается контактом крови с «неэндотелиальной» поверхностью контура аппарата, использованием нефракционированного гепарина, протамин сульфата, увеличением экспрессии Р-селектина, тромбоцитарного фактора-4, увеличением содержания тромбина, активацией провоспалительных цитокинов и компонентов системы комплемента, запуском процессов свободнорадикального окисления и активацией в ряде случаев супероксиддисмутазы при неравномерной гипероксии [29, 55, 238]. Помимо тромбоцитов, активируются лейкоциты и эндотелиальные клетки из-за контакта крови с инородными поверхностями и воздухом во время ИК, возникает воспалительная реакция, что подтверждается увеличением в послеоперационном периоде продукции IL-6, IL-8, С-реактивного белка, нейтрофильной эластазы, TNF- $\alpha$  [120]. Контакт тромбоцитов в очаге с другими клетками (эндотелиальные клетки, клетки лейкоцитарного ряда)

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 [214]. 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 в АДФ-индуцированном тесте восстанавливается, вероятно, в результате поступления в кровотоки молодых форм с высоким потенциалом, что характеризуется повышенной продукцией всех форм АФК как в спонтанном, так и в АДФ-индуцированном тесте.

Примечательно, что в группе рАСК (монотерапия АСК) уровень и интенсивность продукции всех АФК тромбоцитами не отличается от контрольной группы, лишь до операции КШ повышено время достижения максимальной интенсивности индуцированной наработки вторичных АФК, что свидетельствует о замедлении процессов их продукции при дополнительной стимуляции. Терапия АСК привела к снижению уровня супероксид анион-радикала лишь в АДФ-индуцированном тесте по сравнению с периодом до КШ, что указывает на снижение резервной активности по продукции первичных АФК при сохранении базового уровня. У нейтрофилов наблюдается схожая картина, лишь до КШ и в первые сутки после КШ выявляется потенциальное усиление зимозан-индуцированной ХЛ. Эти результаты могут являться следствием сбоя межклеточных взаимодействий тромбоцитов с нейтрофилами, способными снабжать тромбоциты субстратами (например, АК) с помощью микровезикул, а также активировать их на уровне рецепторов [56]. Тромбоцитарные микровезикулы как дополнительный инструмент обмена информацией могут содержать митохондрии в активном состоянии с обеспечением клеточного дыхания (являются также источником супероксид анион-радикала) [53]. Для

образования микровезикул необходима стимуляция клетки тромбином, медиаторами воспаления, АДФ, воздействием АФК, гипоксией, стрессом [67]. Нейтрофильные микровезикулы могут вызвать повышенную коагуляцию и адгезию тромбоцитов, приводящую к микротромбозам, системному воспалению сосудов [38]. Логично, что любые 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 тромбоксана А<sub>2</sub> сопровождается наработкой АФК [190, 254]. Сниженный до КШ уровень продукции первичных и вторичных АФК тромбоцитами при стимуляции АДФ и первичных АФК нейтрофилами у рАСК (монотерапия АСК) пациентов в сравнении с чАСК 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 снижены, а ЦОГ-1, как точка приложения АСК, становится неактуальной у данной категории пациентов. 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 антиагреганту, 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 11).

Ранее нами было показано, что у рАСК пациентов с ИБС (вне зависимости от терапии) уровень и интенсивность продукции АФК тромбоцитами ниже, чем у чАСК [229]. То есть чувствительность связана с повышенной метаболической активностью тромбоцитов по продукции АФК, в том числе в отношении АК (при участии ЦОГ-1). Получается, что при разделении пациентов с ИБС на группы в

зависимости от антиагрегантной терапии в нашем исследовании такая картина остается явно выраженной в отношении группы рАСК (монотерапия АСК), тогда как в группе 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.



Рисунок 11. 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: рАСК – резистентный к АСК и/или АСК и клопидогрелу пациент с ИБС, ФЛ – фосфолипиды, чАСК – чувствительный к АСК и/или АСК и клопидогрелу пациент с ИБС, NOS – NO-синтаза, PG – простагландины, ТХ – тромбоксаны.

В остальном после операции КШ и на фоне приема АСК и клопидогрела тромбоциты, а также и нейтрофилы, продуцируют повышенные базовые и индуцированные величины 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. Более высокие показатели продукции АФК у чАСК и рАСК (ДАТ) могут указывать на то, что в тромбоцитах данных пациентов активность НАДФН-оксидазы выше, чем у рАСК (монотерапия АСК). 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 через микровезикулы, 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 [100, 101, 112, 201]. Из-за этого может увеличиться количество субстрата – АК, при метаболизме которой и происходит наработка АФК (рисунок 12).

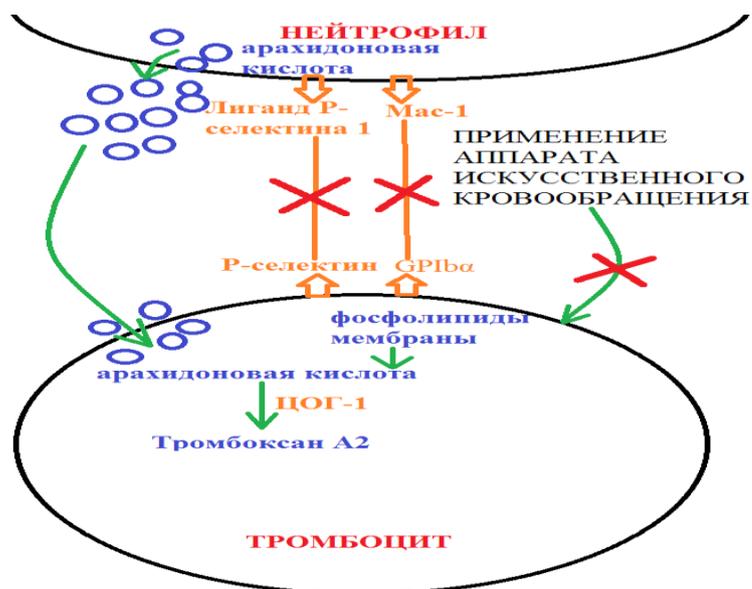


Рисунок 12. Предполагаемое взаимодействие тромбоцитов и нейтрофилов у резистентных к АСК или АСК и клопидогрелу пациентов с ИБС при терапии АСК и клопидогрелом

Примечание: ЦОГ – циклооксигеназа.

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 эндотелиальной поверхности ИК. Так как у этой группы пациентов с ИБС наблюдается резистентность ЦОГ-1 к действию АСК, то высокие уровни субстрата способствуют повышенному образованию промежуточных продуктов-АФК, а основной антиагрегантный эффект обеспечивается не АСК, а клопидогрелом. Пуриновые рецепторы к АДФ присутствуют и на иммунных клетках лейкоцитарного ряда [247]. 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, ЛТК (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 [256]. 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 [89]. А 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 [70].

Вышеизложенные предположения подтверждаются данными корреляционного анализа между показателями ХЛ тромбоцитов и нейтрофилов.

Так, больше всего положительных связей выявлено среди чАСК до операции и на первые сутки после КШ, что свидетельствует о налаженном контакте тромбоцитов и нейтрофилов, когда высокая активность по продукции 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). У группы рАСК (ДАТ), наоборот, отсутствуют какие-либо корреляции, что свидетельствует о нарушении контактов между нейтрофилами и тромбоцитами при участии АФК. Наличие же положительных связей в группе рАСК (монотерапия АСК) между показателями ХЛ по продукции супероксид анион-радикала только на первые и на 8—10-е сутки после КШ может быть связано со стабильной не меняющейся во времени на уровне контрольной группы продукцией АФК по сравнению с чАСК. Можно предположить, что при этом активность НАДФН-оксидазы остается одинаково низкой и в тромбоцитах, и в нейтрофилах из-за рефрактерности клеток к активирующим агентам и антиагрегантам, что и проявляется в корреляциях.

Хочется обратить особое внимание на тот факт, что показатель S АДФ-индуцированной ХЛ тромбоцитов с люминолом до КШ, свидетельствующий об уровне продукции первичных и вторичных АФК, отличался во всех группах пациентов с ИБС. Так, его уровень оказался выше в группе чАСК и рАСК (ДАТ) по сравнению с рАСК (монотерапия АСК). Таким образом, по данному показателю еще до операции КШ можно выявлять резистентных к АСК пациентов с ИБС, чтобы в дальнейшем подходить к их терапии индивидуально для улучшения прогноза, что получило свое применение в нашем патенте.

## 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 [180, 233]. 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 С, фосфолипазы А<sub>2</sub> 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 [68].

