Особенности состояния гемостаза и активность ферментов в тромбоцитах у пациентов с разной чувствительностью к ацетилсалициловой кислоте при остром коронарном синдроме

Игорь Юрьевич Гринштейн[1]*, Андрей Анатольевич Савченко[1,2], Юрий Исаевич Гринштейн[1], Марина Михайловна Петрова[1]

[1] Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Россия, 660022, Красноярск, пр. П. Железняка, 1А

[2] Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера Россия, 660022, Красноярск, пр. П. Железняка, 3Г

Цель. Изучить особенности состояния гемостаза и активности ферментов тромбоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС), чувствительных и резистентных к ацетилсалициловой кислоте (АСК).

Материал и методы. Обследованы 53 пациента (25 мужчин и 28 женщин) с ОКС в первые 24 часа и через 10 суток. Контрольная группа – 50 здоровых добровольцев. Пациенты до начала лечения тестированы на чувствительность и резистентность к АСК. Изучались показатели сосудисто-тромбоцитарного и плазменного гемостаза, а также определена активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в тромбоцитах крови биолюминесцентным методом в первые сутки ОКС до начала терапии дезагрегантами и на 10 сутки.

Результаты. У АСК-резистентных пациентов в 1-е и 10-е сутки от развития ОКС установлено повышение спонтанной [1,72 (1,28-2,72) и 1,60 (1,49-2,78) усл. ед., соответственно] и АДФ-индуцированной [24,4% (21,1-29,8) и 19,2% (16,1-22,9), соответственно] агрегации тромбоцитов, активности фактора Виллебранда [159,0% (108,0-190,0) и 155,0% (149,0-185,1), соответственно]. Также у АСК-резистентных пациентов с ОКС выявлена очень низкая активность пентозофосфатного цикла и аэробная активность лактатдегидрогеназы, а также более высокая, чем у АСК-чувствительных пациентов интенсивность аэробного дыхания и уровень НАДФ-зависимого субстратного обмена между циклом трикарбоновых кислот и реакциями аминокислотного обмена.

Заключение. Несмотря на применение комбинированной антитромбоцитарной терапии АСК и клопидогрелом риск тромбообразования у пациентов с ОКС, резистентных к АСК, сохраняется. Метаболические изменения в тромбоцитах отражаются на их агрегационной активности и вызывают у пациентов с ОКС недостаточный ответ на дезагреганты.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, чувствительность, резистентность, ацетилсалициловая кислота, тромбоциты, дегидрогеназы.

Для цитирования: Гринштейн И.Ю., Савченко А.А., Гринштейн Ю.И., Петрова М.М. Особенности состояния гемостаза и активность ферментов в тромбоцитах у пациентов с разной чувствительностью к ацетилсалициловой кислоте при остром коронарном синдроме. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии* 2016;12(5):509-516. DOI: 10.20996/1819-6446-2016-12-5-509-516

Features of the Hemostasis and Platelets Enzyme Activity in Patients with Different Sensitivity to Acetylsalicylic Acid by the Acute Coronary Syndrome

Igor Yu. Grinshtein[1], Andrey A. Savchenko[1,2], Yuri I. Grinshtein[1], Marina M. Petrova[1]

[1]Krasnoyarsk State Medical University named after V.F. Voyno-Yasenetsky. Partizana Zheleznyaka ul. 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia

[2]Scientific Research Institute of Medical Problems of the North. Partizana Zheleznyaka ul. 3G, Krasnoyarsk, 660022 Russia

Aim. To study the features of the state of hemostasis and platelet enzymes activity in acetylsalicylic acid (ASA) sensitive and resistant patients with acute coronary syndrome (ACS).

Material and methods. The study included 53 patients (25 men and 28 women) with ACS during the first 24 hours and after 10 days. The control group included 50 healthy volunteers. Before treatment the patients were tested on the sensitivity and resistance to ASA. The indicators of vascular-platelet and plasma hemostasis were evaluated as well as the NAD(P)-dependent dehydrogenases activity in platelets was assessed by the bioluminescent method in the first day of ACS before antiplatelet therapy and on day 10.

Results. Increase in spontaneous [1.72 U (1.28-2.72 U) and 1.60 U (1.49-2.78 U), respectively] and ADP-induced [24.4% (21.1-29.8%) and 19.2% (16.1-22.9%), respectively] platelet aggregation, von Willebrand factor activity [159.0% (108.0-190.0%) and 155.0% (149.0-185.1%), respectively] was found in ASA-resistant patients with ACS in 1 and 10 day. Besides the ASA-resistant patients with ACS had very low pentose phosphate cycle and lactate dehydrogenase aerobic activity. They also demonstrated, compared with ASA-sensitive patients, higher intensity of aerobic respiration and the level of NADP-dependent substrate exchange between the tricarboxylic acid cycle and reactions of amino acid metabolism.

Conclusion. Despite the dual antiplatelet therapy with ASA and clopidogrel, risk of thrombotic events is saved in ASA resistant patients with ACS. The metabolic changes in platelet influence their aggregation activity and cause an inadequate response to the antiplatelet therapy in ACS patients.

Keywords: acute coronary syndrome, sensitivity, resistance, acetylsalicylic acid, platelets, dehydrogenases.

