

Barinov E. F., Mamedaliyeva S., Balykina A. O., Tverdokhleб T. A. Влияние адреналина на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов при хронической ишемии головного мозга = Effect of epinephrine on ADP-induced platelet aggregation at chronic brain ischemia. *Journal of Education, Health and Sport*. 2015;5(6):11-18. ISSN 2391-8306. DOI [10.5281/zenodo.18191](https://doi.org/10.5281/zenodo.18191)
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/2015%3B5%286%29%3A11-18>
<https://pbn.nauka.gov.pl/works/562793>
<http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.18191>
Formerly Journal of Health Sciences. ISSN 1429-9623 / 2300-665X. Archives 2011 – 2014
<http://journal.rsw.edu.pl/index.php/JHS/issue/archive>

Deklaracja.

Specyfika i zawartość merytoryczna czasopisma nie ulega zmianie.
Zgodnie z informacją MNiSW z dnia 2 czerwca 2014 r., że w roku 2014 nie będzie przeprowadzana ocena czasopism naukowych; czasopismo o zmienionym tytule otrzymuje tyle samo punktów co na wykazie czasopism naukowych z dnia 31 grudnia 2014 r.

The journal has had 5 points in Ministry of Science and Higher Education of Poland parametric evaluation. Part B item 1089. (31.12.2014).

© The Author (s) 2015;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland and Radom University in Radom, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.
Received: 20.05.2015. Revised 28.05.2015. Accepted: 31.05.2015.

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА НА АДФ-ИНДУЦИРОВАННУЮ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА EFFECT OF EPINEPHRINE ON ADP-INDUCED PLATELET AGGREGATION AT CHRONIC BRAIN ISCHEMIA

Э. Ф. Баринoв, Севиндж Мамедалиева, А. О. Балыкина, Т. А. Твердохлеб
E. F. Barinov, Sevynzh Mamedaliyeva, A. O. Balykina, T. A. Tverdokhleб

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького
Donetsk National Medical University

Abstract

Determination of the mechanisms of platelets adaptation against the action of exogenous signals will expand tactics of pharmacological correction aimed at thrombogenesis prevention. The purpose of the studies to establish in vitro modulating effect of epinephrine on platelet aggregation induced by ADP. We used platelet-rich plasma, which was isolated from the blood of 55 patients with a diagnosis of chronic cerebral ischemia (CCI) of stage 1-2. Study was carried out on the aggregometer Chrono - Log (USA). Modulatory role of subthreshold epinephrine doses in platelet activation was analyzed by its addition to a suspension of platelets stimulated by ADP (EC₅₀). It is established that: (a) there are differences in the response of platelets to epinephrine at CCI; (b) epinephrine activity effects on functional response of platelets stimulated by ADP; (c) as threshold epinephrine dose can modulate ADP-induced platelet aggregation.

Key words: chronic cerebral ischemia, aggregation of the platelets, epinephrine.

Реферат

Выяснение механизмов адаптации тромбоцитов при действии экзогенных сигналов позволит расширить тактику фармакологической коррекции направленной на профилактику тромбоза. Цель исследования - установить in vitro модулирующее влияние адреналина на агрегацию тромбоцитов индуцированную АДФ. Использована обогащенная тромбоцитами плазма, которую выделяли из крови 55 пациентов с диагнозом хронической ишемии головного мозга 1-2-й стадии. Исследование агрегации тромбоцитов проведено на агрегометре фирмы Chrono - Log (США). Модулирующую роль субпороговой дозы адреналина в активации тромбоцитов анализировали при ее добавлении в суспензию тромбоцитов стимулированных АДФ (EC₅₀). Установлено, что: (а) у пациентов с хронической ишемией мозга имеются различия реакции тромбоцитов на адреналин; (б) адренореактивность влияет на функциональный ответ тромбоцитов при их стимуляции АДФ; (в) субпороговая доза адреналина может модулировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