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 СОКРАЩЕНИЙ**

АДФ – аденозиндифосфат

АКШ – аортокоронарное шунтирование

АСК – ацетилсалициловая кислота

АК – арахидоновая кислота

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВЭМ – велоэргометрия

ГП (GP) – гликопротеидн

ДАТ – двойная антиагрегантная терапия

ИА – индекс активации

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИК – искусственное кровообращение

ИМ – инфаркт миокарда

КИА – коэффициент ингибирования агрегации

КШ – коронарное шунтирование

ЛТК – лейкоцитарно-тромбоцитарные комплексы

ОКС – острый коронарный синдром

рАСК – резистентный к АСК и/или АСК и клопидогрелу пациент с ИБС

РНК – рибонуклеиновая кислота

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ФАТ – фактор активации тромбоцитов

ХЛ – хемилюминесценция

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦОГ – циклооксигеназа

чАСК – чувствительный к АСК и/или АСК и клопидогрелу пациент с ИБС

ЭВ – экстраклеточные везикулы

ЭКГ – электрокардиография

ЭхоКГ – эхокардиография

CD – кластер дифференцировки

ICAM – молекула клеточной адгезии

IL – интерлейкин

I<sub>max</sub> – максимальное значение интенсивности хемилюминесценции

LFA-1 – лейкоцитарного функционального антигена-1

Mac-1 – макрофагальный антиген-1

NAF-2 – фактор активации нейтрофилов-2

PAR4 – рецептор, активируемый протеазами 4

PSGL-1 – P-селектин гликопротеиновый лиганд-1

RANTES (CCL5) – хемокин, выделяемый T-клетками при активации

S – площадь под кривой хемилюминесценции

T<sub>max</sub> – время выхода на максимум хемилюминесценции

TNF- $\beta$  – фактор некроза опухоли- $\beta$

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Анализ синтеза активных форм кислорода тромбоцитами больных ишемической болезнью сердца с помощью хемилюминесцентного метода / А.А. Савченко, М.Д. Гончаров, Ю.И. Гринштейн [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169, №4. – С. 525–528.
2. Анализ экстраклеточных везикул с использованием магнитных наночастиц в крови больных с острым коронарным синдромом / М.С. Вагида, А. Аракелян, А.М. Лебедева [и др.] // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 4. – С. 382-391.
3. Артериальная гипертензия у взрослых. Клинические рекомендации 2020 / Ж. Д. Кобалава, А. О. Конради, С. В. Недогода [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2020, № 3. – С. 149-218.
4. Аспиринорезистентность: причины, принципы диагностики, клинические исходы. / А.Т. Душпанова, К.С. Абсатарова, А.Е. Уалиева [и др.] // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2016. – № 2. – С. 81-87.
5. Бойцов, С.А. Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации и возможные механизмы ее изменения / С.А. Бойцов, С.А. Шальнова, А.Д. Деев // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т. 118, №8. – С. 98-103.
6. Бойцов, С.А. Эпидемиологическая ситуация как фактор, определяющий стратегию действий по снижению смертности в Российской Федерации / С.А. Бойцов, С.А. Шальнова, А.Д. Деев // Терапевтический архив. – 2020. – Т. 92, № 1. – С. 4–9.
7. Витковский, Ю.А. Взаимодействие лейкоцитов и тромбоцитов с эндотелием и ДВС-синдром / Ю.А. Витковский, Б.И. Кузник, А.В. Солпов // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2006. – №1 (25). – С. 15-28.
8. Витковский, Ю.А. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии / Ю.А. Витковский, Б.И. Кузник, А.В. Солпов // Медицинская Иммунология. – 2006. – Т.8, № 5-6. – С. 745-753.

9. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49, №7. – С. 341-388.
10. Влияние активных форм кислорода на коллаген-зависимую агрегацию тромбоцитов у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и артериальной гипертензией / О.А. Трубачева, А.В. Ситожевский, И.В. Петров [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, № 4, выпуск 2. – С. 111-114.
11. Влияние факторов различной природы на степень активности НАДФН-оксидазы нейтрофилов крови человека / Т.В. Полежаева, О.О. Зайцева, А.Н. Худяков [и др.] // Биологические науки. Фундаментальные исследования. – 2015. № 2-10. – С. 2170-2173.
12. Вознесенский, Н.К. Хемилюминесценция нейтрофилов в аллергодиагностике / Н.К. Вознесенский, Н.С. Манеркина // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 8. – С.18-20.
13. Воробьева, Н.М. Резистентность к ацетилсалициловой кислоте: значение лекарственной формы / Н.М. Воробьева // Медицинский совет. – 2013. – №9. – С. 76-81.
14. Габбасов, З.А. Фенотип тромбоцитов и инфаркт миокарда / З.А. Габбасов, Е.В. Рыжкова // Креативная кардиология. – 2014. – № 2. – С. 48-59.
15. Голухова, Е.З. Современные аспекты антиагрегантной терапии / Е.З. Голухова, М.Н. Рябинина // Креативная кардиология. – 2013. – Т. 1. – С. 46-58.
16. Гривенникова, В.Г. Генерация активных форм кислорода митохондриями / В.Г. Гривенникова, А.Д. Виноградов // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53, № 2. – С. 245-296.
17. Денисова, Т. П. Хронические коронарные синдромы: клинические особенности, диагностика / Т. П.Денисова, Т. Е. Липатова, Л. И. Малинова [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2020. – Т. 16, № 1. – С. 150–155.
18. Джатдоева, А.А. Митохондрии как источники супероксидного анион-радикала в тромбоцитах / А.А. Джатдоева, Е.В. Проскурнина, А.М. Нестерова [и др.] // Биологические мембраны. – 2017. – Т. 34, № 6. – С. 116-123.

19. Жамбалова, Б.А. Влияние фибриногена на функциональную активность лейкоцитов крови / Б.А. Жамбалова, О.А. Азизова, Ю.М. Лопухин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 133, №5. – С. 519-521.
20. Заболевания сердечно сосудистой системы как причина смертности в Российской Федерации: пути решения проблемы / Д.О. Иванов, В.И. Орел, Ю.С. Александрович [и др.] // Медицина и организация здравоохранения. – 2019. –Т. 4, № 2. – С. 4-12;
21. Запровальная, О.Е. Аспиринорезистентность и применение нестероидных противовоспалительных препаратов в кардиологической практике / О.Е. Запровальная, С.А. Триполка // Мир Медицины и Биологии. – 2012. – Т. 8, № 2. – С. 35-39.
22. Зилт в сравнении с ацетилсалициловой кислотой у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий после аортокоронарного шунтирования. Основные результаты исследования ЗЕВС: эффективность препаратов, механизм резистентности к ацетилсалициловой кислоте, ближайшие и отдаленные клинические результаты / Ю. И. Гринштейн, А. А. Савченко, И. В. Филоненко [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2009. – Т. 8, № 8. – С. 36-43.
23. Кардиоваскулярная профилактика 2017. Российские национальные рекомендации / С. А. Бойцов, Н. В. Погосова, М. Г. Бубнова [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2018. – Т. 23, № 6. – С. 7 – 122.
24. Карпов, Ю.А. Хроническая ишемическая болезнь сердца: новости лечения / Ю.А. Карпов // Consilium Medicum. – 2016. – Т. 18, № 1. – С. 27 – 33.
25. Кашталап, В.В. Клопидогрел в составе двойной дезагрегантной терапии при ОКС: обоснованный выбор в сложных клинических ситуациях / В.В. Кашталап, О.Л. Барбараш // Медицинский совет. – 2019. – № 5. – С. 20-29.
26. Клинические и лабораторные предикторы развития агрегационной аспиринорезистентности у больных с ИБС / Р.Р. Политидис, О.В. Лянг, Н.В. Кобелевская [и др.] // Вестник последипломного медицинского образования. – 2017. № 4. – С. 55-63.

27. Коленчукова, О.А. Особенности люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом / О.А. Коленчукова, А.А. Савченко, С.В. Смирнова // Медицинская иммунология. – 2010. – Т. 12, № 4-5, стр. 437-440.
28. Комаров, А.Л. Тестирование функции тромбоцитов для оценки риска тромбозов и кровотечений у больных ИБС, получающих антиагреганты / А.Л. Комаров, Е.П. Панченко // Российский кардиологический журнал. – 2015. – Т.3, № 119. – С. 25-34.
29. Корнев, В.И. Гемостаз при миниинвазивном искусственном кровообращении / В.И. Корнев, Д.А. Шелухин // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2019. – Т. 23, № 3. – С. 84-97.
30. Кузнецова, И.В. Эндотелиальная дисфункция как связующее звено климактерического синдрома и сердечно-сосудистых заболеваний / И.В. Кузнецова // Эффективная фармакотерапия. – 2019. – Т. 15, № 32. – С. 32-40.
31. Кузник, Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии / Б.И. Кузник // Экспресс-издательство. – 2010. – С. 832-832.
32. Лойко, Е. Н. Обратимое ингибирование АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов перекисью водорода / Е. Н. Лойко, А. Б. Самаль, С. М. Шуляковская // Вес. НАН Беларуси. Сер. мед.-біял. навук. – 2003. – № 2. – С. 97-100.
33. Лойко, Е. Н. Влияние H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на АДФ-индуцированную агрегацию и Ca<sup>2+</sup>-ответ тромбоцитов и дезагрегация тромбоцитов / Е. Н. Лойко, А. Б. Самаль // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. -біял. навук. – 2003. – № 4. – С. 80–83.
34. Мазуров, А.В. Оборот тромбоцитов и атеротромбоз / А.В. Мазуров // Атеротромбоз. – 2017. – №2. – С. 131-141.
35. Мальцева А.Н. Недостаточный ответ тромбоцитов на применение ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела при ишемической болезни сердца после коронарной реваскуляризации. Является ли резистентность к антитромбоцитарным препаратам обратимой? / А.Н. Мальцева, Ю.И. Гринштейн // Русский Медицинский Журнал. – 2021. – Т. 9. – С. 1–5.