For citation: Grinshtein I.Yu., Savchenko A.A., Grinshtein Y.I., Petrova M.M. Features of the Hemostasis and Platelets Enzyme Activity in Patients with Different Sensitivity to Acetylsalicylic Acid by the Acute Coronary Syndrome. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2016;12(5):509-516. (In Russ). DOI: 10.20996/1819-6446-2016-12-5-509-516

*Corresponding author (Автор, ответственный за переписку): grinstein.yi@gmail.com

Received / Поступила: 05.07.2016
Accepted / Принята в печать: 03.08.2016

Хорошо известно, что у части пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) не достигается адекватное подавление агрегации тромбоцитов на дезагрегантах, что может способствовать развитию коронарного атеротромбоза. При оптической агрегатометрии частота резистентности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте (АСК) варьирует от 9 до 22% [1,2]. До настоящего времени непонятна роль влияния метаболического статуса тромбоцитов на их способность к агрегации, в том числе, при лечении антитромбоцитарными препаратами. Поэтому изучение метаболических процессов в тромбоцитах и особенностей гемостаза у пациентов с ОКС, чувствительных и резистентных к АСК, представляет научный и прикладной интерес.

Целью исследования явилось изучение особенностей состояния гемостаза и активности ферментов тромбоцитов у чувствительных и резистентных к ацетилсалициловой кислоте (АСК) пациентов с ОКС.

Материал и методы

В открытое проспективное сравнительное исследование включены 53 пациента с ОКС (25 мужчин и 28 женщин). Критерии включения: ОКС у пациентов обоего пола в возрасте от 35 до 75 лет в первые 24 часа от возникновения симптомов; отсутствие приема до госпитализации антиагрегантов и антикоагулянтов; подписанное информированное согласие. Диагноз ОКС, а в дальнейшем и острого инфаркта миокарда с – или без элевации сегмента ST и положительным тестом на тропонин-Т устанавливался в соответствии с критериями Европейского общества кардиологов [3].

Критерии исключения: сахарный диабет; хроническая болезнь почек 3-5 стадий; острое нарушение мозгового кровообращения в анамнезе; сердечная недостаточность III стадии; кардиогенный шок при поступлении в стационар. Всем пациентам была проведена реваскуляризация чрескожным коронарным вмешательством (ЧКВ) с применением болюсной дозы клопидогрела 600 мг. Эноксапарин использовался только для сопровождения первичного ЧКВ. В дальнейшем пациенты получали двойную антитромбоцитарную терапию (АСК 75 мг/сут+клопидогрел 75 мг/сут), β-адреноблокаторы, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, статины.

Контрольная группа – 50 относительно здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту (27 мужчин и 23 женщины).

Пациенты до начала лечения были разделены на группы чувствительных к АСК (чАСК) и резистентных к АСК (рАСК). Оценка резистентности/чувствительности к АСК осуществлялась in vitro путем последовательного инкубирования обогащенной тромбоцитами плазмы с 5 мкМ аденозиндифосфата (АДФ) и 3,36 мМ АСК и определения уровня агрегации тромбоцитов после каждого инкубирования. Сущность определения заключалась в том, что у больных до начала терапии АСК исследовали АДФ-индуцированную и АСК-зависимую агрегации тромбоцитов и по их разнице определяли величину коэффициента ингибирования агрегации (КИА). Величина КИА<24% свидетельствовала о резистентности к АСК, а при КИА ⩾24% – о чувствительности к АСК [4].

Изучались показатели сосудисто-тромбоцитарного гемостаза: агрегация тромбоцитов, спонтанная и индуцированная, с применением индукторов АДФ в дозах 0,1 мкМ и 5 мкМ и адреналина в дозе 10 мкг/мл на агрегометре «LA230-2 БИОЛА» (Россия). Определялась активность фактора Виллебранда (ФВ) в плазме крови. Исследовались следующие показатели плазменного гемостаза: содержание фибриногена, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), уровень Д-димера, тромбиновое время (ТВ), уровень растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), антитромбина III (АТ III) на анализаторе «STA-COMPACT» (Швейцария).

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в тромбоцитах крови определяли с помощью биолюминесцентного метода [5]. Биолюминесцентный анализ проводили с использованием биферментного препарата, выделенного из Photobacterium leognathi (получен в Институте биофизики СО РАН, Красноярск), и био-хемилюминесцентного анализатора БХЛ-3607 (СКТБ «Наука», Красноярск). Определялась активность следующих ферментов тромбоцитов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), НАД- и НАДН-зависимой активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимая активность малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ), НАД- и НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДФГДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ) и глутатионредуктазы (ГР). Активность оксидоредуктаз выражали в ферментативных единицах (Е) на 1 мг белка (1 Е=1 мкмоль/мин [6]). Содержание белка определяли по методу Брэдфорда.

Исследование системы гемостаза и функциональной активности нейтрофилов проводилось в первые 24 часа ОКС и в динамике на 10-е сут.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 процентилей (C_{25} и C_{75}). Значимость различий между показателями независимых выборок (сравнение с показателями контрольной группы) оценивали по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни. Значимость различий между показателями зависимых выборок (сравнение в каждой группе больных между

Table 1. Indicators of vascular-platelet hemostasis in ASA-sensitive and ASA-resistant patients with acute coronary syndrome during the study

Таблица 1. Показатели сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у чАСК и рАСК пациентов с ОКС за время исследования