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

Одной из актуальных проблем патофизиологии гемостаза является регуляция функциональной активности тромбоцитов при церебро-васкулярных заболеваниях [3, 6]. Следует признать недостаточность знаний, касающихся взаимодействия сигналов активирующих функцию тромбоцитов. В физиологических условиях катехоламины активируют тромбоциты циркулирующей крови, при этом секреция АДФ из плотных гранул усиливает стимулирующий сигнал [1]. Может ли адреналин модулировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, если имеется сопряженность α_2 -адренорецепторов и P2Y₁₂ пуриновых рецепторов с Gi- белком сигнальных путей, реализующих повышение функциональной активности тромбоцитов [2]? Применительно к хронической ишемии мозга (ХИМ) приведенный причинно-следственный каскад мог бы объяснить «внезапное» формирование макроагрегатов в микроциркуляторном русле головного мозга с возникновением нейродефицита или образование тромба с окклюзией мозговой артерии. Для проверки гипотезы необходимо установить имеются ли различия адренореактивности тромбоцитов при ХИМ, влияет ли адренореактивность на функциональный ответ тромбоцитов при стимуляции АДФ, может ли субпороговая доза Адреналина модулировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов?

Цель исследования - установить *in vitro* модулирующее влияние адреналина на агрегацию тромбоцитов индуцированную АДФ, что позволит приблизиться к пониманию причин повышения функциональной активности тромбоцитов при хронической ишемии головного мозга.

Материал и методы

Обследовано 87 пациентов с клиническими и нейро-визуализационными признаками цереброваскулярных заболеваний. В данное исследование включены 55 пациентов с установленным диагнозом хронической ишемии головного мозга 1-2-й стадии, из них – 25 мужчин и 30 женщин, в возрасте от 40 до 76 лет (средний возраст — $63,2 \pm 7,9$ года). Анализ функционального состояния тромбоцитов проводили *in vitro* на момент госпитализации пациентов до начала консервативной терапии. В исследование не включались пациенты, которые принимали антиагрегантные препараты и блокаторы α -адренорецепторов менее чем за 1 неделю до обследования. Из периферической крови путем центрифугирования выделяли обогащенную тромбоцитами плазму. В пробе содержание тромбоцитов в 1 мкл составляло $200\ 000 \pm 20\ 000$. Для стимуляции тромбоцитов использовали адреналин и АДФ (Sigma, США) в эффективной концентрации (EC_{50}) – 5 мкМ, вызывающей у здоровых лиц (10 доноров) агрегацию тромбоцитов (АТц) на уровне $50 \pm 5\%$. Параллельно установили и субпороговую дозу Адреналина – 0,5 мкМ, которая вызывала агрегацию тромбоцитов у

здоровых лиц на уровне $9,0 \pm 1,2\%$. Модулирующую роль субпороговой дозы адреналина в активации тромбоцитов анализировали при ее добавлении в суспензию тромбоцитов стимулированных АДФ (EC_{50}). Исследование АТц проводили на агрегометре фирмы Chrono - Log (США). Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета Med Stat.

Результаты и обсуждение

Первоначально следует ответить на ключевой вопрос – отличается ли агрегация тромбоцитов у пациентов с ХИМ при стимуляции Адреналином и АДФ?

Установлено, что Адреналин в концентрации (EC_{50}) вызывал агрегацию тромбоцитов на уровне $21,0 \pm 4,2\%$, а АДФ (EC_{50}) – $57,0 \pm 4,3\%$ (различия на уровне статистически значимой разницы- $p < 0,001$). Наличие связи между индукцией агрегации тромбоцитов обоими агонистами (показатель ранговой корреляции Спирмена $R=0.795$; $p < 0,01$), вероятно, объясняется общим механизмом реализации агрегации, т.е. секрецией эндогенного АДФ из плотных гранул. Для дальнейшего анализа следует ответить на вопрос – *влияет ли адренореактивность на АДФ-индуцированную АТц?*