36. Марцевич С.Ю. Совместное использование клопидогрела и ингибиторов протонной помпы: есть ли нерешенные вопросы сегодня / Марцевич С.Ю., Суворов А.Ю. // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2014. – Т. 10, № 6. – С. 665-671.
37. Метаболические особенности тромбоцитов у больных стабильной стенокардией, резистентных и чувствительных к аспирину / И.Ю. Гринштейн, А.А. Савченко, Ю.И. Гринштейн [и др.] // Креативная кардиология. – 2014. – № 1. – С. 15-24.
38. Микровезикулы лейкоцитарного происхождения / К.Л. Маркова, И.Ю. Коган, А.Р. Шевелева [и др.] // Вестник РАМН. – 2018. – Т. 73, № 6. – С. 378-387.
39. Митьковская, Н.П. Нестабильная стенокардия или нестабильные коронарные синдромы? / Н.П. Митьковская, О.В. Ласкина, П. Тифи // Неотложная кардиология и кардиоваскулярные риски. – 2020. – Т. 4, № 1. – С. 816–849.
40. Молекулярно-клеточные изменения при атеросклерозе / В.А. Аладинский, Н.Г. Никифоров, А.В. Темченко [и др.] // Клиническая медицина. – 2015. – Т. 93, № 6. – С. 14-18.
41. Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной системы / И.И. Долгушин, Е.А. Мезенцева, А.Ю. Савочкина [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 9–38.
42. Образцов, И.В. Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика / И.В. Образцов, М.А. Годков // Молекулярная медицина. – 2013. – №4. – С. 3 – 9.
43. Оценка метаболического статуса тромбоцитов в норме и при ишемической болезни сердца / Е.А. Савченко, А.А. Савченко, А.Н. Герасимчук [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 5. – С. 33-36.
44. Пат. 2348041 С1. Российская Федерация: МПК G01N33/68. Способ диагностики аспиринорезистентности у больных ишемической болезнью сердца / Савченко А.А., Гринштейн Ю.И., Савченко Е.А., Гринштейн И.Ю. Заявитель и патентообладатель: Государственное учреждение Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера Сибирского отделения Российской

академии медицинских наук. – №2007129257/15; опубл. 27.02.2009. Бюл. № 6. – 7 с.

45. Пат. 2413953 С1. Российская Федерация: МПК G01N 33/86. Способ диагностики резистентности к ацетилсалициловой кислоте / Гринштейн Ю.И., Филоненко И.В., Савченко А.А., Савченко Е.А., Гринштейн И.Ю. Заявитель и патентообладатель: Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого. – № 2009131242/15; опубл. 10.03.2011. Бюл. № 7. – 9 с.

46. Пат. 2538219 С2. Российская Федерация: МПК G01N 33/86, G01N 33/15. Способ определения резистентности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте / Ольховский И.А., Столяр М.А. Заявитель и патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Гематологический научный центр" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук", Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения Российской академии наук". – №2013116658/15; опубл. 10.01.2015. Бюл. № 1. – 11 с.

47. Пат. 2699569 С1. Российская Федерация: МПК 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: Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого. – № 2018143960; опубл. 06.09.2019, Бюл. № 25. – 9 с.

48. Пинегина, Н.В. Лейкоцитарно-тромбоцитарные комплексы в патогенезе острого коронарного синдрома. Часть 2 / Н.В. Пинегина // Креативная кардиология. – 2016. – Т. 10, №3. – С. 201-209.

49. Пожилова, Е.В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 13-22.

50. Попова, Л.В. Антиагрегантная терапия в кардиологии / Л.В. Попова, М.Б. Аксенова, Т.В. Хлевчук // Клиническая медицина. – 2016. – Т. 94, № 10. – С. 729-736.
51. Проблема контроля эффективности антитромбоцитарной терапии в кардиологической практике / Н.Ф. Пучиньян, Н.В. Фурман, Л.И. Малинова [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2017. – Т. 13, № 1. – С. 107-115.
52. Рекомендации ЕОК по ведению пациентов с острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST 2017. Адаптированный перевод на русский язык: Аникеева Е.С., Кочергина А.М., Кочергин Н.А. / В. Ibanez, S. James, S. Agewall [et al.] // Российский кардиологический журнал. – 2018. – Т. 23, №5. – С. 103–158.
53. Роль митохондриальных активных форм кислорода в активации врождённого иммунитета / Б.В. Пинегин, Н.В. Воробьёва, М.В. Пащенко [и др.] // Иммунология. – 2018. – Т. 39, №4. – С. 221-229.
54. Роль нейтрофилов в патогенезе атеросклероза / Ю.В. Саранчина, С.В. Дутова, О.Ю. Килина [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2018. – Т. 17, № 6. – С. 110–116.
55. Роль неравномерной оксигенации крови и других условий перфузии в патогенезе гемолиза при операциях с искусственным кровообращением / С.П. Чумакова, В.М. Шипулин, О.И. Уразова [и др.] //Фундаментальная и клиническая медицина. – 2018. – Т. 3, № 1. – С. 22-29.
56. Роль тромбоцитов в воспалении и иммунитете / С.П. Свиридова, О.В. Соменова, Ш.Р. Кашия [и др.] // Исследования и практика в медицине. – 2018. – Т. 5, №3. – С. 40-52.
57. Савченко, А.А. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните / А.А. Савченко, Д.Э. Здзитовецкий, А.Г. Борисов. – Новосибирск: Наука, 2013. – 143 с.
58. Связь агрегации тромбоцитов со свободнорадикальным окислением / Л.В. Кривохижина, Е.Н. Ермолаева, С.А. Кантюков [и др.] // Омский научный вестник. – 2013. – № 1 (118). – С. 124-127.

59. Семенов, А.В. Хемилюминесцентное определение активности нейтрофилов периферической крови при аллергических болезнях легких у детей с грибковой сенсibilизацией / А.В. Семенов, Т.А. Миненкова, Ю.Л. Мизерницкий // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 10. – С. 47-50.
60. Семченко, А.Н. Периоперационные предикторы ранних бессимптомных окклюзий коронарных шунтов после прямой реваскуляризации миокарда / А.Н. Семченко, Т.В. Мусуриевская, Е.В. Россейкин // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2019. – Т. 23, № 2. – С. 20-30.
61. Система гемостаза и аспиринорезистентность при прогрессирующем атеросклерозе магистральных артерий головы / М.М. Танащян, А.А. Раскуражев, А.А. Шабалина [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2017. – №4 (72). – С. 25-31.
62. Смирнова, О.В. Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных миеломной болезнью G-формы в зависимости от стадии заболевания / О.В. Смирнова, В.Т. Манчук, Ю.Н. Агилова // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 6. – С. 579-584.
63. Соловьева, Э.Ю. Антитромбоцитарная терапия как компонент первичной и вторичной профилактики ишемического инсульта / Э.Ю. Соловьева, Э.Д. Джутова, Е.А. Тютюмова // Медицинский совет. – 2016. – № 8. – С. 24-33.
64. Состояние гемостаза и функциональной активности нейтрофилов у больных с разной чувствительностью к ацетилсалициловой кислоте при остром коронарном синдроме / И.Ю. Гринштейн, А.А. Савченко, Ю.И. Гринштейн [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2015. – Т. 14, № 5. – С. 29-34.
65. Стабильная ишемическая болезнь сердца. Клинические рекомендации 2020 / О.Л. Барбараш, Ю.А. Карпов, В.В. Кашталап [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2020. – Т. 25, №11. – С. 201-250.
66. Таратухин, Е.О. Клопидогрел – историческая и современная основа антитромбоцитарной терапии острого коронарного синдрома / Е.О. Таратухин // Терапия. – 2017. – Т. 6, № 16. – С. 76-80.