Показатели	Контроль (n=50)	чАСК (n=34)		рАСК (n=19)	
		1-е сут	10-е сут	1-е сут	10-е сут
Тромбоциты, 10^9/л	215,0 (187,0-242,0)	216,0 (200,0 – 240,0)	250,0 (210,5-325,5)*	184,5 (180,0-207,5)†‡‡	180,0 (146-230,0)‡
Спонтанная АТ, усл. ед.	1,33 (1,17-1,64)	1,50 (1,22-1,95)	1,625 (1,32-2,12)	1,72 (1,28-2,72)	1,60 (1,49-2,78)†
АТ с АДФ 0,1 мкМ, усл. ед.	1,72 (1,48-2,26)	2,06 (1,72-3,02)	2,07 (1,41-2,63)	3,21 (1,50-3,81)†	2,27 (1,92-3,53)†
АТ с АДФ 5 мкМ, %	38,3 (25,0-48,7)	32,6 (26,2-35,1)	23,7 (19,5-28,6)*†	24,4 (21,1-29,8)†	19,2 (16,1-22,9)††
АТ с адреналином, 10 мкг/мл, %	36,9 (21,2-47,9)	13,9 (9,2-22,9)†	19,55 (10,9-26,3)††	12,5 (9,1-25,5)†	13,8 (8,3-25,6)††
Фактор Виллебранда, %	112,0 (98,0-128,0)	149,0 (89,0-167,0)	161,5 (121,6-177,0)††	159,0 (108,0-190,0)†††	155,0 (149,0-185,1)†††

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 – по сравнению с исходным значением в той же группе; †p<0,05; ††p<0,01; †††p<0,001 – по сравнению с контролем; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 – по сравнению с аналогичным показателем в противоположной группе

чАСК – чувствительные к ацетилсалициловой кислоте пациенты; рАСК – резистентные к ацетилсалициловой кислоте пациенты; АТ – агрегация тромбоцитов

Данные представлены в виде Me (25%-75%)

1-ми и 10-ми сут обследования) оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона. Статистический анализ осуществляли при помощи статистического пакета Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты

При исследовании состояния сосудисто-тромбоцитарного гемостаза обнаружено, что у рАСК пациентов в 1-е сут ОКС в периферической крови снижено содержание тромбоцитов как относительно контроля, так и в сравнении с чАСК пациентами (табл. 1). При этом у чАСК-пациентов с ОКС на 10-е сут лечения количество тромбоцитов в крови повышается относительно исходного уровня, тогда как у рАСК пациентов – не изменяется. Уровень спонтанной агрегации тромбоцитов у рАСК пациентов на терапии АСК и клопидогрелом сохраняется выше контрольных значений. Только у рАСК пациентов с ОКС в 1-е и 10-е сут лечения выявляется увеличение уровня АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов (при дозе АДФ в 0,1 мкМ) относительно контроля. На 10-е сут лечения у чАСК пациентов снижается уровень АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов (при дозе АДФ в 5 мкМ) относительно исходного и контрольного диапазона, а также повышается активность фактора Виллебранда при сравнении с контролем. У рАСК пациентов на 1-е и10-е сут уровень АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов (при дозе АДФ в 5 мкМ) снижен относительно контроля, а также повышена активность фактора Виллебранда. Независимо от чувствительности к АСК у пациентов с ОКС в 1-е и 10-е сут лечения снижен уровень адреналин-зависимой агрегации тромбоцитов.

Table 2. Indicators of coagulation hemostasis in ASA-sensitive and ASA-resistant patients with acute coronary syndrome during the study

Таблица 2. Показатели коагуляционного гемостаза у чАСК и рАСК пациентов с ОКС за время исследования

Показатели	Контроль (n=50)	чАСК (n=34)		рАСК (n=19)	
		1-е сут	10-е сут	1-е сут	10-е сут
Фибриноген, г/л	2,90 (2,63-3,39)	3,41 (2,58-3,97)	4,27 (3,07-5,05)†††	2,89 (2,68-5,07)	3,76 (2,91-5,35)*†
РФМК, мг %	7,50 (5,50-9,50)	44,00 (17,00-112,50)†††	46,00 (28,00-184,00)†††	24,00 (15,00-111,00)†††	45,50 (15,00-169,00)**†††
Антитромбин III, %	97,5 (89,0-103,0)	94,5 (90,0-104,0)	104,0 (98,0-117,0)*†	101,0 (73,0-111,0)	100,0 (91,0-113,0)
ТВ, сек	15,70 (14,70-16,80)	20,60 (17,50-27,50)†††	17,35 (16,80-20,11)†††	21,20 (19,40-25,20)†††	17,40 (16,40-19,70)*†
АЧТВ, сек	35,10 (32,80-36,50)	33,45 (30,20-37,30)	30,10 (27,60-36,25)*††	36,00 (34,20-41,80)	29,60 (26,50-31,90)*†††
Д-димер, нг/мл	220,0 (168,0-220,0)	22,0 (14,0-79,0)†††	25,0 (16,0-124,0)††	68,50 (12,50-223,00)†	101,0 (24,0-222,0)†‡

*p<0,05; **p<0,01 – по сравнению с исходным значением в той же группе; †p<0,05; ††p<0,01; †††p<0,001 – по сравнению с контролем; ‡p<0,05 – по сравнению с аналогичным показателем в противоположной группе

чАСК – чувствительные к ацетилсалициловой кислоте пациенты; рАСК – резистентные к ацетилсалициловой кислоте пациенты; РФМК – растворимые фибринмономерные комплексы; ТВ – тромбиновое время; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время.

Данные представлены в виде Me (25%-75%).