Результаты исследования распределили на две группы: в 1-ю включили все случаи, когда ответ тромбоцитов на адреналин (EC_{50}) был 50% и выше, а во 2-ю – ниже 50%. Далее в каждой из этих групп исследовали АДФ-индуцированную АТц (EC_{50}) и определили количество случаев, когда агрегация была больше и меньше 50%. Такой подход позволяет сопоставить альтернативную реакцию тромбоцитов на АДФ в каждой из групп. Оказалось, что в 1-й группе (15 случаев) когда Адреналин-индуцированная АТц (EC_{50}) была выше 50% – во всех исследованиях (100%) ответ тромбоцитов на АДФ (EC_{50}) также был выше 50%. Следовательно, при гиперадренореактивности Тц имел место только высокий функциональный ответ тромбоцитов на АДФ. Следует отметить, что АДФ-индуцированная АТц была выше АТц-индуцированной адреналином (соответственно $69,0 \pm 5,0\%$ и $58,0 \pm 4,7\%$; $p=0,02$). Данная закономерность прослеживается и при квартильном анализе вариационного ряда. Так, в I-м и III-м квартилях АДФ-индуцированная АТц (соответственно – 62% и 79%) была выше, чем при стимуляции тромбоцитов адреналином (соответственно в I-м квартиле – 55% и в III-м – 65%).

Во 2-й группе (40 случаев) – если адреналин-индуцированная АТц была ниже 50%, то ответ тромбоцитов на АДФ превышающий 50% – имел место в 16 случаях (40%, подгруппа А), тогда как в 24 случаях (60%, подгруппа Б) – был ниже 50% ($D=40,0\%$; интервальная оценка: $25,1\% \leq D \leq 55,9\%$ на уровне значимости $p=0,05$). Что касается 16 случаев с низкой адреналин-индуцированной АТц и высокой реакцией на АДФ, то дополнительно проведенное исследование кривой доза-ответ (5 случаев) подтвердило

десенситизацию $\alpha 2$ -адренорецепторов – адреналин в концентрации (10 мкМ- EC₁₀₀) повышал АТц с 4,6±3,4% до 43,0± 4,5% (p<0,001).

Обращает на себя внимание различие (p <0,05) гипоадренореактивности тромбоцитов в подгруппах А и Б (табл. 1). Причем в подгруппе А для I квартиля характерна АТц на уровне 13% и для III –27,5%, тогда как для подгруппы Б соответственно 0% и 17,5%. Складывается впечатление о наличии разных статистически значимых диапазонов гипоадренореактивности тромбоцитов, и в этой связи интересно проанализировать АДФ-индуцированную АТц. В подгруппе А такая реакция Тц была примерно в 3 раза выше, чем в подгруппе Б. Для сравнения: подгруппа А в I квартиле АТц в ответ на стимуляцию АДФ регистрировалась на уровне 57% и в III – 71,5%, в подгруппе Б соответственно 0% и 17,5%. Таким образом, при гипоадренореактивности возможен высокий ответ тромбоцитов на АДФ. Означает ли это, что существует некий «критический» диапазон чувствительности $\alpha 2$ -адренорецепторов при котором возможно повышение реактивности Тц на АДФ?

Таблица 1

Параметры индуцированной агрегации при гипоадренореактивности тромбоцитов

Агонист	Медиана	Минимум	Максим	Ошибка медианы	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
Подгруппа А						
Адреналин (5 мкМ)	19*	4	45	4,118	13	22
АДФ (5 мкМ)	62***	50	100	3,961	57	67
Подгруппа Б						
Адреналин (5 мкМ)	5	0	40	3,745	2	14
АДФ (5 мкМ)	21,5	0	45	3,835	13	38

Примечание: * статистически значимое различие АТц на уровне p<0,05; и *** на уровне p<0,001 по сравнению с подгруппой Б.

Ответ на этот вопрос можно получить при добавлении субпороговой дозы Адреналина (0,1 мкМ) в суспензию тромбоцитов стимулированных АДФ (EC₅₀). Данный методический прием позволяет анализировать низкий диапазон чувствительности рецепторов, поскольку превышает физиологическую концентрацию агониста в крови. В тоже время, использование Адреналина позволяет отдифференцировать нарушения Gi- и Gq участков сигнальных путей активирующих тромбоциты.

Из 1-й группы в исследование включены 7 случаев с гиперадренореактивностью тромбоцитов ($57,7 \pm 2,0\%$; 95% левый ДИ 52,8%). При этом АДФ-индуцированная АТц регистрировалась на уровне $64,6 \pm 3,2\%$ (95% левый ДИ 56,7%). Различия средних значений АТц для двух агонистов не является статистически значимым. Субпороговая доза адреналина повышала АДФ-индуцированную АТц до $66,9 \pm 2,9\%$ ($p < 0,05$). Коэффициент прироста АДФ-индуцированной АТц составил – 1,035. Сам по себе факт усиления ответа тромбоцитов на АДФ при высокой чувствительности α_2 -адренорецепторов представляется важным, поскольку подтверждает возможность прогрессирования гиперреактивности тромбоцитов при повышении концентрации адреналина в циркулирующей крови.

Во 2-й группе, как уже отмечалось, представлены случаи гипoadренореактивности тромбоцитов у пациентов с ХИМ. В исследования с использованием субпороговой дозы Адреналина включены 20 случаев (табл. 2). Величина АТц при стимуляции адреналином в подгруппах А и Б статистически значимо не различалась; а при спектральном анализе частоты встречаемости признака установлено, что в 75% случаев АТц находилась в диапазоне от 20 до 30%. Если в контрольной группе субпороговая доза адреналина вызывала АТц на уровне $9,0 \pm 1,2\%$, то в подгруппах А и Б пациентов с ХИМ аналогичная доза агониста воспроизводила значительно меньший ответ ($p < 0,01$). Полученные результаты подтверждают низкую чувствительность α_2 -адренорецепторов во 2-й группе.

В подгруппе А – АДФ-индуцированная АТц была 1,7 раза выше, чем в подгруппе Б ($p < 0,001$). Анализ доверительных интервалов АТц (95% левый и правый ДИ) подтверждает различный функциональный статус АТц-индуцированной АДФ – в подгруппе А имеет место гиперреактивность тромбоцитов (диапазон АТц 50 - 62%) и в подгруппе Б – гипореактивность тромбоцитов (диапазон АТц 15-40%). В подгруппе А субпороговая доза адреналина вызывала повышение исходной АДФ-индуцированной АТ, коэффициент прироста АТц составил –1,131 ($p < 0,001$), тогда как в подгруппе Б – такого эффекта не наблюдалось (коэффициент прироста АТц – 1,087; $p > 0,1$). Обращает на себя внимание, что результирующая величина АТц отражает суммацию эффектов АДФ (EC_{50}) и адреналина (EC_{10}).

Влияние субпороговой дозы Адреналина на АДФ-индуцированную агрегацию при
гипоадренореактивности тромбоцитов

Условия инкубации тромбоцитов	Подгруппа А (n=8)	Подгруппа Б (n=12)
Адреналин (ЕС 50, 5 мкМ)	19,0±4,4 (95% ДИ 8,5-29,5%)	12,5± 6,5 (95% ДИ 0-40%)
АДФ (ЕС50, 5мкМ)	57,25±1,72*** (95% ДИ 53,2-61,3%)	34,5±5,15 (95% ДИ 13-40%)
Адреналин (0,1мкМ)	4,0±1,1 (95% 0-5%)	2,0±0,5 (95% 0-3%)
АДФ (5мкМ) + Адреналин (0,5мкМ)	64,75± 1,95*** (95% ДИ 60,13-69,37%)	37,5±6,0 (95% ДИ 18-46%)

Примечание: *** статистически значимое различие АТц индуцированной на уровне $p < 0,001$ по сравнению с подгруппой Б.

Полученные результаты исследований *in vitro* позволяют прийти к нескольким интересным выводам. Во-первых, при ХИМ повышение функциональной активности тромбоцитов возможно не только при гипер- но и гипоадренореактивности. Если в случае гиперадренореактивности тромбоцитов полученный результат представляется закономерным, то усиление эффекта АТц при действии АДФ на фоне низкой чувствительности α_2 -адренорецепторов является неожиданным и побуждает к переосмыслению эффективности применения адреноблокаторов. Поскольку в подгруппе А эффект субпороговой концентрации адреналина проявлялся, а в подгруппе Б – нет, то вероятно, существует некий «критический» диапазон чувствительности α_2 -адренорецепторов при котором возможна суммация или синергизм воздействия одного или нескольких агонистов при повышении концентрации адреналина в крови. В пользу данной концепции свидетельствует факт, что в 75% случаев, когда субпороговая концентрация адреналина воспроизводила эффект суммации с АДФ, то исходная адренореактивность находилась в диапазоне от 20 до 30%. Следуя этой логике, можно предположить, что снижение эффекта назначаемого адреноблокатора (фармакокинетика, феномен ускользания рецепторов от действия препарата и др.) будет создавать условия для повышения функции тромбоцитов. Во-вторых, определяющим фактором усиления АТц является исходный уровень АДФ- индуцированной АТц (ЕС₅₀). В 1-й группе и подгруппе А - 2-й группы, имела место гиперреактивность тромбоцитов (АТц >50%) в тесте с ЕС₅₀ АДФ. Если АДФ- индуцированная АТц была менее 40% и менее (в подгруппе Б), то субпороговая концентрация адреналина не воспроизводила суммацию эффектов агонистов. Возникает резонный вопрос – почему сила ответа

тромбоцитов на АДФ определяет возможность дополнительной стимуляции тромбоцитов адреналином? Такой феномен возможен только в том случае, если АДФ-индуцированная АТц отражает некие функциональные свойства тромбоцитов, которые обеспечивают модуляцию экзогенного сигнала. В сущности, речь может идти об... адаптационных механизмах тромбоцита. Установлено, что экзогенный АДФ включает экзоцитоз эндогенного АДФ из плотных гранул (вторичная волна агрегации), который может модулировать чувствительность пуриновых рецепторов [5]. Поэтому, регистрируемая величина АДФ-индуцированной АТц отражает чувствительность пуриновых рецепторов, и, вероятно, является результатом суммации эффектов экзогенного и секретируемого АДФ. С нашей точки зрения, секреция эндогенного АДФ из гранул и модуляция чувствительности пуриновых рецепторов укладываются в картину адаптационных механизмов тромбоцитов. В этом случае понятно, что АДФ-индуцированная АТц косвенно отражает силу адаптационной реакции, предопределяющей возможность суммации эффектов агонистов, т.ч. Адреналина. Что касается сопряженности стимуляции Gi-белок ассоциированного участка сигнальных путей при совместном действии на тромбоцит АДФ и Адреналина, то это типичный downstream [4]. Очевидно, что реализация этого механизма (в сущности, также адаптационного) зависит от чувствительности пуриновых рецепторов и секреции АДФ.

Выяснение механизмов адаптации тромбоцитов при действии экзогенных сигналов позволит расширить тактику фармакологической коррекции направленной на профилактику тромбогенеза.

Литература

1. Battinelli E. M., Markens B. A., Italiano J. E. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis *Blood*. 2011; 118(5): 1359–1369.
2. Bourdon D. M., Mahanty S. K., Jacobson K. A., Boyer J. L., Harden T. K. (N)-methanocarba-2MeSADP (MRS2365) is a subtype-specific agonist that induces rapid desensitization of the P2Y₁ receptor of human platelets/ *J Thromb Haemost*. 2006; 4(4): 861–868.
3. Fisher M., Vasilevko V., Cribbs D. H. Mixed Cerebrovascular Disease and the Future of Stroke Prevention. *Transl Stroke Res*. 2012; 3(1): 39–51.
4. Garcia A., Shankar H., Murugappan S., Kim S., Kunapuli S/ P. Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets *Biochem J*. 2007; 404 (Pt2): 299–308.

5. Papen M., Gambaryan S., Schütz C., Geiger J. Determination of ATP and ADP Secretion from Human and Mouse Platelets by an HPLC Assay. *Transfus Med Hemother.* 2013; 40(2): 109–116.

6. Sotnikov I., Veremeyko T., Sarah C. et.al. Platelets Recognize Brain-Specific Glycolipid Structures, Respond to Neurovascular Damage and Promote Neuroinflammation. *PLoS One.* 2013; 8(3): e58979.