67. Тромбоцитарные микровезикулы и их роль в обеспечении гемостатического потенциала (обзор литературы) / А.П. Момот, Н.О. Царигородцева, Д.В. Фёдоров [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2020. – Т. 40, № 2. – С. 4-14.
68. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. часть 2. тромбоциты как участники иммунных реакций / Н.Б. Серебряная, С.Н. Шанин, Е.Е. Фомичева [и др.] // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21, № 1. – С. 9-20.
69. Участие tcr  $\alpha\beta$ - и  $\gamma\delta$ - t лимфоцитов, p-селектина в формировании клеточно-тромбоцитарных коагратов / О.А. Солпова, М.А. Аветисян, П.П. Терешков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2016. – №2. – С. 71-79.
70. Хемилюминесцентная активность и агрегация тромбоцитов при хронической коронарной болезни сердца на фоне терапии ацетилсалициловой кислотой до и после коронарного шунтирования / М.Д. Гончаров, Ю.И. Гринштейн, А.А. Савченко [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2021. – Т. 65, № 1. – С. 42-51.
71. Хемилюминесцентная и ферментативная активность нейтрофилов крови у больных с разной степенью тяжести внебольничной пневмонии / А.А. Савченко, Ю.И. Гринштейн, Л.Б. Дресвянкина [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2015. – № 5 (95). – С. 55-61
72. Хемилюминесцентная и энзиматическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания / А.А. Савченко, Д.Э. Здзитовецкий, А.Г. Борисов [и др.] // Вестник РАМН. – 2014. – Т. 69, № 5-6. – С. 23-28.
73. Хемилюминесценция тромбоцитов и эндотелиальная дисфункция у пациентов с острым инфарктом миокарда / Е.В. Рыжкова, Н.Б. Рязанкина, А.М. Лебедева [и др.] // Креативная кардиология. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 195-200.
74. Хемилюминесценция тромбоцитов при физических нагрузках разной интенсивности / В.И. Сергиенко, С.А. Кантюков, Е.Н. Ермолаева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 167, № 6. – С. 686-689.

75. Хемилюминесценция тромбоцитов. Использование метода хемилюминесценции для определения активности тромбоцитов / Л.В. Кривохижина, С.А. Кантюков, Е.Н. Ермолаева [и др.] // Вестник Тюменского государственного университета. Медико-биологические науки. – 2013. – №6. – С. 174-181.
76. Чистик, Т.В. Омоложение инфарктов миокарда и инсультов: современные методы профилактики / Т.В. Чистик // Артериальная гипертензия. – 2016. – Т. 4, № 48. – С. 57-62.
77. Явелов, И.С. Место клопидогрела в современном лечении острого коронарного синдрома / И.С. Явелов // Атеротромбоз. – 2020. № 1. – С. 72-81.
78. A high glucose level is associated with decreased aspirin-mediated acetylation of platelet cyclooxygenase (COX)-1 at serine 529: A pilot study / F. Finamore, J.L. Reny, S. Malacarne [et al.] // Journal of proteomics. – 2019. – Vol. 192. – P. 258-266.
79. A meta-analysis comparing aspirin alone versus dual antiplatelet therapy for the prevention of venous graft failure following coronary artery bypass surgery / K. Hesterberg, A. Rawal, S. Khan [et al.] // Cardiovascular Revascularization Medicine. – 2020. – Vol. 21, № 6. – P. 792-796.
80. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease / P.A. Gum, K. Kottke-Marchant, P.A. Welsh [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2003. – Vol. 41, № 6. – P. 961-965.
81. Acetylsalicylic acid and clopidogrel hyporesponsiveness following acute coronary syndromes / U.S. Tantry, E.P. Navarese, K.P. Bliden [et al.] // Kardiologia Polska (Polish Heart Journal). – 2018. – Vol. 76, № 9. – P. 1312-1319.
82. Acetylsalicylic acid produces different effects on the production of active oxygen species by activated platelets in different inflammatory diseases / Z. Gabbasov, V. Kogan-Yasny, D. Lakhno [et al.] // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2017. – Vol. 164, № 1. – P. 36-40.

83. Activated platelet chemiluminescence and presence of CD45+ platelets in patients with acute myocardial infarction / Z. Gabbasov, O. Ivanova, V. Kogan-Yasny [et al.] // *Platelets*. – 2014. – Vol. 25, № 6. – P. 405-408.
84. Activated  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 on platelets mediates flow-dependent NETosis via SLC44A2 / A. Constantinescu-Bercu, L. Grassi, M. Frontini [et al.] // *Elife*. – 2020. – Vol. 9. – P. e53353.
85. Antioxidants change platelet responses to various stimulating events / A. Sobotková, L. Mášová-Chrastinová, J. Suttner [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2009. – Vol. 47, № 12. – P. 1707-1714.
86. Antiplatelet effects of ticagrelor versus clopidogrel after coronary artery bypass graft surgery: A single-center randomized controlled trial / F. Xu, W. Feng, Z. Zhou [et al.] // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2019. – Vol. 158, № 2. – P. 430-443.
87. Antiplatelet therapy in cardiovascular disease: Current status and future directions / G. Passacuale, P. Sharma, D. Perera [et al.] // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 2022. – Vol. 88, № 6. – P. 2686-2699.
88. Aspirin and its pleiotropic application / J. Hybiak, I. Broniarek, G. Kiryczynski [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 2020. – Vol. 866. – P. 172762.
89. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes / W.C. Schrottmaier, J.B. Kral, S. Badrnya [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 2015. – Vol. 114, № 09. – P. 478-489.
90. Aspirin can stimulate luminol-enhanced chemiluminescence of activated platelets / Z. Gabbasov, O. Ivanova, V. Kogan-Yasny [et al.] // *Platelets*. – 2010. – Vol. 21, № 6. P. 486–489.
91. Aspirin for Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Diabetes: A Review of the Evidence / M.E. Al-Sofiani, R. Derenbecker, M. Quartuccio [et al.] // *Current diabetes reports*. – 2019. – Vol. 19, № 10. – P. 1-10.
92. Aspirin Resistance: Cardiovascular Risk Game Changer / A.S. Yassin, H. Abubakar, T. Mishra [et al.] // *American Journal of Therapeutics*. – 2019. – Vol. 26, № 5. – P. 593-599.

93. Aspirin Resistance in Vascular Disease: A Review Highlighting the Critical Need for Improved Point-of-Care Testing and Personalized Therapy / H. Khan, O. Kanny, M.H. Syed [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 19. – P. 11317.
94. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events / J.W. Eikelboom, J. Hirsh, J.I. Weitz [et al.] // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105, № 14. – P. 1650-1655.
95. Atherosclerosis / P. Libby, J.E. Buring, L. Badimon [et al.] // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2019. – Vol. 5, № 1. – P. 56.
96. Beyond hemostasis: platelet innate immune interactions and thromboinflammation / J. Mandel, M. Casari, M. Stepanyan [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 7. – P. 3868.
97. Blocking CCL5-CXCL4 heteromerization preserves heart function after myocardial infarction by attenuating leukocyte recruitment and NETosis / T. Vajen, R.R. Koenen, I. Werner [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1-11.
98. Cardiac outcome and cost-effectiveness one year after off-pump and on-pump coronary artery bypass surgery: Results from a randomized study / H.M. Nathoe, D. van Dijk, E.W. Jansen [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2003. – Vol. 41, № 6. – P. 105.
99. Chen, X. Oxidative stress in neurodegenerative diseases / X. Chen, C. Guo, J. Kong // *Neural regeneration research*. – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. 376.
100. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation / V. Evangelista, S. Manarini, G. Dell'Elba [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 2005. – Vol. 94, № 3. – P. 568-577.
101. Clopidogrel reduces lipopolysaccharide-induced inflammation and neutrophil-platelet aggregates in an experimental endotoxemic model / X. Wang, H. Deng, T. Li [et al.] // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. – 2019. – Vol. 33, № 4. – P. e22279.

102. Collagen-Induced Platelet Aggregates, Diabetes, and Aspirin Therapy Predict Clinical Outcomes in Acute Ischemic Stroke / K. Harima, S. Honda, K. Mikami [et al.] // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. – 2019. – Vol. 28, № 8. – P. 2302-2310.
103. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction / J. Silvain, J.P. Collet, C. Nagaswami [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2011. – Vol. 57, № 12. – P. 1359–1367.
104. Comparison of Different Laboratory Tests to Identify “Aspirin Resistance” and Risk of Vascular Events among Ischaemic Stroke Patients: A Double-Blind Study / N. Venketasubramanian, S. J. Agustin, J. L. Padilla [et al.] // *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. – 2022. – Vol. 9, № 5. – P. 156.
105. Coronary artery bypass graft surgery versus percutaneous coronary intervention in patients with three-vessel disease and left main coronary disease: 5-year follow-up of the randomized, clinical SYNTAX trial / F.W. Mohr, M-C. Morice, A.P. Kappetein [et al.] // *The Lancet*. – 2013. – Vol. 381, № 9867. – P. 629-638.
106. COX-1, COX-2 and CYP2C19 variations may be related to cardiovascular events due to acetylsalicylic acid resistance / D. Kirac, A.E. Yaman, T. Doran [et al.] // *Molecular Biology Reports*. – 2022. – Vol. 49, № 4. – P. 3007-3014.
107. Coronary artery bypass grafting using the radial artery: clinical outcomes, patency, and need for reintervention / R.F. Tranbaugh, K.R. Dimitrova, P. Friedmann [et al.] // *Circulation*. – 2012. – Vol. 126, № 11 (suppl. 1). – P. S170- S175.
108. De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin / V. Evangelista, S. Manarini, A. Di Santo [et al.] // *Circulation research*. – 2006. – Vol. 98, № 5. – P. 593-595.
109. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology / H. Sies, V.V. Belousov, N.S. Chandel [et al.] // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2022. – Vol. 23, № 7. – P. 499-515.
110. Dehghani, T. Endothelial cells, neutrophils and platelets: getting to the bottom of an inflammatory triangle / T. Dehghani, A. Panitch // *Open biology*. – 2020. – Vol. 10, № 10. – P. 200161.

111. Delayed neutrophil apoptosis may enhance NET formation in ARDS / C. Song, H. Li, Z. Mao[et al.] // *Respiratory Research*. – 2022. – Vol. 23, № 1. – P. 1-15.
112. Denorme, F. Brothers in arms: platelets and neutrophils in ischemic stroke / F. Denorme, J.L. Rustad, R.A.Campbell // *Current Opinion in Hematology*. – 2021. – Vol. 28, № 5. – P. 301-307.
113. DeStephan, C.M. Antiplatelet therapy for patients undergoing coronary artery bypass surgery / C.M. DeStephan, D.J. Schneider // *Kardiologia Polska (Polish Heart Journal)*. – 2018. – Vol. 76, № 6. – P. 945-952.
114. Determinants of aspirin resistance in patients with type 2 diabetes / E. Paven, J.G. Dillinger, C. Bal Dit Sollier [et al.] // *Diabetes & Metabolism*. – 2020. – Vol. 46, № 5. – P. 370-376.
115. Differential interaction of platelet-derived extracellular vesicles with circulating immune cells: roles of TAM receptors, CD11b, and phosphatidylserine / B. Fendl, T. Eichhorn, R. Weiss [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2797.
116. Differential roles of the NADPH-oxidase 1 and 2 in platelet activation and thrombosis / M.K. Delaney, K. Kim, B. Estevez [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2016. – Vol. 36, № 5. – P. 846-854.
117. Directed transport of neutrophil-derived extracellular vesicles enables platelet-mediated innate immune response / J. Rossaint, K. Kühne, J. Skupski [et al.] // *Nature communications*. – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 1-14.
118. Du, G. A brief review on the mechanisms of aspirin resistance / G. Du, Q. Lin, J. Wang // *International journal of cardiology*. – 2016. – Vol. 220. – P. 21-26.
119. Effect of ticagrelor plus aspirin, ticagrelor alone, or aspirin alone on saphenous vein graft patency 1 year after coronary artery bypass grafting: a randomized clinical trial / Q. Zhao, Y. Zhu, Z. Xu [et al.] // *JAMA*. – 2018. – Vol. 319, № 6. – P. 1677-1686.
120. Effects of minimal extracorporeal circulation on the systemic inflammatory response and the need for transfusion after coronary bypass grafting surgery / M.E. Elçi, A. Kahraman, E. Mutlu [et al.] // *Cardiology research and practice*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1-8.

121. Efficacy of aspirin and statins in primary prevention of cardiovascular mortality in uncomplicated hypertensive participants: a Korean national cohort study / C.J. Lee, J. Oh, S.H. Lee [et al.] // *Journal of hypertension*. – 2017. – Vol. 35, № 1. – P. S33-S40.
122. Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation / A. Sarniak, J. Lipinska, K. Tytman [et al.] // *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczonej*. – 2016. – Vol. 70. – P. 1150-1165.
123. Endothelial injury and acquired aspirin resistance as promoters of regional thrombin formation and early vein graft failure after coronary artery bypass grafting / R.S. Poston, J. Gu, J.M. Brown [et al.] // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. – 2006. – Vol. 131, № 1. – P. 122-130.
124. Epidemiology of Coronary Artery Disease / J.P. Duggan, A.S. Peters, G.D. Trachiotis [et al.] // *Surgical Clinics*. – 2022. – Vol. 102, № 3. – P. 499-516.
125. ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes (2019): The Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC) / J. Knuuti, W. Wijns, A. Saraste [et al.] // *European Heart Journal*. – 2020. – Vol. 41, № 3. – P. 407-477.
126. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation (2020) / J.P. Collet, H. Thiele, E. Barbato [et al.] // *European Heart Journal*. – 2021. – Vol. 42, № 14. – P. 1289-1367.
127. ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization (2018) / F-J. Neumann, M. Sousa-Uva, A. Ahlsson [et al.] // *European Heart Journal*. – 2019. – Vol. 40, № 2. – P. 87-165.
128. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts). Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR) / M. F. Piepoli, A.W. Hoes, S. Agewall [et al.] // *European Heart Journal*. – 2016. – Vol. 37, №29. – P. 2315- 2381.

129. Fahed, C. Plaque erosion and acute coronary syndromes: phenotype, molecular characteristics and future directions / C. Fahed, I.K. Jang // *Nature Reviews Cardiology*. – 2021. – Vol. 18, № 10. – P. 724-734.
130. FLow-induced PRotrusions (FLIPRs): a platelet-derived platform for the retrieval of microparticles by monocytes and neutrophils / C. Tersteeg, H.F. Heijnen, A. Eckly [et al.] // *Circulation research*. – 2014. – Vol. 114, № 5. – P. 780-791.
131. Forstermann, U. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis / U. Forstermann, N. Xia, H. Li // *Circulation research*. – 2017. – Vol. 120, № 4. – P. 713-735.
132. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018) / K. Thygesen, J.S. Alpert, A.S. Jaffe [et al.] // *Circulation*. – 2018. – Vol. 138, № 20. e618-e651.
133. Fracture healing and the underexposed role of extracellular vesicle-based crosstalk / Z. Qiao, J. Greven, K. Horst [et al.] // *Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches*. – 2018. – Vol. 49, № 5. – P. 486-496.
134. Frequency of development of aspirin resistance in the early postoperative period and inadequate inhibition of thromboxane A<sub>2</sub> production after coronary artery bypass surgery / H. Özkan, İ. Kiriş, Ş. Gülmen [et al.] // *Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2018. – Vol. 26, № 4. – P. 536-543.
135. Fukai, T. Cross-Talk between NADPH Oxidase and Mitochondria: Role in ROS Signaling and Angiogenesis / T. Fukai, M. Ushio-Fukai // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 8. – P. 1849.
136. Functional and Biochemical Evaluation of Platelet Aspirin Resistance After Coronary Artery Bypass Surgery / N. Zimmermann, A. Wenk, U. Kim [et al.] // *Circulation*. – 2003. – Vol. 108, № 5. – P. 542-547.
137. Gaertner, F. Patrolling the vascular borders: platelets in immunity to infection and cancer / F. Gaertner, S. Massberg // *Nature Reviews Immunology*. – 2019. – Vol. 19, № 12. – P. 747-760.
138. Gambaryan, S. A review and discussion of platelet nitric oxide and nitric oxide synthase: do blood platelets produce nitric oxide from L-arginine or nitrite? / S. Gambaryan, D. Tsikas // *Amino Acids*. – 2015. – Vol. 47, № 9. – P. 1779-1793.

139. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019 / T. Vos, S.S. Lim, C. Abbafati [et al.] // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 396, № 10258. – P. 1204-1222.
140. Ghasemzadeh, M. Platelet granule release is associated with reactive oxygen species generation during platelet storage: A direct link between platelet pro-inflammatory and oxidation states / M. Ghasemzadeh, E. Hossein // *Thrombosis Research*. – 2017. – Vol. 156. – P. 101-104.
141. Gros, A. Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair / A. Gros, V. Ollivier, B. Ho-Tin-Noé [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2015. – Vol. 5. – P. 678.
142. Guidelines for the management of arterial hypertension ESC/ESH / B. Williams, G. Mancia, W. Spiering [et al.] // *European Heart Journal*. – 2018. – Vol. 39, № 33. – P. 3021 – 3104.
143. Gunaydin, B. Interaction of lidocaine with reactive oxygen and nitrogen species / B. Gunaydin, A.T. Demiryurek // *European journal of anaesthesiology*. – 2001. – Vol. 18, № 12. – P. 816-822.
144. Hajar, R. Risk factors for coronary artery disease: historical perspectives / R. Hajar // *Heart views: the official journal of the Gulf Heart Association*. – 2017. – Vol. 18, № 3. – P. 109-114.
145. Hankey, G.J. Aspirin resistance / G.J. Hankey, J. Eikelboom // *The Lancet*. – 2006. – Vol. 367, № 9510. – P. 606-617.
146. Haselmayer, P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation / P. Haselmayer, L. Grosse-Hovest, P. Von Landenberg // *Blood*. – 2007. – Vol. 110, № 3. – P. 1029-1035.
147. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American heart association / E.J. Benjamin, S.S. Virani, C.W. Callaway [et al.] // *Circulation*. – 2018. – Vol. 137, № 12. – e67-e492.
148. Hemorrhagic shock activates lung endothelial reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase via neutrophil NADPH oxidase / M. Xiang,