Table 3. Activity of NADPH-dependent dehydrogenases (mcU) in platelets from ASA-sensitive and ASA-resistant patients with acute coronary syndrome during the study

Таблица 3. Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) в тромбоцитах у чАСК и рАСК пациентов с ОКС за время исследования

Показатели	Контроль (n=50)	чАСК (n=34)		рАСК (n=19)	
		1-е сут	10-е сут	1-е сут	10-е сут
Г6ФДГ	58,32 (14,37-114,03)	13,12 (1,21-40,38)†	27,90 (0,67-43,01)†	0,44 (0,02-1,96)†††‡	6,03 (0,54-11,00)*††
НАДФ МДГ	2,49 (0,58-6,35)	4,31 (0,06-16,22)	0,04 (0,01-1,28)*††	0,08 (0,01-0,37)†††‡‡	0,76 (0,11-2,86)*†‡
НАДФ ГДГ	1,21 (0,23-2,61)	0,07 (0,01-0,29)†	0,05 (0,01-2,49)†	0,45 (0,27-0,76)†‡	0,61 (0,19-3,78)†
НАДФ ИЦДГ	36,36 (13,68-95,66)	30,52 (0,86-98,17)	17,49 (3,05-39,41)	16,48 (3,41-55,28)	19,68 (1,20-55,28)
Глутатионредуктаза	3,90 (1,34-10,07)	14,87 (0,81-21,90)	9,65 (1,95-27,41)	15,53 (1,26-26,40)	8,58 (1,12-21,83)
НАДФН-ГДГ	62,53 (29,72-79,86)	1,17 (0,01-2,61)†	13,67 (3,00-104,61)*	55,18 (9,48-164,31)‡	16,91 (8,88-29,43)*†

*p<0,05 – по сравнению с исходным значением в той же группе; †p<0,05; ††p<0,01; †††p<0,001 – по сравнению с контролем; ‡p<0,05; ‡‡p<0,01 – по сравнению с аналогичным показателем в противоположной группе

чАСК – чувствительные к ацетилсалициловой кислоте пациенты; рАСК – резистентные к ацетилсалициловой кислоте пациенты; Г6ФДГ-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; НАДФ – никотинамиддинуклеотидфосфат; МДГ-малатдегидрогеназа; ГДГ-глутаматдегидрогеназа; ИЦДГ-изоцитратдегидрогеназа

Данные представлены в виде Me (25%-75%)

Исследование состояния коагуляционного гемостаза показало, что на 10-е сут лечения у чАСК и рАСК пациентов повышается содержание фибриногена в плазме крови и снижается уровень АЧТВ (табл. 2). Только у чАСК пациентов на 10-е сут снижается содержания АТ III относительно исходных и контрольных значений. Независимо от чувствительности к АСК у пациентов с ОКС на 1 и 10 сут повышен уровень РФМК, удлиняется тромбиновое время и снижено содержание Д-димера. Однако у рАСК пациентов на 10-е сут наблюдается дополнительное повышение уровня РФМК и сокращается ТВ относительно исходного диапазона, а также выявляется снижение количества Д-димера относительно значений, выявленных в этот же период у чАСК пациентов.

Исследование активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ позволило установить, что активность Г6ФДГ в тромбоцитах больных ОКС снижена относительно контроля, а также на 1-е и 10-е сут (табл. 3). Однако у рАСК пациентов в 1-е сут ОКС внутриклеточная активность данного фермента практически в 30 раз ниже, чем у чАСК пациентов. При этом активность фер-

Table 4. The activity of NAD-dependent dehydrogenases (mcU) in platelets from ASA-sensitive and ASA-resistant patients with acute coronary syndrome during the study

Таблица 4. Активность НАД-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) в тромбоцитах у чАСК и рАСК пациентов с ОКС за время исследования

Показатели	Контроль (n=50)	чАСК (n=34)		рАСК (n=19)	
		1-е сут	10-е сут	1-е сут	10-е сут
ГЗФДГ	45,93 (30,53-115,86)	14,80 (6,92-30,87)††	22,94 (4,05-37,75)†	16,27 (8,45-28,11)†	21,06 (11,64-31,67)†
ЛДГ	2354,59 (956,66-3276,58)	532,84 (17,70-2129,03)†	24,64 (10,66-1012,07)*†††	171,84 (29,68-1020,57)†††‡	576,52 (28,16-1020,57)†
МДГ	862,92 (333,18- 2097,39)	26,14 (3,16-203,33)†††	196,75 (28,09-305,69)*†	199,48 (11,55-720,50)†‡	64,13 (4,09-360,61)*†
НАД ГДГ	642,77 (143,48- 1184,95)	464,44 (16,60-804,75)	366,75 (42,90-823,19)	229,48 (151,63-373,42)	249,65 (39,83-748,79)
НАД ИЦДГ	12,15 (2,00-430,92)	1,66 (0,01-7,52)††	1,49 (0,46-3,42)†	7,67 (0,23-66,79)‡	6,63 (3,00-53,16)‡
НАДН-ЛДГ	1,12 (0,24-57,56)	106,46 (29,86-207,32)†	93,01 (60,79-113,44)†	50,68 (40,84-115,89)†	22,16 (16,18-68,44)*
НАДН-МДГ	317,29 (112,12-537,16)	113,41 (30,95-270,07)†	93,20 (69,63-150,62)††	50,69 (42,75-141,34)†	22,60 (16,09-68,67)*†‡
НАДН-ГДГ	88,65 (40,90-205,55)	27,21 (7,67-35,47)†	22,56 (16,59-26,80)†	33,47 (12,36-45,10)†	11,95 (6,34-89,53)†

*p<0,05 – по сравнению с исходным значением в той же группе; †p<0,05; ††p<0,01; †††p<0,001 – по сравнению с контролем; ‡p<0,05 – по сравнению с аналогичным показателем в противоположной группе

чАСК – чувствительные к ацетилсалициловой кислоте пациенты; рАСК – резистентные к ацетилсалициловой кислоте пациенты; ГЗФДГ-глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; НАД – никотинамиддинуклеотид; МДГ-малатдегидрогеназа; ГДГ-глутаматдегидрогеназа; ИЦДГ –изоцитратдегидрогеназа

Данные представлены в виде Me (25%-75%)

мента у рАСК пациентов повышается на 10-е сут лечения, тогда как у чАСК пациентов остается без выраженных изменений. Активность НАДФМДГ в тромбоцитах у чАСК пациентов в 1-е сут ОКС соответствует контрольному уровню, но на 10-е сут лечения значительно снижается. У рАСК пациентов активность данного фермента уже в 1-е сут ОКС ниже, чем в контроле и у чАСК пациентов, но повышается в 9,5 раз на 10-е сут лечения, однако, не достигая контрольного уровня. Активность НАДФГДГ в тромбоцитах чАСК пациентов с ОКС уже в 1-е сут снижена по сравнению с контролем и остается пониженной на 10-е сут лечения. У рАСК пациентов в 1-е сут ОКС внутриклеточная активность фермента также снижена относительно контроля, но в 6,4 раза превышает аналогичный уровень у чАСК пациентов. На 10-е сут лечения активность НАДФГДГ в тромбоцитах рАСК пациентов остается пониженной при сравнении с контролем. Активность НАДФН-ГДГ в тромбоцитах чАСК пациентов снижена относительно контроля в 1-е сут ОКС и повышается до контрольного диапазона на 10-е сут. У рАСК пациентов активность НАДФН-ГДГ в 1-е сут ОКС соответствует контрольному уровню и значительно выше, чем у чАСК пациентов. На 10-е сут лечения рАСК пациентов активность данного фермента снижается в 3,3 раза и становится более низкой, чем в контрольной группе.

При исследовании активности НАД-зависимых дегидрогеназ в тромбоцитах при ОКС обнаружено, что активность ГЗФДГ и НАДН-ГДГ у пациентов снижены на 1-е и на 10- сут относительно контрольных значений (табл. 4). Активность ЛДГ у чАСК пациентов с ОКС снижена относительно контроля уже в 1-е сут, а на 10-е сут продолжает понижаться. Активность ЛДГ в тромбоцитах рАСК пациентов в 1-е сут ОКС понижена, как относительно контроля, так и уровня, выявляемого у чАСК пациентов. На 10-е сут лечения активность ЛДГ остается сниженной только относительно контрольного уровня. Активность МДГ в тромбоцитах чАСК пациентов снижена относительно контроля в 1-е сут ОКС, на 10-е сут активность фермента повышается в 7,5 раз, оставаясь ниже контрольных значений. У пациентов рАСК в 1-е сут ОКС активность МДГ ниже контрольного диапазона, но выше чем у чАСК пациентов. На 10-е сут активность фермента понижается более чем в 3 раза. Активность НАДИЦДГ в тромбоцитах чАСК пациентов с ОКС на 1-е и на 10-е сут снижена относительно контроля и уровня, выявленного у рАСК пациентов. Активность НАДН-ЛДГ в тромбоцитах чАСК пациентов с ОКС повышена в период всего наблюдения. У рАСК пациентов активность фермента повышена в 1-е сут ОКС, на 10-е сут снижается в 2,3 раза относительно исходных значений и становится соответствующей контрольному диапазону. Активность НАДН-МДГ у чАСК пациентов снижена относительно контрольного уровня в период всего наблюдения. У рАСК пациентов активность данного фермента в 1-е сут ОКС понижена относительно контрольных значений, на 10-е сут дополнительно снижается по сравнению с контролем в 2,2 раза.

Обсуждение

Известно, что ОКС ассоциируется с повышенной реактивностью тромбоцитов, в отличие стабильной ИБС [7]. Резистентность к АСК наиболее часто наблюдается у больных инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST, что коррелирует с высоким уровнем АДФ в крови. Это обусловлено генерализованной активацией тромбоцитов и высвобождением большого количества АДФ, тромбоксана, повышенным уровнем фактора Виллебранда из-за повреждения эндотелиальных клеток. Кроме того, во время ишемии АДФ может высвобождаться и другими клетками: миоцитами, эндотелиальными клетками, эритроцитами, окончаниями симпатических нервов [8,9].

При исследовании гемостаза обнаружены различия между пациентами и контролем, свидетельствующие о тромбогенном риске при ОКС. В зависимости от чувствительности к АСК, наиболее выраженные различия при ОКС выявляются со стороны сосудисто-тромбоцитарного звена. Особенностью сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у рАСК пациентов является увеличение уровня АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при дозе АДФ в 0,1 мкМ, что определяет повышенную готовность тромбоцитов к агрегации. При этом у рАСК пациентов риск тромбообразования определяется также тем, что на фоне пониженного количества тромбоцитов в периферической крови в 1,4 раза повышается активность фактора Виллебранда. На двойной антитромбоцитарной терапии АСК и клопидогрелом у рАСК пациентов сохраняется высокий уровень АДФ-индуцированной (при дозе 0,1 мкМ) агрегации тромбоцитов и пониженное содержание тромбоцитов при повышенной активности фактора Виллебранда. Кроме того, у пациентов данной группы на 10-е сут лечения повышается уровень спонтанной агрегации, что также свидетельствует о сохраняющемся риске тромбоза, в том числе, раннего тромбоза стентов. У чАСК пациентов на фоне терапии на 15,7% повышается содержание тромбоцитов и возрастает активность фактора Виллебранда. Независимо от чувствительности к АСК при ОКС значительно понижается адреналин-индуцированная агрегация тромбоцитов.