- L. Yin, Y. Li [et al.] // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 2011. – Vol. 44, № 3. – P. 333–340.
149. Herrero-Cervera, A. Neutrophils in chronic inflammatory diseases / A. Herrero-Cervera, O. Soehnlein, E. Kenne [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2022. – Vol. 19, № 2. – P. 177-191.
150. Herter, J.M. Platelets in inflammation and immunity / J.M. Herter, J. Rossaint, A. Zarbock // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2014. – Vol. 12, №. 11. – P. 1764-1775.
151. Hydrogen peroxide promotes aging-related platelet hyperactivation and thrombosis / S. Dayal, K.M. Wilson, D.G. Motto [et al.] // *Circulation* – 2013. – Vol. 127, № 12. – P. 1308–1316.
152. Impact of Multidrug Resistance Protein-4 Inhibitors on Modulating Platelet Function and High on-Aspirin Treatment Platelet Reactivity / L. Alemanno, I. Massimi, V. Klaus [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2018. – Vol. 118, № 3. – P. 490-501.
153. Impact of pharmacogenetics on aspirin resistance: a systematic review / G.F. da Silva, B.M. Lopes, V. Moser [et al.] // *Arquivos de Neuro-psiquiatria*. – 2023. – Vol. 81, № 01. – P. 62-73.
154. Increased basal platelet activity, plasma adiponectin levels, and diabetes mellitus are associated with poor platelet responsiveness to in vitro effect of aspirin / S. Takahashi, M. Ushida, R. Komine [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2007. – Vol. 119, № 4. – P. 517-524.
155. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention / P. Kong, Z.Y. Cui, X.F. Huang [et al.] // *Signal transduction and targeted therapy*. – 2022. – Vol. 7, № 1. – P. 131.
156. Inflammation and its Resolution as Determinants of Acute Coronary Syndromes / P. Libby, I. Tabas, G. Fredman [et al.] // *Circulation Research*. – 2014. – Vol. 114, № 12. – P. 1867-1879.
157. Inflammation Induced by Platelet-Activating Viperid Snake Venoms: Perspectives on Thromboinflammation / C. Teixeira, C.M. Fernandes, E. Leiguez [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2082.

158. Influence of lipoproteins and antiplatelet agents on vein graft patency 1 year after coronary artery bypass grafting / J. Zhu, Y. Zhu, M. Zhang [et al.] // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2022. – Vol. 163, №3. – P. 1030-1039.e4.
159. 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? / M. Ghasemzadeh, E. Hosseini, Z. O. Roudsari [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2018. – Vol. 163. – P. 153-161.
160. Khodadi, E. Platelet function in cardiovascular disease: activation of molecules and activation by molecules / E. Khodadi // *Cardiovascular Toxicology*. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 1-10.
161. Kobzar, G. Glucose impairs aspirin inhibition in platelets through a NAD(P)H oxidase signaling pathway / G. Kobzar, V. Mardla, N. Samel // *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. – 2017. – Vol. 131. – P. 33-40.
162. Leukocyte integrin Mac-1 regulates thrombosis via interaction with platelet GPIIb/IIIa / Y. Wang, H. Gao, C. Shi [et al.] // *Nature communications*. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 1-16.
163. Lewandowski, L. The copper-zinc superoxide dismutase activity in selected diseases / L. Lewandowski, M. Kepinska, H. Milnerowicz // *European journal of clinical investigation*. – 2019. – Vol. 49, № 1. – P. e13036.
164. Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors / K. Lechner, C. von Schacky, A.L. McKenzie [et al.] // *European Journal of Preventive Cardiology*. – 2020. – Vol. 27, № 4. – P. 394-406.
165. Lisman, T. Platelet–neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease / T. Lisman // *Cell and tissue research*. – 2018. – Vol. 371, № 3. – P. 567-576.
166. Low-Dose Aspirin Treatment Attenuates Male Rat Salt-Sensitive Hypertension via Platelet Cyclooxygenase 1 and Complement Cascade Pathway / X. Jiang, X. Liu, X. Liu [et al.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. e013470.

167. Low Grade Endotoxemia and Oxidative Stress in Offspring of Patients with Early Myocardial Infarction / B.L. Cinicola, I.M. Palumbo, A. Pannunzio [et al.] // *Antioxidants*. – 2023. – Vol. 12, № 4. – P. 958.
168. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses / P. Khan, D. Idrees, M.A. Moxley [et al.] // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 173, № 2. – P. 333–355.
169. MicroRNA: relevance to stroke diagnosis, prognosis, and therapy / H. Mirzaei, F. Momeni, L. Saadatpour [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2018. – Vol. 233, № 2. – P. 856-865.
170. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases / X. Loyer, A.C. Vion, A. Tedgui [et al.] // *Circulation Research*. – 2014. – Vol. 114, № 2. – P. 345–353.
171. Modica, A. Platelet aggregation and aspirin non-responsiveness increase when an acute coronary syndrome is complicated by an infection/ A. Modica, F. Karlsson, T. Mooe // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 5, № 3. – P. 507-511.
172. Modulation of microRNAs by aspirin in cardiovascular disease / M. Paseban, R.M. Marjaneh, M. Banach // *Trends in cardiovascular medicine*. – 2020. – Vol. 30, № 5. – P. 249-254.
173. Modulatory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of equine neutrophils / H. Benbarek, A. Ayad, G. Deby-Dupont [et al.] // *Veterinary Research Communications*. – 2012. – Vol. 36, № 1. – P. 29–33.
174. Molecular basis for unique specificity of human TRAF4 for platelets GPIIb/IIIa and GPVI / C.M. Kim, Y.J. Son, S. Kim [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114, № 43. – P. 11422-11427.
175. Mozzini, C. Cardiovascular diseases: Consider netosis / C. Mozzini, M. Pagani // *Current Problems in Cardiology*. – 2022. – Vol. 47, №. 10. – P. 100929.
176. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a suspected efflux transporter for human's platelet activation / // *Protein and Peptide Letters*. – 2021. – Vol. 28, № 9. – P. 983-995.

177. Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury / K. Kubota, H. Saiwai, H. Kumamaru [et al.] // *Spine*. – 2012. – Vol. 37, № 16. – P. 1363-1369.
178. NADPH oxidase 2 (NOX2): A key target of oxidative stress-mediated platelet activation and thrombosis / E. Fuentes, J.M. Gibbins, L.M. Holbrook [et al.] // *Trends in cardiovascular medicine*. – 2018. – Vol. 28, № 7. – P. 429-434.
179. NADPH Oxidase 2 Mediates Myocardial Oxygen Wasting in Obesity / A.D. Hafstad, S.S. Hansen, J. Lund [et al.] // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9, № 2. – P. 171.
180. NADPH Oxidases Are Required for Full Platelet Activation In Vitro and Thrombosis In Vivo but Dispensable for Plasma Coagulation and Hemostasis / D. Vara, R.K. Mailer, A. Tarafdar [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2021. – Vol. 41, № 2. – P. 683-697.
181. Ndrepepa, G. Myeloperoxidase - A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease / G. Ndrepepa // *Clinica chimica acta*. – 2019. – Vol. 493. – P. 36-51.
182. Neutrophil cathepsin g proteolysis of protease-activated receptor 4 generates a novel, functional tethered ligand / M.L. Stoller, I. Basak, F. Denorme [et al.] // *Blood advances*. – 2022. – Vol. 6, № 7. – P. 2303-2308.
183. Neutrophil counts and initial presentation of 12 cardiovascular diseases: a CALIBER cohort study / A.D. Shah, S. Denaxas, O. Nicholas [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2017. – Vol. 69, № 9. – P. 1160-1169.
184. Neutrophil degranulation and myocardial infarction / N. Zhang, X. Aiyasiding, W.J. Li [et al.] // *Cell Communication and Signaling*. – 2022. – Vol. 20, № 1. – P. 1–23.
185. Neutrophil Extracellular Traps Participate in All Different Types of Thrombotic and Haemorrhagic Complications of Coronary Atherosclerosis / K.R. Pertiwi, A.C. Van Der Wal, D.R. Pabittei [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2018. – Vol. 118, №6. – P. 1078-1087.

186. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a risk marker in cardiovascular disease (Review) / Z. Sivalingam, S.B. Larsen, E.L. Grove [et al.] // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2017. – Vol. 56, № 1. – P. 5-18.
187. Neutrophil-Platelet Interactions as Novel Treatment Targets in Cardiovascular Disease / R. Kaiser, R. Escaig, J. Erber [et al.] // *Frontiers in cardiovascular medicine*. – 2022. – P. 2272.
188. Neutrophil "plucking" on megakaryocytes drives platelet production and boosts cardiovascular disease / T. Petzold, Z. Zhang, I. Ballesteros [et al.] // *Immunity*. – 2022. – Vol. 55, № 12. – P. 2285-2299.
189. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation / C. Silvestre-Roig, Q. Braster, A. Ortega-Gomez [et al.] // – 2020. – Vol. 17, № 6. – P. 327-340.
190. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension / R. Hernanz, A.M. Briones, M. Salaces [et al.] // *Clinical science*. – 2014. – Vol. 126, № 2. – P. 111-121.
191. Nicolai, L. Platelets in host defense: experimental and clinical insights / L. Nicolai, F. Gaertner, S. Massberg // *Trends in immunology*. – 2019. – Vol. 40, № 10. – P. 922-938.
192. Nox2 NADPH oxidase is dispensable for platelet activation or arterial thrombosis in mice / V.K. Sonkar, R. Kumar, M. Jensen [et al.] // *Blood advances*. – 2019. – Vol. 3, № 8. – P. 1272-1284.
193. Once versus twice daily aspirin after coronary bypass surgery: a randomized trial / J.S. Paikin, J. Hirsh, J.S. Ginsberg [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2017. – Vol. 15, № 5. – P. 889-896.
194. Over-expression of cyclooxygenase-2 in increased reticulated platelets leads to aspirin resistance after elective off-pump coronary artery bypass surgery / X. Gong, X. Wang, Z. Xu [et al.] // *Thrombosis research*. – 2017. – Vol. 160. – P. 114-118.
195. Oxidative stress elicits platelet/leukocyte inflammatory interactions via HMGB1: a candidate for microvessel injury in systemic sclerosis / N. Maugeri, P. Rovere-Querini, M. Baldini [et al.] // *Antioxidants & redox signaling*. – 2014. – Vol. 20, № 7. – P. 1060-1074.

196. p47phox deficiency impairs platelet function and protects mice against arterial and venous thrombosis / X. Wang, S. Zhang, Y. Ding [et al.] // *Redox Biology*. – 2020. – Vol. 34. – P. 101569.
197. Patrono, C. Role of aspirin in primary prevention of cardiovascular disease / C. Patrono, C. Baigent // *Nature Reviews Cardiology*. – 2019. – Vol. 16, № 11. – P. 675-686.
198. Peripheral Blood Mononuclear Cells and Platelets Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Circulating mtDNA in Cardiovascular Diseases / A. Alfatni, M. Riou, A.L. Charles [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 9, №. 2. – P. 311.
199. Persistent circulating platelet and endothelial derived microparticle signature may explain on-going pro-thrombogenicity after acute coronary syndrome / S. Koganti, D. Eleftheriou, R. Gurung [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2005. – Vol. 206. – P. 60-65.
200. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of a novel phospholipid-aspirin complex liquid formulation and low dose enteric-coated aspirin: results from a prospective, randomized, crossover study / F. Franchi, D.J. Schneider, J. Prats [et al.] // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2022. – Vol. 54, № 3. – P. 373–381.
201. Platelet activation and antiplatelet therapy in sepsis: A narrative review / Y. Wang, Y. Ouyang, B. Liu [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2018. – Vol. 166. – P. 28-36.
202. Platelets and Cardioprotection: The Role of Nitric Oxide and Carbon Oxide / I. Russo, C. Barale, E. Melchionda [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 7. – P. 6107.
203. Platelet CD40 exacerbates atherosclerosis by transcellular activation of endothelial cells and leukocytes / N. Gerdes, T. Seijkens, D. Lievens [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2016. – Vol. 36, № 3. – P. 482-490.
204. Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis / C. Bakogiannis, M. Sachse, K. Stamatelopoulos [et al.] // *Cytokine*. – 2011. – Vol. 122. – P. 154157.

205. Platelet function assays for the diagnosis of aspirin resistance / N. Van Oosterom, M. Barras, N. Cottrell [et al.] // *Platelets*. – 2022. – Vol. 33, № 3. – P. 329-338.
206. Platelet function one and three months after coronary bypass surgery in relation to once or twice daily dosing of acetylsalicylic acid / T. Ivert, M. Dalén, C. Ander [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2017. – Vol. 149. – P. 64-69.
207. Platelet glycoprotein VI aids in local immunity during pneumoniaderived sepsis caused by gram-negative bacteria / T.A.M. Claushuis, A.F. de Vos, B. Nieswandt [et al.] // *Blood*. – 2018. – Vol. 131, № 8. – P. 864–876.
208. Platelet miRNA-26b down-regulates multidrug resistance protein 4 in patients on chronic aspirin treatment / G. La Rosa, L.M. Biasucci, C. Mandolini [et al.] // *Journal of Cardiovascular Medicine*. – 2018. – Vol. 19, № 10. – P. 611-613.
209. Platelet P2Y12 inhibitors reduce systemic inflammation and its prothrombotic effects in an experimental human model / M.R. Thomas, S.N. Outteridge, R.A. Ajjan [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2015. – Vol. 35, № 12. – P. 2562-2570.
210. Platelet receptors as therapeutic targets: past, present and future / J. Jamasbi, K. Ayabe, S. Goto [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 2017. – Vol. 117, № 7. – P. 1249–1257.
211. Platelet-adenovirus vs. Inert particles interaction: Effect on aggregation and the role of platelet membrane receptors / E. Gupalo, C. Kuk, M. Qadura [et al.] // *Platelets*. – 2013. – Vol. 24, № 5. – P. 383–391.
212. Platelet-derived alpha-granules are associated with inflammation in patients with NK/T-cell lymphoma-associated hemophagocytic syndrome / Q. Ren, K.W. Chan, H. Huang [et al.] // *Cytokine*. – 2020. – Vol. 126. – P. 154878.
213. Platelet-derived exosomes promote neutrophil extracellular trap formation during septic shock / Y. Jiao, W. Li, W. Wang [et al.] // *Critical Care*. – 2020. – Vol. 24, № 1. – P. 1-18.
214. Platelet-leukocyte interplay during vascular disease / W.C. Schrottmaier, M. Mussbacher, M. Salzman [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2020. – Vol. 307. – P. 109-120.

215. Platelet-Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis / J. Pircher, B. Engelmann, S. Massberg [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2019. – Vol. 119, № 08. – P. 1274-1282.
216. Platelets as Key Factors in Inflammation: Focus on CD40L/CD40 / F. Cognasse, A.C. Duchez, E. Audoux [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. e825892.
217. Platelets at the Crossroads of Pro-Inflammatory and Resolution Pathways during Inflammation / N. Ludwig, A. Hilger, A. Zarbock [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, № 12. – P. 1957.
218. Platelets redox balance assessment: Current evidence and methodological considerations / A. Komosa, P. Rzymiski, B. Perek [et al.] // *Vascular Pharmacology*. – 2017. – Vol. 93. – P. 6-13.
219. Prevalence of aspirin resistance in patients with an evolving acute myocardial infarction / T.S. Poulsen, B. Jørgensen, L. Korsholm [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2007. – Vol. 119, № 5. – P. 555-562.
220. Prevalence rate of laboratory defined aspirin resistance in cardiovascular disease patients: A systematic review and meta-analysis / P. Ebrahimi, Z. Farhadi, M. Behzadifar [et al.] // *Caspian Journal of Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 11, № 2. – P. 124-134.
221. Procedural myocardial injury, infarction and mortality in patients undergoing elective PCI: a pooled analysis of patient-level data / J. Silvain, M. Zeitouni, V. Paradies [et al.] // *European Heart Journal*. – 2021. – Vol. 42, № 4. – P. 323-334.
222. Protein Disulphide Isomerase and NADPH Oxidase 1 Cooperate to Control Platelet Function and Are Associated with Cardiometabolic Disease Risk Factors / R. S. Gaspar, T. Sage, G. Little [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10, №3. – P. 497.
223. Ramirez, G.A. Misunderstandings Between Platelets and Neutrophils Build in Chronic Inflammation / G.A. Ramirez, A.A. Manfredi, N. Maugeri // *Frontiers in immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2491.

224. Raposo, G. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends / G. Raposo, W. Stoorvogel // *Journal of Cell Biology*. – 2013. – Vol. 200, № 4. – P. 373-383.
225. Reactive Oxygen Species Generated by CD45-Cells Distinct from Leukocyte Population in Platelet Concentrates Is Correlated with the Expression and Release of Platelet Activation Markers during Storage / M. Ghasemzadeh, E. Hosseini, A.S. Ghasabeh [et al.] // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. – 2018. – Vol. 45, № 1. – P. 33-41.
226. Regulation of microvascular thromboembolism in vivo / M.G. Egbrink, M.A. Van Gestel, M.A. Broeders [et al.] // *Microcirculation*. – 2005, – Vol. 12, №3. – P. 287-300.
227. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species / J. Qiao, J.F. Arthur, E.E. Gardiner [et al.] // *Redox Biology*. – 2018. – Vol. 14. – P. 126–130.
228. Relationship between the Increased Haemostatic Properties of Blood Platelets and Oxidative Stress Level in Multiple Sclerosis Patients with the Secondary Progressive Stage / A. Morel, M. Bijak, E. Miller [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 240918.
229. Resistance to Acetylsalicylic Acid in Patients with Coronary Heart Disease Is the Result of Metabolic Activity of Platelets / Yu.I. Grinshtein, A.A. Savchenko, A.A. Kosinova [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2020. – Vol. 13, № 8. – P. 178.
230. Role of focal adhesion tyrosine kinases in GPVI-dependent platelet activation and reactive oxygen species formation / N. Carrim, T. G. Walsh, A. Consonni [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 11. – P. 1-19.
231. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation / B. Zhang, C. Pan, C. Feng [et al.] // *Redox Report*. – 2022. – Vol. 27, № 1, – P. 45–52.
232. Role of Neutrophil Extracellular Traps and Vesicles in Regulating Vascular Endothelial Permeability / Y. Ma, X. Yang, V. Chatterjee [et al.] // *Frontier in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1037.

233. ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights / E. Masselli, G. Pozzi, M. Vaccarezza [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 14. – P. 4866.
234. Royse, A. Long-term survival after coronary bypass surgery with multiple versus single arterial grafts / A. Royse, C. Royse, J. Ren // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. – 2022. – Vol. 62, № 4. – P. ezac002.
235. Rubboli A., Vecchio S. Antiplatelet therapy after coronary bypass grafting: which regimen and for whom? / A. Rubboli, S. Vecchio // *European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 7, № 6. – P. 527-528.
236. Sex differences in heart failure / A.N. Lala, U. Tayal, C.E. Hamo [et al.] // *Journal of cardiac failure*. – 2022. – Vol. 28, № 3. – P. 477-498.
237. Shear and Integrin Outside-In Signaling Activate NADPH-Oxidase 2 to Promote Platelet Activation / Z.Xu, Y. Liang, M.K. Delaney [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2021. – Vol. 41, № 5. – P. 1638-1653.
238. Shed-blood-separation and cellsaver: an integral part of MiECC? Shed-blood-separation and its influence on the perioperative inflammatory response during coronary revascularization with minimal invasive extracorporeal circulation systems a randomized controlled trial / A. Bauer, H. Hausmann, J. Schaarschmidt [et al.] // *Perfusion*. – 2018. – Vol. 33, № 2. – P. 136-147.
239. Stark, K. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology / K. Stark, S. Massberg // *Nature Reviews Cardiology*. – 2021. – Vol. 18, № 9. – P. 666-682.
240. Stark, K. Platelet-neutrophil crosstalk and netosis / K. Stark // *HemaSphere*. – 2019. – Vol. 3, № Suppl – P. 89-91.
241. Systemic inflammatory responses in acute coronary syndrome: increased activity observed in polymorphonuclear leucocytes but not T-lymphocytes / T. Takeshita Isshiki, M. Ochiai, T. Ishikawa [et al.] // *Atherosclerosis*. – 1997. – Vol. 135, № 2. – P. 187-192.
242. Tailored antiplatelet therapy can overcome clopidogrel and aspirin resistance—the BOchum CLopidogrel and Aspirin Plan (BOCLA-Plan) to improve antiplatelet therapy

- / H. Neubauer, A.F. Kaiser, H.G. Endres [et al.] // BMC medicine. – 2011. – Vol. 9, № 1. – P. 1-12.
243. Tao Zhang, S.C. Platelet-derived extracellular vesicles: an emerging therapeutic approach / S.C. Tao Zhang, C.Q. Guo // International journal of biological sciences. – 2017. – Vol. 13, № 7. – P. 828.
244. The Prevalence and Clinical Relevance of ASA Nonresponse After Cardiac Surgery: A Prospective Bicentric Study / S.Wand, E.H. Adam, A.J. Wetz [et al.] // Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. – 2018. – Vol. 24, № 1. – P. 179-185.
245. The prevalence, risk factors and prognosis of aspirin resistance in elderly male patients with cardiovascular disease / J. Cao, L. Liu, L. Fan. [et al.] // The Aging Male. – 2012. – Vol. 15, № 3. – P. 140-147.
246. The prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio across all stages of coronary artery disease / R. Agarwal, R.G. Aurora, B.B. Siswanto [et al.] // Coronary Artery Disease. – 2022. – Vol. 33, № 2. – P. 137-143.
247. The role of P2Y receptors in regulating immunity and metabolism / M. Lovászi, C.B. Haas, L. Antonioli [et al.] // Biochemical pharmacology. – 2021. – Vol. 187. – P. 114419.
248. Thirty-year follow-up defines survival benefit for second internal mammary artery in propensity-matched groups / P.A. Kurlansky, E.A. Traad, M.J. Dorman [et al.] // The Annals of thoracic surgery. – 2010. – Vol. 90, № 1. – P. 101-108.
249. Thrombin-induced reactive oxygen species generation in platelets: a novel role for protease-activated receptor 4 and GPIIb $\alpha$  / N. Carrim, J.F. Arthur, J.R. Hamilton [et al.] // Redox Biology. – 2015. – Vol. 6. – P. 640–647.
250. Unique crosstalk between platelet and leukocyte counts during treatment for acute coronary syndrome: A retrospective observational study / K. Shirasaki, K. Minai, M. Kawai [et al.] // Medicine. – 2022. – Vol. 101, № 52. – P. e32439.
251. Urinary 11-dehydrothromboxane B2 aspirin efficacy testing is sensitive to perioperative inflammation in pediatric solid-organ transplant patients / A.A. Boucher, B.J. Francisco, A. Pfeiffer [et al.] // Pediatric Blood & Cancer. – 2022. – Vol. 69, № 2. – P. e29413.

252. Violi, F. Platelet NOX, a novel target for anti-thrombotic treatment / F. Violi, P. Pignatelli // *Thrombosis and haemostasis*. – 2014. – Vol. 111, № 05. – P. 817-823.
253. Wolf, D. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis / D. Wolf, K. Ley // *Circulation research*. – 2019. – Vol. 124, № 2. – P. 315-327.
254. Xiao, Y. Characterization of free radicals formed from COX-catalyzed DGLA peroxidation / Y. Xiao, Y. Gu, P. Purwaha // *Free radical biology and medicine*. – 2011. – Vol. 50, № 9. – P. 1163-1170.
255. Xiong, Y. Molecular Tools to Generate Reactive Oxygen Species in Biological Systems / Y. Xiong, X. Tian, H.W. Ai // *Bioconjugate chemistry*. – 2019. – Vol. 30, № 5. – P. 1297-1303.
256. Zang, Y. Nitric oxide-mediated fibrinogen deposition prevents platelet adhesion and activation / Y. Zang, K.C. Popat, M.M. Reynolds // *Biointerphases*. – 2018. – Vol. 13, № 6. – P. 06E403.
257. Zimmerman, G.A. Signal-Dependent Protein Synthesis by Activated Platelets New Pathways to Altered Phenotype and Function / G.A. Zimmerman, A.S. Weyrich // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2008. – Vol. 28, № 3. – P. s17-s24.
258. Zinc regulates reactive oxygen species generation in platelets / M.E. Lopes-Pires, N.S. Ahmed, D. Vara [et al.] // *Platelets*. – 2021. – Vol. 32, № 3. – P. 368-377.

## СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

### Рисунки

Рисунок 1. Ультрамикроскопическое строение нейтрофильного гранулоцита .....	25
Рисунок 2. Гранулы тромбоцитов и секретируемые ими факторы .....	28
Рисунок 3. Взаимодействие тромбоцитов и нейтрофилов.....	40
Рисунок 4. Схема алгоритма исследования пациентов с ИБС .....	51
Рисунок 5. Хемилюминесцентные показатели тромбоцитов у пациентов с ИБС до КШ (Ме (С25-С75)).....	62
Рисунок 6. Хемилюминесцентные показатели тромбоцитов у пациентов с ИБС в первые сутки после КШ (Ме (С25-С75)) .....	63
Рисунок 7. Хемилюминесцентные показатели тромбоцитов у пациентов с ИБС на 8-10-е сутки после КШ (Ме (С25-С75)).....	64
Рисунок 8. Хемилюминесцентные показатели нейтрофилов у пациентов с ИБС до КШ (Ме (С25-С75)).....	69
Рисунок 9. Хемилюминесцентные показатели нейтрофилов у пациентов с ИБС в первые сутки после КШ (Ме (С25-С75)) .....	70
Рисунок 10. Хемилюминесцентные показатели нейтрофилов у пациентов с ИБС на 8–10-е сутки после КШ (Ме (С25-С75)) .....	70
Рисунок 11. Предполагаемое взаимодействие тромбоцитов и нейтрофилов у чувствительных и резистентных к АСК и/или АСК и клопидогрелу пациентов с ИБС при терапии АСК или ДАТ .....	88
Рисунок 12. Предполагаемое взаимодействие тромбоцитов и нейтрофилов у резистентных к АСК или АСК и клопидогрелу пациентов с ИБС при терапии АСК и клопидогрелом.....	89

**Таблицы**

Таблица 1 – Агонисты и соответствующие рецепторы тромбоцитов .....	28
Таблица 2 – Клинико-лабораторная характеристика пациентов на фоне терапии АСК и ДАТ (Ме (С25-С75)) .....	48
Таблица 3 – Сравнение предлагаемого способа с лабораторными данными чувствительности к АСК .....	58
Таблица 4 – Агрегационная активность тромбоцитов у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75)) .....	60
Таблица 5 – Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люцигенином у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75)) .....	64
Таблица 6 – Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люминолом у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75)) .....	67
Таблица 7 – Хемилюминесцентная активность нейтрофилов с люцигенином у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75)) .....	72
Таблица 8 – Хемилюминесцентная активность нейтрофилов с люминолом у пациентов с ИБС (Ме (С25-С75)) .....	73
Таблица 9 – Корреляция между показателями хемилюминесценции нейтрофилов и тромбоцитов с люцигенином в группе чувствительных к АСК или АСК и клопидогрелу пациентов с ИБС .....	79
Таблица 10 – Корреляция между показателями хемилюминесценции нейтрофилов и тромбоцитов с люцигенином в группе резистентных к АСК пациентов с ИБС на монотерапии АСК .....	79