В 1-е сут ОКС состояние коагуляционного гемостаза не различается в зависимости от чувствительности к АСК и характеризуется активацией начальной стадии свертывания с увеличением длительности свертывания и значительным снижением содержания Д-димера. На 10-е сут лечения, независимо от чувствительности к АСК, у пациентов на фоне короткого ТВ, повышенного ко-

личества РФМК и низкого уровня Д-димера увеличивается содержание фибриногена и укорачивается АЧТВ. Только у чАСК пациентов при лечении повысилось содержание АТ III. В целом, исходя из сниженного ТВ и АЧТВ, можно заключить, что при ОКС сохраняется повышенный риск тромбообразования. Исключение составляют пациенты с чАСК, имеющие повышение количества АТ III, что отражает увеличение антикоагуляционной активности крови.

Независимо от чувствительности к АСК, активность дегидрогеназ-тромбоцитов при ОКС отличается от контроля. Вместе с тем, принципиальное значение имеют отличия в метаболизме тромбоцитов у рАСК и чАСК пациентов. Исследуемые ферменты занимают ключевые позиции на разных метаболических путях клетки, характеризуя основные обменные процессы и тем самым влияя на функциональные возможности тромбоцитов [5,6]. Так, Г6ФДГявляется ключевым и инициализирующим ферментом пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит широкий спектр синтетических процессов, в том числе и синтезуглеводной составляющей мембранных рецепторов [6,10]. При этом у рАСК пациентов в 1-е сут ОКС активность фермента ниже не только контрольного диапазона, но и уровня, выявленного у чАСК пациентов, что может отразиться на агрегационной активности тромбоцитов. Пентозофосфатный цикл является основным конкурентом гликолиза за субстрат [6]. Снижение уровня оттока на пентозофосфатный цикл должно привести к повышению интенсивности анаэробного окисления глюкозы. Действительно, в 1-е сут ОКС выявляется повышение анаэробной активности ЛДГ (НАДН-ЛДГ), характеризующей активность терминальных реакций гликолиза. У чАСК пациентов через 10 сут активность фермента сохраняется, тогда как у рАСК пациентов снижается до контрольного уровня, что может быть связано с повышением активности Г6ФДГ.

Стимуляция субстратного потока по гликолизу может осуществляться через Г3ФДГ – фермент, принимающий участие в процессах липидного катаболизма и глицеролфосфатном челночном механизме [11,12]. Однако у больных ОКС активность данного фермента снижена независимо от чувствительности к АСК. Понижение активности НАДФМДГ в дебюте ОКС и на фоне терапии ведет к нарушению внутриклеточного липидного метаболизма и катаболизма ксенобиотиков [13].

Тромбоциты являются клетками, в которых сохранились и функционируют митохондрии [14,15]. Биоэнергетика данного типа клеток определяется не только анаэробным окислением глюкозы, но и аэробными процессами. Известно, что интенсивность аэробного дыхания во многом определяется активностью цикла трикарбоновых кислот, регуляторными ферментами которого являются дегидрогеназы [6].У рАСК пациентов недостаточность цикла трикарбоновых кислот определяется только ферментом конечного этапа (МДГ), а у чАСК пациентов – ферментом начального (НАДИЦДГ) и конечного этапа (МДГ). При этом у чАСК пациентов наблюдается тенденция к восстановлению активности МДГ в процессе лечения. Состояние аэробного дыхания зависит не только от интенсивности субстратного потока по циклу Кребса, но и определяется уровнем водородного градиента в митохондриях, который, в свою очередь, поддерживается малат-аспартатным шунтом. Ключевую реакцию малат-аспартатного шунта катализирует НАДН-МДГ [16,17]. У чАСК и рАСК пациентов активность НАДН-МДГ в тромбоцитах снижена как в 1-е сут, так и на 10-е сут лечения.

Стимуляция субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот может осуществляться за счет аэробного гликолиза через НАД-зависимую лактатдегидрогеназу (ЛДГ). У чАСК и рАСК пациентов активность ЛДГ в тромбоцитах в 1-е сут ОКС снижена и продолжает понижаться к 10-м сут лечения. Следовательно, у больных ОКС с некрозом миокарда понижено стимулирование аэробного дыхания через аэробный гликолиз в тромбоцитах, независимо от чувствительности к АСК.

Важную роль в системе внутриклеточного метаболизма играет обмен азота. Ключевыми ферментами обмена азота являются НАД- и НАДФ-зависимые глутаматдегидрогеназы, которые также осуществляют субстратное и коферментное взаимодействие между циклом трикарбоновых кислот и реакциями аминокислотного обмена [6]. В тромбоцитах представлены и НАД- и НАДФ-зависимые глутаматдегидрогеназы [1,5]. Обнаружено, что если активность НАД-ГДГ в тромбоцитах при ОКС соответствует контрольному уровню, то активность НАДН-ГДГ ниже, чем у лиц контрольной группы, независимо от чувствительности к АСК. Подобное соотношение активности НАД-зависимой глутаматдегидрогеназы определяет повышенный НАД-зависимый отток субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена. Активность НАДФ-ГДГ в тромбоцитахпри ОКС снижена относительно контрольного диапазона в 1-е и 10-е сут. Активность НАДФН-ГДГ в тромбоцитах чАСК пациентов в 1-е сут ОКС значительно снижена как относительно контроля, так и уровня, выявленного у рАСК пациентов. Но на 10-е сут лечения у чАСК пациентов наблюдается восстановление активности данной ферментативной реакции до контрольного уровня. У рАСК пациентов в 1-е сут ОКС активность НАДФН-ГДГ соответствует контрольному диапазону, но на 10-е сут лечения выявляется значительное снижение активности. Можно заключить, что у чАСК пациентов в 1-е сут ОКС снижен уровень НАДФ-зависимого субстратного обмена между циклом Кребса и реакциями аминокислотного обмена, то-

гда как на 10-е сут лечения превалирует отток субстратов с энергетических процессов на аминокислотный обмена. У рАСК пациентов в 1-е сут ОКС наблюдается превалирование НАДФ-зависимого оттока субстратов на реакции аминокислотного обмена, тогда как на 10-е сут лечения выявляется снижение НАДФ-зависимого субстратного взаимодействия между аминокислотным обменом и цитратным циклом.

В целом можно заключить, что основными метаболическими признаками резистентности к АСК при ОКС являются следующие изменения в обменных процессах тромбоцитов: во-первых, выраженная недостаточность пентозофосфатного цикла (за счет очень низкой активности Г6ФДГ) и, соответственно, ингибирование реакций макромолекулярного синтеза. Во-вторых, у рАСК пациентов наблюдается относительно более интенсивный субстратный поток по циклу трикарбоновых кислот. Подобная особенность энергетического обмена тромбоцитов у рАСК пациентов определяет необходимость постоянного притока субстратов на цикл Кребса. Однако у рАСК пациентов, так же, как и у чАСК пациентов, в тромбоцитах повышен уровень анаэробного гликолиза, что определяется высокой анаэробной активностью ЛДГ и, соответственно, последующим выходом лактата из клетки. Единственный механизм внутриклеточного метаболизма лактата связан с аэробной активностью ЛДГ, которая окисляет лактат до пирувата, последний из которых может быть использован в широком спектре метаболических процессов, в том числе, и в аэробных реакциях [6]. В третьих, у рАСК пациентов снижена аэробная активность, что характеризует низкий уровень обмена лактата в тромбоцитах. И, в-четвертых, при резистентности к АСК выявляется усиление НАДФ-зависимого субстратного обмена между циклом трикарбоновых кислот и реакциями аминокислотного обмена (через НАДФГДГ). Необходимо отметить, что НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа определяется как вспомогательный фермент лимонного цикла [18].

Данное исследование имеет ограничение: через 10 дней двойной терапии АСК и клопидогрелом изучались гемостаз и метаболизм тромбоцитов только у резистентных и чувствительных к АСК пациентов. При этом не исследовалась резистентность и чувствительность к клопидогрелу.

Заключение

У пациентов с ОКС в динамике лечения и в зависимости от чувствительности к АСК обнаружены характерные особенности в состоянии сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, выражающиеся в повышении АДФ-индуцированной агрегационной способности тромбоцитов, в снижении их количества и повышении активности фактора Виллебранда у резистентных к АСК больных в 1-е сут ОКС. На 10-е сут лечения риск тромбообразования у данной категории пациентов сохраняется за счет уже выявленных нарушений сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и повышения спонтанной агрегационной способности тромбоцитов. У чАСК пациентов при лечении наблюдается повышение количества тромбоцитов и активности фактора Виллебранда. Состояние коагуляционного гемостаза при ОКС на 1-е и 10-е сут лечения характеризуется активацией начальной стадии свертывания с увеличением длительности свертывания и значительным снижением содержания Д-димера. Однако у чАСК пациентов на 10 сут после ОКС выявляется повышение содержания АТ III. Особенностью метаболизма тромбоцитов у резистентных к АСК пациентов с ОКС является очень низкая активность пентозофосфатного цикла и аэробная активность ЛДГ, а также относительно более высокая, чем при чувствительности к АСК, интенсивность аэробного дыхания и уровень НАДФ-зависимого субстратного обмена между циклом трикарбоновых кислот и реакциями аминокислотного обмена. Представляется перспективным более детальное изучение метаболизма тромбоцитов у пациентов с разными формами ИБС, что, возможно, позволит синтезировать субстанции, контролирующие агрегационную активность тромбоцитов через коррекцию активности пентозофосфатного цикла и гликолиза, отвечающих за пластические и энергетические процессы в клетке.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Disclosures. All authors have not disclosed potential conflicts of interest regarding the content of this paper.

References / Литература

1. GrinshteinYu.I., Savchenko A.A., GrinshteinI.Yu., Savchenko E.A. Features of hemostasis, platelet metabolic activity and the frequency of aspirin resistance in patients with chronic heart failure after coronary artery bypass grafting. Cardiology 2008; 48(6):51-56. In Russian (Гринштейн Ю.И.; Савченко А.А.; Гринштейн И.Ю.; Савченко Е.А. Особенности гемостаза, метаболической активности тромбоцитов и частота резистентности к аспирину у больных с хронической сердечной недостаточностью после аортокоронарного шунтирования. Кардиология 2008; 48(6):51-56).
2. Liu X.F., Cao J., Fan L., Liu L., Li J., Hu G.L., Hu Y.X., Li X.L. Prevalence of and risk factors for aspirin resistance in elderly patients with coronary artery disease. J Geriatr Cardiol 2013; 10 (1): 21-7.
3. ESC Guidelines For the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). European Heart Journal 2011; 32: 2999-3054.
4. GrinshteinYu.I.; Filonenko I.V.; Savchenko A.A. et al. A method for diagnosing resistance to acetylsalicylic acid. Patent № 2413953 Russia, MPK G01N 33/86 (2006.01). Published 10.03.2009, Bul. № 7. Russian (Гринштейн Ю.И.; Филоненко И.В.; Савченко А.А. и др. Способ диагностики резистентности к ацетилсалициловой кислоте. Патент № 2413953 РФ, МПК G01N 33/86 (2006.01). Опубл. 10.03.2009, Бюл. № 7).
5. Savchenko E.A.; Savchenko A.A.; Gerasimchuk A.N.; Grishhenko D.A. Evaluation of the metabolic status of platelets in normal and ischemic heart disease. Klinicheskaja laboratornaja diagnostika 2006; 5: 33-6. Russian (Савченко Е.А.; Савченко А.А.; Герасимчук А.Н.; Грищенко Д.А. Оценка метаболического статуса тромбоцитов в норме и при ишемической болезни сердца. Клиническая лабораторная диагностика 2006; 5: 33-6).
6. Severin E.S., Alejnikova T.L., Osipov E.V., Silaeva S.A. Biological chemistry. Moscow: MIA; 2008. In Russian (Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В., Силаева С.А. Биологическая химия. М.: МИА; 2008).
7. Borna C.; Lazarowski E.; van Heusden C. et al. Resistance to aspirin is increased by ST-elevation myocardial infarction and correlates with adenosine diphosphate levels. Thromb J 2005; 3: 10.
8. Grinshtein Yu.I.; Kosinova A.A.; Grinshtein I.Yu. The possible causes and mechanisms of development of secondary acetylsalicylic acid resistance. Rossijskie medicinskie vesti 2013; 2: 4-13. Russian (Гринштейн Ю.И.; Косинова А.А.; Гринштейн И.Ю. Возможные причины и механизмы развития вторичной резистентности к ацетилсалициловой кислоте. Российские медицинские вести 2013; 2: 4-13).
9. Chakroun T.; Gerotziafas G.; Robert F. et al. In vitro aspirin resistance detected by PFA-100 closure time: pivotal role of plasma von Willebrand factor. Br J Haematol 2004; 124 (1): 80-5.
10. Luzzatto L., Nannelli C., Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Hematol Oncol Clin North Am 2016; 30(2): 373-93.
11. Sato T., Morita A., Mori N., Miura S. Glycerol 3-phosphate dehydrogenase 1 deficiency enhances exercise capacity due to increased lipid oxidation during strenuous exercise. Biochem Biophys Res Commun 2015; 457(4): 653-8.
12. Sledzinski T., Korczynska J., Goyke E., et al. Association between cytosolic glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene expression in human subcutaneous adipose tissue and BMI. Cell Physiol Biochem 2013; 32(2): 300-9.
13. Liu L., Shah S., Fan J., et al. Malic enzyme tracers reveal hypoxia-induced switch in adipocyte NADPH pathway usage. Nat Chem Biol 2016; 12(5): 345-52.
14. Garcia-Souza L.F., Oliveira M.F. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology. Int J Biochem Cell Biol 2014; 50: 156-60.
15. Wang Z., Wang J., Xie R, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species play an important role in Doxorubicin-induced platelet apoptosis. Int J Mol Sci 2015; 16 (5): 11087-100.
16. Korla K., Vadlakonda L., Mitra C.K. Kinetic simulation of malate-aspartate and citrate-pyruvate shuttles in association with Krebs cycle. J Biomol Struct Dyn 2015; 33(11): 2390-403.
17. Wang C., Chen H., Zhang J., et al. Malate-aspartate shuttle mediates the intracellular ATP levels, antioxidation capacity and survival of differentiated PC12 cells. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol 2014; 6(2): 109-14.
18. Lee Y.J., Kim K.J., Kang H.Y., et al. Involvement of GDH3-encoded NADP+-dependent glutamate dehydrogenase in yeast cell resistance to stress-induced apoptosis in stationary phase cells. J Biol Chem 2012; 287(53): 44221-33.

About the Authors:
Igor Yu. Grinshtein *– MD, PhD, Teaching Assistant, Chair of Outpatient Therapy and Family Medicine, Krasnoyarsk State Medical University named after V.F. Voyno-Yasenetsky*
Andrey A. Savchenko *– MD, PhD, Professor, Head of Laboratory of Cell-Molecular Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Russian Academy of Medical Sciences; Head of Chair of Physiology named after Prof. A.T. Pshonik, Krasnoyarsk State Medical University named after V.F. Voyno-Yasenetsky*
Yuri I. Grinshtein *– MD, PhD, Professor, Head of Chair of Therapy, Institute of Postgraduate Education, Krasnoyarsk State Medical University named after V.F. Voyno-Yasenetsky*
Marina M. Petrova *– MD, PhD, Professor, Head of Chair of Outpatient Therapy, Family Medicine and Healthy Lifestyle, Vice-rector for Scientific Work, Krasnoyarsk State Medical University named after V.F. Voyno-Yasenetsky*

Сведения об авторах:
Гринштейн Игорь Юрьевич *– к.м.н., ассистент кафедры поликлинической терапии и семейной медицины КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого*
Савченко Андрей Анатольевич *– д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН; зав. кафедрой физиологии им. проф. А.Т. Пшоника КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого*
Гринштейн Юрий Исаевич *– д.м.н., профессор, зав. кафедрой терапии Института последипломного образования КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого*
Петрова Марина Михайловна *– д.м.н., профессор, зав. кафедрой поликлинической терапии, семейной медицины и здорового образа жизни с курсом ПО, проректор по научной работе КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого*