

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ТРОМБОЦИТАМИ И НЕЙТРОФИЛАМИ В ФОРМИРОВАНИИ НЕДОСТАТОЧНОГО ОТВЕТА НА АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВУЮ КИСЛОТУ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

Гончаров М. Д.¹, Гринштейн Ю. И.², Савченко А. А.^{2,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия

Контактная информация:

Гончаров Максим Дмитриевич,
ФГБУ «ФЦССХ» Минздрава России,
ул. Караульная, д. 45, Красноярск,
Россия, 660020.
E-mail: adimax07@mail.ru

Статья поступила в редакцию
16.12.2021 и принята к печати
22.02.2022.

Резюме

Актуальность. Аспиринорезистентность может привести к тромбозу. Тромбоциты взаимодействуют с нейтрофилами в очаге атеросклеротического повреждения. Уровни синтеза активных форм кислорода (АФК) характеризует их функциональный потенциал. Резистентность тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте (АСК) может влиять на синтез АФК. **Цель.** Выявить особенности синтеза АФК тромбоцитами и нейтрофилами в рамках их межклеточного взаимодействия у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) после операции коронарного шунтирования (КШ) в зависимости от чувствительности к АСК и от антиагрегантной терапии. **Материалы и методы.** В исследование включено 104 пациента с ИБС и 36 здоровых доноров. За 5 дней до КШ больные прекращали получать антиагреганты, с первого дня после операции назначалось 100 мг/сут. АСК, пациентам на двойной антитромбоцитарной терапии (ДАТ) к принимаемой АСК на 2–3 сутки добавлялось 75 мг/сут. клопидогрела. Резистентность к АСК определяли при уровне агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой $\geq 20\%$. Уровни синтеза АФК исследовали хемилюминесцентным методом (ХЛ). **Результаты.** 31,7 % пациентов оказались резистентными к АСК (рАСК). У чувствительных к АСК пациентов (чАСК) показатели ХЛ выше, чем в контрольной группе. У рАСК, находящихся на ДАТ, показатели ХЛ возросли относительно контрольной группы и не отличались от чАСК. В группах чАСК и рАСК на терапии АСК выявлены взаимосвязи между показателями ХЛ нейтрофилов и тромбоцитов. **Заключение.** Наличие или отсутствие взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов на уровне рецепторов и/или микровезикул может приводить к резистентности тромбоцитов к АСК у пациентов с ИБС. В ряде случаев данный феномен можно преодолеть путем назначения ДАТ вместо монотерапии АСК.

Ключевые слова: ацетилсалициловая кислота, ишемическая болезнь сердца, межклеточное взаимодействие, нейтрофил, резистентность, тромбоцит.

Для цитирования: Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А. Особенности продукции активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами в формировании недостаточного ответа на ацетилсалициловую кислоту у пациентов с ишемической болезнью сердца после операции коронарного шунтирования. Трансляционная медицина. 2022;9(1):12-28. DOI: 10.18705/2311-449-2022-9-1-12-28.

FEATURES OF THE REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION BY PLATELETS AND NEUTROPHILS IN THE FORMATION OF AN INSUFFICIENT RESPONSE TO ACETYLSALICYLIC ACID IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE AFTER CORONARY BYPASS SURGERY

Maxim D. Goncharov¹, Yury I. Grinshtein², Andrei A. Savchenko^{2,3}

¹ Federal Center of Cardiovascular Surgery, Krasnoyarsk, Russia

² Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

³ Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the RAS, Research Institute for Medical Problems in the North, Krasnoyarsk, Russia

Corresponding author:

Maxim D. Goncharov,
Federal Center of Cardiovascular Surgery,
Karaul'naya str., 45, Krasnoyarsk, Russia,
660020.
E-mail: adimax07@mail.ru

Received 16 December 2021; accepted
22 February 2022.

Abstract

Background. Aspirin resistance can lead to thrombosis. Platelets interact with neutrophils in the focus of atherosclerotic damage. The levels of synthesis of reactive oxygen species (ROS) characterize their functional potential. Platelet resistance to acetylsalicylic acid (ASA) can affect the synthesis of ROS. **Objective.** To reveal the features of ROS synthesis by platelets and neutrophils in patients with coronary heart disease (CHD) after coronary artery bypass grafting (CABG) depending on sensitivity to ASA and antiplatelet therapy. **Design and methods.** There were 104 patients with CHD and 36 healthy donors. Patients stopped receiving antiplatelet agents 5 days before CABG, ASA was prescribed after surgery, patients on dual antiplatelet therapy (DAT) clopidogrel were added to ASA for 2–3 days. Resistance to ASA was determined at a level of platelet aggregation with arachidonic acid $\geq 20\%$. The ROS synthesis levels were examined by the chemiluminescent method (CL). **Results.** 31.7 % of patients were resistant to ASA (rASA). In ASA-sensitive patients (sASA), CL values were increased. In rASA on DAT, CL parameters were increased, but did not differ from sASA. In the sASA and rASA groups on ASA therapy, correlations between neutrophil and platelet CL parameters were revealed. **Conclusion.** The presence or absence of interaction between platelets and neutrophils at the level of receptors and/or microvesicles can lead to platelet resistance to ASA in patients with coronary artery disease. Sometimes, this effect could be compensated by DAT.

Key words: acetylsalicylic acid, coronary artery disease, intercellular interaction, neutrophil, platelet, resistance.

For citation: Goncharov MD, Grinshtein YuI, Savchenko AA. Features of the reactive oxygen species production by platelets and neutrophils in the formation of an insufficient response to acetylsalicylic acid in patients with coronary heart disease after coronary bypass surgery. *Translyatsionnaya meditsina*=Translational Medicine. 2022;9(1):12-28. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-449-2022-9-1-12-28.

Список сокращений: АДФ — аденозиндифосфат, АСК — ацетилсалициловая кислота, АФК — активные формы кислорода, ДАТ — двойная антитромбоцитарная терапия, ИА — индекс активации, ИБС — ишемическая болезнь сердца, КШ — коронарное шунтирование, рАСК — резистентные к ацетилсалициловой кислоте, ХЛ — хемилюминесценция, ЦОГ — циклооксигеназа, чАСК — чувствительные к ацетилсалициловой кислоте, I_{max} — максимальное значение интенсивности хемилюминесценции, S — площадь под кривые хемилюминесценции, T_{max} — время выхода на максимум интенсивности хемилюминесценции.

Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) остается ведущей причиной смерти во всем мире. В США на ИБС приходится 48 % всей смертности от сердечно-сосудистых заболеваний или примерно одна из каждых семи смертей [1].

Известно, что повреждение атеросклеротической бляшки в результате разрыва или эрозии приводит к атеротромбозу с клиникой острого коронарного синдрома или внезапной смерти. У пациентов с ИБС, перенесших коронарное шунтирование (КШ), зачастую возникают риски тромбоза шунтов даже при условиях использования маммарных артерий. Активация тромбоцитов в местах повреждения сосудов является ключевым шагом в образовании тромба [2]. Поэтому антитромбоцитарные препараты являются основным средством вторичной профилактики тромбозов при ИБС и после КШ, в том числе с применением двойной антитромбоцитарной терапии (ДАТ) [3].

Однако часть пациентов не реагирует должным образом на антитромбоцитарные препараты в результате гетерогенного явления, известного как «устойчивость к антиагрегантам», или резистентность. Это может привести к тромбозу шунтов ввиду недостаточного подавления агрегационной активности тромбоцитов, в частности, ацетилсалициловой кислотой (АСК), резистентность к которой наблюдается до 50 % случаев [4, 5]. Выявлен ряд генетических, клинических и молекулярных возможных причин такого явления [6]. Помимо всего прочего, отсутствует единая стандартизованная методика определения чувствительности тромбоцитов к АСК, что оставляет данный вопрос открытым для дискуссий и дальнейшего изучения [7].

Чувствительность тромбоцитов к АСК напрямую связана с уровнем их остаточной активности после воздействия лекарственного препарата, а также от окружающих тромбоциты клеток и активных молекул. Атеросклероз коронарных арте-

рий сопровождается хроническим воспалением в эндотелии сосудов, соответственно в очаге повреждения, помимо тромбоцитов, присутствуют и другие клетки, в частности нейтрофилы. Тромбоциты и нейтрофилы способны взаимодействовать друг с другом с помощью рецепторов и/или посредством передачи метаболитов и сигналов с помощью микровезикул [8]. О функциональном потенциале клеток (в том числе и тромбоцитов) можно судить по синтезу ими активных форм кислорода (АФК), которые выполняют не только деструктивную функцию в организме, но и роль сигнальных молекул, вторичных мессенджеров в различных процессах жизнедеятельности. К одним из источников АФК в тромбоцитах относятся реакции метаболизма арахидоновой кислоты (которую они могут получать и от нейтрофилов), где основную роль играет циклооксигеназа-1 (ЦОГ-1), являющаяся точкой приложения для АСК [9]. Соответственно резистентность тромбоцитов к АСК может проявляться в изменении продукции ими АФК. Детектировать АФК можно с помощью хемилюминесцентного (ХЛ) метода, прибегая к использованию дополнительных стимуляторов и индукторов, дающих картину не только базовой продукции активных радикалов, но и резервного потенциала клеток.

В связи с этим вызывает огромный интерес изучение влияния операции КШ, применяемой антиагрегантной терапии (монотерапия АСК или ДАТ АСК и клопидогрелом) и межклеточных взаимодействий на продукцию АФК нейтрофилами и тромбоцитами у резистентных и чувствительных к АСК пациентов с ИБС.

Поэтому целью нашего исследования явилось выявление особенностей и закономерностей в продукции АФК тромбоцитами и нейтрофилами в рамках их межклеточного взаимодействия у пациентов с ИБС после операции КШ в зависимости от их чувствительности к АСК и от антиагрегантной терапии.

Материалы и методы

В исследование включены 104 пациента (79 мужчин и 25 женщин) с ИБС в возрасте от 35 до 76 лет (средний возраст $61 \pm 5,5$ года) со II–III функциональным классом стабильной стенокардии согласно Канадской классификации, которым проводилась операция КШ (табл. 1). Атеросклеротическое поражение коронарных артерий подтверждалось коронароангиографией. Критериями исключения были хроническая болезнь почек (скорость клубочковой фильтрации ниже 60 мл/мин/1,73 м²), печеночная недостаточность (превы-

Таблица 1. Клинико-анамнестическая характеристика пациентов с ИБС (Ме (C₂₅–C₇₅)).

p₁ — уровень статистической значимости различий между группами пациентов чАСК и рАСК (монотерапия АСК); p₂ — уровень статистической значимости различий между группами пациентов рАСК (монотерапия АСК) и рАСК (ДАТ); p₃ — уровень статистической значимости различий между группами пациентов чАСК и рАСК (ДАТ). При p < 0,05 отличия между группами считались значимыми

Table 1. Clinical and anamnestic characteristics of patients with coronary artery disease (Me (C₂₅–C₇₅)).

p₁ is the level of statistical significance of differences between groups of patients with hASA and rASA (ASA monotherapy); p₂ is the level of statistical significance of differences between the groups of patients with rASA (ASA monotherapy) and rASA (DAT); p₃ is the level of statistical significance of differences between groups of patients with hASA and rASA (DAT). At p < 0.05, differences between groups were considered significant

Характеристика	чАСК (n = 71)	рАСК (монотерапия АСК) (n = 18)	рАСК (ДАТ) (n = 15)	p-уровень
Пол, n жен/муж	14/57	10/8	1/14	0,002 p ₁ = 0,006 p ₂ = 0,010 p ₃ = 0,404
Возраст (годы), Ме (C ₂₅ –C ₇₅)	64,0 (58,0-65,0)	65,0 (57,5-68,0)	58,0 (54,5-62,5)	0,105
Курение, %	46,5	38,9	26,7	0,659
Общий холестерин, ммоль/л	4,5 (3,79-5,66)	3,8 (3,42-4,53)	4,67 (3,68-5,76)	0,184
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,58 (6,7-8,64)	7,38 (6,36-8,28)	7,10 (6,0-8,84)	0,871
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	225,0 (203,0-274,5)	228,5 (203,5-259,5)	234,0 (218,0-289,0)	0,577
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,03 (4,73-5,31)	4,98 (4,69-5,13)	4,82 (4,73-5,25)	0,754
Гемоглобин, г/л	141,0 (133,5-154,5)	141,0 (131,25-148,25)	141,0 (134,5-147,0)	0,687
Креатинин, ммоль/л	109,0 (98,5-118,5)	103,0 (91,0-112,75)	118,0 (102,0-124,0)	0,196
Стабильная стенокардия, класс II, %	66,2	44,5	40,0	0,236
Стабильная стенокардия, класс III, %	33,8	55,5	60,0	0,236
Постинфарктный кардиосклероз, %	64,8	44,4	80,0	0,099
Ожирение, %	26,8	55,5	40	0,060
Время искусственного кровообращения, мин	66,0 (57,0;87,0)	62,0 (61,8;87,5)	81,0 (66,3;103,0)	0,323
Количество операций на работающем сердце, %	25,4	11,1	100	0,001 p ₁ = 0,329 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001
Количество шунтов, шт.	2 (1;3)	3 (2;3)	2 (1,5;3)	0,215
Плеврит в послеоперационном периоде, %	28,2	22,2	33,3	0,775

шение норм активности печеночных трансаминаз в 3 и более раз), язвенная болезнь желудка и/или 12-перстной кишки в стадии обострения, непереносимость АСК и клопидогрела. На терапии АСК находились 64 пациента, на ДАТ (АСК + клопидогрел) — 40 пациентов. За 5 дней перед КИШ пациенты прекращали получать антиагреганты, а с первого дня после операции им назначалось 100 мг/сут. кишечнорастворимой формы АСК. В группе 40 пациентов, которые принимали ДАТ еще до операции ввиду перенесенного ранее острого инфаркта миокарда или нестабильной стенокардии, после КИШ назначалась ДАТ с добавлением к АСК клопидогрела в дозе 75 мг/сут. на 2–3 день после операции. Измерения продукции АФК тромбоцитами и нейтрофилами у каждого пациента проводили трижды (до операции, в первые сутки после операции и на 8–10 сутки после операции), что позволяет установить влияние операции и антиагрегантной терапии на исследуемые параметры. Контрольную группу составили 36 здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту.

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 2000 года и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в данном исследовании.

В качестве материала использовали венозную кровь. Определение резистентности тромбоцитов к АСК проводили в плазме, полученной после предварительного 15-минутного центрифугирования крови (3400 оборотов в минуту) с 3,2 % цитратом натрия в соотношении 9:1, на оптическом агрегометре Chronolog 490 (США) при добавлении арахидоновой кислоты (0,5 мМ) CHRONO-PAR (США). До начала терапии АСК (до и в 1 сутки после КИШ), агрегация тромбоцитов с арахидоновой кислотой определялась после их инкубации с АСК (3,36 мМ, чистота $\geq 99.0\%$, A5376 Sigma Aldrich) *in vitro* в течение 3 минут при температуре 37 °C [10]. Затем агрегация тромбоцитов определялась на 8–10 сутки после КИШ. Резистентность к АСК определялась при уровне агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой равной или более 20 % хотя бы в одной точке наблюдения.

Для определения продукции АФК ХЛ методом тромбоциты выделяли согласно Савченко Е. А. и соавторам [11]. Для исследования использовали тромбоциты в количестве 2×10^7 клеток на пробу. Реакционная смесь для определения спонтанного уровня синтеза АФК тромбоцитами включала 50 мкл люцигенина или люминола в концентрации 50 мкг/мл и 250 мкл буфера (0,13 М NaCl, 0,02 М Трис-HCl буфера, 0,03 М ЭДТА, 0,015 М глюкозы, pH = 7,4). Реакционная смесь для определения АДФ-индуцированного уровня синтеза АФК включала 50 мкл люцигенина или люминола в концентрации 50 мкг/мл, 50 мкл АДФ 0,1 М и 200 мкл буфера (0,13 М NaCl, 0,02 М Трис-HCl буфера, 0,03 М ЭДТА, 0,015 М глюкозы, pH = 7,4). Измерение спонтанного и индуцированного синтеза АФК запускалось введением по 200 мкл взвеси тромбоцитов, содержащей их в количестве 2×10^7 [12].

Выделение нейтрофилов осуществляли из крови с гепарином лития по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-урографина с последующей очисткой от прилипающих клеток [13]. Реакционная смесь для определения спонтанного уровня синтеза АФК нейтрофильными гранулоцитами включала 20 мкл донорской сыворотки AB(IV)Rh(-), 50 мкл люминола или люцигенина (Sigma, США) в концентрации 10^{-5} М и 240 мкл раствора Хэнкса («ПанЭко», Россия). Реакционная смесь для определения зимозан-индуцированного уровня синтеза АФК включала 50 мкл люминола или люцигенина (Sigma, США) в концентрации 10^{-5} М, 40 мкл опсонизированного зимозана, 20 мкл донорской сыворотки AB(IV)Rh(-) и 200 мкл раствора Хэнкса. Измерение спонтанного и индуцированного синтеза АФК запускалось введением по 200 мкл взвеси нейтрофилов, содержащей их в количестве 4×10^5 .

Оценку спонтанной и индуцированной ХЛ осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном биохемилюминесцентном анализаторе БЛМ-3607 (ООО «МедБиоТех», Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) ХЛ. Усиление ХЛ, индуцированной АДФ и зимозаном, оценивали отношением площади под кривой индуцированной ХЛ к площади под кривой спонтанной (Синд/Сспонт) и определяли, как индекс активации (ИА).

Статистический анализ проведен с помощью пакета Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). На основании применения критерия Колмогорова–Смирнова (Kolmogorov–Smirnov test) гипотеза о нормальном (Гауссовском) распределении была отвергнута.

Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни, зависимых выборок — по критерию Вилкоксона. С целью выявления функциональных взаимосвязей между группами изучаемых параметров применяли корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (Spearman rank R, r). Результаты представлены в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го процентилей (Q_{25} и Q_{75}).

При сравнении клинико-анамнестических характеристик между группами пациентов использовали непараметрический критерий Краскала–Уоллиса. Для сравнения категориальных переменных использовали критерий χ^2 , при количестве наблюдений менее 5 использовался точный критерий Фишера.

Результаты

По итогам исследования все пациенты с ИБС были разделены на две группы в зависимости от результата агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой. Это группа чувствительных к АСК пациентов (чАСК, $n = 71$) и группа резистентных к АСК пациентов (рАСК, $n = 33$). Резистентные к АСК пациенты были также разделены на 2 группы: 18 пациентов с ИБС на терапии АСК и 15 на ДАТ (АСК + клопидогрел).

Чувствительность к АСК большинства пациентов с ИБС в разные периоды исследования изменялась. Количество рАСК пациентов оказалось переменным, таковых до начала терапии было 12 (11,5 %), после КШ — 7 (6,7 %), а через 8–10 суток после КШ на терапии АСК — 25 (24 %) не отвечали на дезагрегант. Таким образом, 30 рАСК пациентов с ИБС на протяжении всего времени меняли свою чувствительность к АСК.

По результатам исследования было обнаружено, что у чАСК пациентов статистически значимо выше значение многих показателей ХЛ тромбоцитов и нейтрофилов по сравнению с контрольной группой. Причем такая картина наблюдается как до операции КШ, так и после нее, в спонтанных и индуцированных тестах с люминолом и с люцигенином (табл. 2–5).

В группе рАСК (терапия АСК) по сравнению с контрольной группой выше оказался лишь показатель Tmax тромбоцитов в АДФ-индуцированном тесте с люминолом до операции КШ (табл. 3). В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с контрольной группой выше оказались следующие показатели ХЛ тромбоцитов: Imax в спонтанном тесте с люцигенином, Imax в АДФ-индуцированном тесте и S в спонтанном тесте с люминолом (в пер-

вые сутки после операции КШ), Imax в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте с люминолом (на 8–10 сутки после операции КШ) (табл. 2, 3).

В группе рАСК (терапия АСК) по сравнению с группой чАСК значения показателей тромбоцитов S в АДФ-индуцированном тесте с люминолом и Imax в спонтанном тесте с люцигенином до операции КШ оказались достоверно ниже. Такая же тенденция наблюдалась и в первые сутки после операции КШ в отношении Imax тромбоцитов в спонтанном и АДФ-индуцированном тесте с люцигенином, а также на 8–10 сутки после операции КШ в отношении Imax в АДФ-индуцированном тесте с люминолом и люцигенином и S в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином. В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с группой чАСК значения показателей ИА в тесте с люцигенином в первые сутки после операции КШ, а также Tmax в АДФ-индуцированном тесте с люминолом и Tmax в спонтанном тесте с люцигенином на 8–10 сутки после операции КШ были достоверно ниже. Статистически значимые различия между группами рАСК на терапии АСК и ДАТ были обнаружены лишь по показателю S в АДФ-индуцированном тесте тромбоцитов с люминолом до операции КШ. Он оказался выше в группе рАСК (ДАТ). У чАСК пациентов по сравнению с периодом до КШ в первые сутки после КШ снизились S в АДФ-индуцированном тесте тромбоцитов с люминолом, Tmax в АДФ-индуцированном тесте с люцигенином и повысилась Imax в спонтанном тесте с люцигенином. К 8–10 суткам после операции повысились S в спонтанном тесте тромбоцитов с люминолом и ИА с люцигенином, снизилось Tmax в спонтанном тесте с люминолом по сравнению с периодом до КШ. В группе рАСК (монотерапия АСК) на 8–10 сутки после операции снизилась S в АДФ-индуцированном тесте тромбоцитов с люцигенином по сравнению с периодом до КШ (табл. 2, 3).

В группе рАСК (терапия АСК) по сравнению с контрольной группой, касаясь нейтрофилов, выше оказались показатели Tmax в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте с люцигенином до операции КШ и ИА в тесте с люминолом до КШ, а также в первые сутки после КШ. В группе же рАСК (ДАТ) по сравнению с контрольной группой были повышены такие показатели ХЛ нейтрофилов, как Tmax в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином (до КШ), Imax в зимозан-индуцированном тесте с люминолом (в первые сутки после КШ), Tmax в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте с люминолом, а также Imax и S в зимозан-индуцированном тесте с люминолом и люцигенином (на 8–10 сутки после КШ) (табл. 4, 5).

Таблица 2. Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люцигенином у пациентов с ИБС (Me (C₂₅–C₇₅)). p₁ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями контрольной группы; p₂ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями чАСК пациентов с ИБС; p₃ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями рАСК пациентов с ИБС (монотерапия АСК); p₄ — уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями периода наблюдения до КШ у пациентов с ИБС. При p < 0,05 отличия между группами считались значимыми

Table 2. Chemiluminescent activity of platelets with lucigenin in patients with coronary artery disease (Me (C₂₅–C₇₅)). p₁ is the level of statistical significance of differences in comparison with the indicators of the control group. p₂ is the level of statistical significance of differences in comparison with the hASA indices in patients with coronary artery disease. p₃ is the level of statistical significance of differences compared with the rASA parameters in patients with coronary artery disease (ASA monotherapy). p₄ is the level of statistical significance of differences compared with the corresponding indicators of the observation period before CABG in patients with coronary artery disease. At p < 0.05, differences between groups were considered significant

Показатели	Контроль (n = 36) 1	чАСК (n = 71) 2	рАСК (монотерапия АСК) (n = 18) 3	рАСК (ДАТ) (n = 15) 4
До КШ				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	219 (80-799)	713 (79-2581); p ₁ = 0,027	611 (286-1782)	212 (70-560)
I _{max} , о.е. × 10 ³	0,074 (0,059-0,087)	0,08 (0,072-0,35) p ₁ = 0,006	0,061 (0,045-0,078) p ₂ = 0,006	0,088 (0,07-0,096)
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	0,225 (0,171-0,266)	0,28 (0,16-0,55);	0,136 (0,11-0,29)	0,227 (0,162-0,233)
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	319 (71-1410)	887 (346-2965); p ₁ = 0,004	764 (509-1928)	636 (287-1201)
I _{max} , о.е. × 10 ³	0,076 (0,061-0,082)	0,1 (0,059-0,4); p ₁ = 0,013	0,071 (0,05-0,16)	0,1 (0,075-0,132)
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	0,241 (0,161-0,298)	0,31 (0,14-0,7);	0,234 (0,175-0,408)	0,27 (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)
Первые сутки после КШ				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	219 (80-799)	555 (261-1978); p ₁ = 0,008	408 (95-710)	212 (89-382)
I _{max} , о.е. × 10 ³	0,074 (0,059-0,087)	0,09 (0,069-0,132); p ₁ = 0,036; p ₄ = 0,04	0,065 (0,05-0,077); p ₂ = 0,006	0,097 (0,086-0,117); p ₁ = 0,049
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	0,225 (0,171-0,266)	0,259 (0,145-0,534);	0,182 (0,12-0,246)	0,36 (0,22-0,4)
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	319 (71-1410)	435 (137-981); p ₄ = 0,004	509 (66-799)	282 (178-2519)

Imax, о.е. $\times 10^3$	0,076 (0,061-0,082)	0,09 (0,063-0,286)	0,058 (0,054-0,08); $p_2 = 0,006$	0,09 (0,072-0,097)
S, о.е. $\times$ сек. $\times 10^6$	0,241 (0,161-0,298)	0,276 (0,145-0,61)	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); $p_2 = 0,006$
8–10 сутки после КШ на фоне терапии АСК				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	219 (80-799)	714 (180-2042) $p_1 = 0,015$	212 (88-713)	124 (0-464); $p_2 = 0,006$
Imax, о.е. $\times 10^3$	0,074 (0,059-0,087)	0,1 (0,078-0,295) $p_1 = 0,002$	0,064 (0,055-0,092)	0,085 (0,078-0,111)
S, о.е. $\times$ сек. $\times 10^6$	0,225 (0,171-0,266)	0,251 (0,115-0,658)	0,172 (0,155-0,214)	0,31 (0,215-0,335)
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	319 (71-1410)	716 (78-2708)	574 (51-1147)	302 (35-1232)
Imax, о.е. $\times 10^3$	0,076 (0,061-0,082)	0,11 (0,08-0,316); $p_1 = 0,001$	0,058 (0,050-0,097); $p_2 = 0,006$	0,086 (0,076-0,118)
S, о.е. $\times$ сек. $\times 10^6$	0,241 (0,161-0,298)	0,33 (0,18-0,48); $p_1 = 0,037$	0,136 (0,075-0,323); $p_2 = 0,006$; $p_4 = 0,037$	0,244 (0,124-0,329)
ИА	1,03 (0,96-1,25)	1,10 (0,88-2,01); $p_4 = 0,025$	1,02 (0,43-1,38)	0,92 (0,5-1,1)

При анализе нейтрофилов в группе рАСК (терапия АСК) по сравнению с группой чАСК достоверно ниже оказались такие показатели, как Imax в спонтанном тесте с люцигенином (до КШ), Imax и S в спонтанном тесте с люминолом и люцигенином, а также Imax и S в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином (в первые сутки после КШ). В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с группой чАСК оказалось выше лишь Tmax в спонтанном тесте с люминолом на 8–10 сутки после операции КШ. В группе рАСК (ДАТ) по сравнению с рАСК (терапия АСК) на 8–10 сутки после КШ были выше такие показатели, как Tmax в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте с люминолом, а также S в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином. У чАСК по сравнению с периодом до КШ в первые сутки после КШ наблюдалось повышение таких показателей, как Imax и S в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте нейтрофилов с люминолом и Imax в спонтанном тесте с люцигенином, при этом Tmax в спонтанном и зимозан-индуцированном тесте снизилось, а к 8–10 суткам после операции было лишь снижение Tmax в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином. В группе рАСК (терапия АСК) в первые сутки после КШ снизилось Tmax

в спонтанном тесте с люцигенином, а на 8–10 сутки после операции снизились Tmax в зимозан-индуцированном тесте и ИА с люцигенином. В группе рАСК (ДАТ) в первые сутки после КШ снизилось Tmax в зимозан-индуцированном тесте с люцигенином, а на 8–10 сутки после операции в зимозан-индуцированном тесте с люминолом повысились такие показатели, как Tmax и Imax (табл. 4, 5).

В контрольной группе наблюдались обратные умеренные корреляции между такими ХЛ показателями нейтрофилов и тромбоцитов, как Imax 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 взаимосвязи между показателями ХЛ нейтрофилов и тромбоцитов и в спонтанных, и в АДФ-индуцированных тестах с люцигенином до КШ и в первые сутки после КШ (табл. 6).

В группе рАСК (монотерапия АСК) также обнаружены прямые взаимосвязи и в спонтанных и в АДФ-индуцированных тестах с люцигенином, но уже не только в первые сутки после КШ, но и на 8–10 сутки после КШ (табл. 7). В группе рАСК (ДАТ) корреляций между показателями ХЛ нейтрофилов и тромбоцитов обнаружено не было.

Таблица 3. Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люминолом у пациентов с ИБС (Me (C₂₅–C₇₅)). p₁ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями контрольной группы; p₂ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями чАСК пациентов с ИБС; p₃ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями рАСК пациентов с ИБС (монотерапия АСК); p₄ — уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями периода наблюдения до КШ у пациентов с ИБС. При p < 0,05 отличия между группами считались значимыми

Table 3. Chemiluminescent activity of platelets with luminol in patients with coronary artery disease (Me (C₂₅–C₇₅)). p₁ is the level of statistical significance of differences in comparison with the indicators of the control group. p₂ is the level of statistical significance of differences in comparison with the hASA indices in patients with coronary artery disease. p₃ is the level of statistical significance of differences compared with the rASA parameters in patients with coronary artery disease (ASA monotherapy). p₄ is the level of statistical significance of differences compared with the corresponding indicators of the observation period before CABG in patients with coronary artery disease. At p < 0.05, differences between groups were considered significant

Показатели	Контроль (n = 36) 1	чАСК (n = 71) 2	рАСК (монотерапия АСК) (n = 18) 3	рАСК (ДАТ) (n = 15) 4
До КШ				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	141 (0-738)	349 (45-1666)	255 (74-1748)	95 (71-319);
I _{max} , о.е. × 10 ³	0,077 (0,057-0,085)	0,1 (0,07-0,385); p ₁ = 0,01	0,06 (0,047-0,273)	0,081 (0,079-0,339)
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	0,226 (0,11-0,287)	0,27 (0,125-0,812)	0,142 (0,084-0,258)	0,3 (0,21-0,35)
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	95 (0-637)	349 (0-1653);	710 (88-2197); p ₁ = 0,024	776 (61-1426)
I _{max} , о.е. × 10 ³	0,07 (0,059-0,081)	0,092 (0,067-0,417); p ₁ = 0,008	0,06 (0,051-0,093)	0,1 (0,072-0,434)
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	0,222 (0,146-0,258)	0,28 (0,18-0,594) p ₁ = 0,041	0,148 (0,115-0,260) p ₂ = 0,006	0,313 (0,182-0,367); p ₃ = 0,025
ИА	1 (0,86-1,1)	0,98 (0,86-1,13)	1,09 (0,98-1,19)	1,02 (0,67-1,11)
Первые сутки после КШ				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	141 (0-738)	267 (0-1120)	159 (90-2189)	141 (51-976)
I _{max} , о.е. × 10 ³	0,077 (0,057-0,085)	0,11 (0,069-0,33); p ₁ = 0,012	0,072 (0,049-0,088)	0,093 (0,084-0,185)
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	0,226 (0,11-0,287)	0,262 (0,165-0,763); p ₁ = 0,043	0,21 (0,085-0,329)	0,34 (0,299-0,445); p ₁ = 0,015
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	95 (0-637)	533 (71-1653); p ₁ = 0,046	89 (0-1514)	71 (0-266)

$I_{\max}$, о.е. $\times 10^3$	0,07 (0,059-0,081)	0,096 (0,067-0,3); $p_1 = 0,011$	0,077 (0,053-0,103)	0,083 (0,078-0,293); $p_1 = 0,024$
S , о.е. $\times$ сек. $\times 10^6$	0,222 (0,146-0,258)	0,237 (0,138-0,61); $p_4 = 0,014$	0,17 (0,114-0,234)	0,326 (0,155-0,36)
ИА	1 (0,86-1,1)	0,96 (0,83-1,1)	0,96 (0,84-1,17)	0,99 (0,81-1,19)
8–10 сутки после КШ на фоне терапии АСК				
Спонтанная хемилюминесценция				
$T_{\max}$, сек.	141 (0-738)	238 (26-1484); $p_4 = 0,046$	382 (0-1018)	71 (0-699)
$I_{\max}$, о.е. $\times 10^3$	0,077 (0,057-0,085)	0,11 (0,079-1,1); $p_1 = 0,001$	0,06 (0,056-0,125)	0,135 (0,081-0,157); $p_1 = 0,035$
S , о.е. $\times$ сек. $\times 10^6$	0,226 (0,11-0,287)	0,38 (0,236-1,88); $p_1 < 0,001$; $p_4 = 0,041$	0,19 (0,17-0,34)	0,304 (0,17-0,388)
Индукцированная хемилюминесценция				
$T_{\max}$, сек.	95 (0-637)	564 (85-1902); $p_1 = 0,01$	355 (71-2007)	36 (0-468); $p_2 = 0,006$
$I_{\max}$, о.е. $\times 10^3$	0,07 (0,059-0,081)	0,1 (0,08-1,23); $p_1 < 0,001$	0,062 (0,048-0,107); $p_2 = 0,006$	0,118 (0,077-0,135); $p_1 = 0,041$
S , о.е. $\times$ сек. $\times 10^6$	0,222 (0,146-0,258)	0,34 (0,15-2,04); $p_1 = 0,038$	0,19 (0,103-0,383)	0,247 (0,129-0,36)
ИА	1 (0,86-1,1)	0,88 (0,56-1,42)	0,92 (0,5-1,06)	0,83 (0,55-1,26)

Обсуждение

В литературе встречаются исследования, согласующиеся с полученными нами данными по вариабельности чувствительности тромбоцитов к АСК, в которых такой феномен связывают с условиями искусственного кровообращения, назначением дополнительных лекарственных препаратов в послеоперационном периоде, почечной дисфункцией, сниженной биодоступностью кишечнорастворимой формы АСК, воспалительным ответом и т.д. Так, например, антиагрегантное действие АСК может быть сведено к нулю приемом селективных нестероидных противовоспалительных препаратов за счет подавления продукции простагличина и за счет конкуренции с АСК за связывание с активным центром ЦОГ-1 [14]. Также в послеоперационном периоде аортокоронарного шунтирования наблюдается снижение эффекта АСК на тромбоциты, а именно: чувствительные до операции пациенты становятся резистентными сразу после нее, и только к 10 дню после операции возвращается восприимчивость к АСК, что может быть связано с индуцибельной изоформой ЦОГ в тромбоцитах, увеличивающейся после операции, а также повышенным оборотом тромбоцитов после применения аппарата искусственного кровообращения и воспалением [15]. При этом отсутствие

реакции на АСК чаще встречается в периоперационном периоде и при тяжелых иммуновоспалительных заболеваниях [16, 17]. Резистентность к АСК может являться отражением замедленного и сниженного всасывания лекарственного средства при приеме кишечнорастворимой формы (а также уменьшение биодоступности у лиц с сахарным диабетом и с избыточной массой тела за счет увеличения объема распределения препарата), что нивелируется при использовании аспирина немедленного высвобождения [18, 19]. Все эти триггерные факторы носят временный характер, соответственно, их исчезновение может вернуть чувствительность тромбоцитов к АСК [20].

У чАСК активация тромбоцитов приводит к выделению CD40L, что вызывает образование хемоаттрактантов, дополнительно увеличивающих экспрессию молекул клеточной адгезии, высвобождение миелопероксидазы и экстравазацию нейтрофилов, что сказывается на повышенной продукции клетками АФК, полученной в нашем исследовании [21, 22, 23]. Контакты клеток в очаге между собой (тромбоциты, эндотелиальные клетки, клетки лейкоцитарного ряда) приводят к дополнительной стимуляции, в результате чего в 1 сутки после КШ тромбоциты функционально и метаболически истощены в индуцированном

Таблица 4. Хемилюминесцентная активность нейтрофилов с люцигенином у пациентов с ИБС (Me (C₂₅–C₇₅)). p₁ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями контрольной группы; p₂ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями ЧАСК пациентов с ИБС; p₃ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями рАСК пациентов с ИБС (монотерапия АСК); p₄ — уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями периода наблюдения до КШ у пациентов с ИБС. При p < 0,05 отличия между группами считались значимыми

Table 4. Chemiluminescent activity of neutrophils with lucigenin in patients with coronary artery disease (Me (C₂₅–C₇₅)). p₁ is the level of statistical significance of differences in comparison with the indicators of the control group. p₂ is the level of statistical significance of differences in comparison with the hASA indices in patients with coronary artery disease. p₃ is the level of statistical significance of differences compared with the rASA parameters in patients with coronary artery disease (ASA monotherapy). p₄ is the level of statistical significance of differences compared with the corresponding indicators of the observation period before CABG in patients with coronary artery disease. At p < 0.05, differences between groups were considered significant

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

Imax, о.е. $\times 10^3$	5,55 (3,03-10,29)	15,08 (7,9-23,02); $p_1 < 0,001$	3,42 (3,18-14,1); $p_2 = 0,038$	9,88 (4,36-17,93)
S, о.е. $\times$ сек. $\times 10^6$	13,77 (5,75-25,22)	37,84 (20,33-65,9); $p_1 < 0,001$	11,48 (8,98-36,78); $p_2 = 0,022$	31,91 (15,31-66,24)
ИА	2,39 (1,6-3,39)	2,18 (1,38-3,42)	2,54 (2-3,86)	2,45 (0,98-3,31)
8–10 сутки после КШ на фоне терапии АСК				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	1344 (837-1731)	1321 (1147-1816)	1221 (956-2130)	1377 (1100-1695)
Imax, о.е. $\times 10^3$	2,3 (1,12-4,36)	3,55 (2,23-9,65); $p_1 = 0,035$	5,24 (1,43-9,38)	9,14 (1,64-15,6)
S, о.е. $\times$ сек. $\times 10^6$	5,39 (3,19-13,68)	11,8 (6,52-26,63); $p_1 = 0,018$	19,9 (4,95-30,27)	22,61 (5,32-49,57)
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	996 (622-1447)	1271 (1066-1509); $p_1 = 0,011$; $p_4 = 0,026$	1120 (956-1412); $p_4 = 0,037$	1214 (974-1742)
Imax, о.е. $\times 10^3$	5,55 (3,03-10,29)	9,45 (4,85-22,3); $p_1 = 0,027$	4,7 (1,35-12,59)	16,2 (5,88-36,5); $p_1 = 0,039$
S, о.е. $\times$ сек. $\times 10^6$	13,77 (5,75-25,22)	27,44 (16,37-53,01); $p_1 = 0,01$	14,77 (4,06-35,53)	47,53 (17,85-153,5); $p_1 = 0,01$; $p_3 = 0,032$
ИА	2,39 (1,6-3,39)	2,01 (1,2-3,67)	1,11 (0,65-2,63); $p_4 = 0,049$	2 (0,82-13,8)

тесте in vitro с люминолом и, наоборот, активированы в спонтанном тесте с люцигенином [24]. 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 сутки, тогда как на 8–10 сутки (данный период совпадает со средней продолжительностью жизни тромбоцитов) активность тромбоцитов 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.

В группе рАСК (терапия АСК) уровень и интенсивность продукции всех АФК тромбоцитами и нейтрофилами не отличается от контрольной группы практически по всем показателям, а в группе рАСК (ДАТ), наоборот, продукция АФК нейтрофилами и тромбоцитами выше, на уровне чАСК.

Полученные нами данные по продукции АФК могут указывать на то, что рАСК тромбоциты инертны не только по отношению к самому лекарственному препарату, но и к другим факторам (не эндотелиальная поверхность контуров аппа-

рата искусственного кровообращения, активация окружающими нейтрофилами и др.), так как на продукцию АФК тромбоцитами у таких пациентов не влияет операция КШ, в отличие от чАСК. Но при полном нарушении межклеточных контактов у рАСК (терапия АСК), проявляющемся в продукции тромбоцитами и нейтрофилами АФК на уровне контрольной группы, у рАСК (ДАТ) может сохраняться межклеточное взаимодействие на уровне микровезикул, в которых нейтрофилы способны передавать арахидоновую кислоту тромбоцитам, вследствие чего у них наблюдается повышенная продукция АФК тромбоцитами и нейтрофилами. Это может быть связано с продолжающимся метаболизмом арахидоновой кислоты ввиду повышенного количества субстрата и резистентности ЦОГ-1 к АСК, а основной антиагрегантный эффект, таким образом, у данной группы пациентов с ИБС достигается, очевидно, благодаря терапии клопидогрелом.

Вышеизложенный предполагаемый механизм межклеточного взаимодействия подтверждается данными корреляционного анализа между показателями ХЛ тромбоцитов и нейтрофилов. Больше всего положительных связей выявлено среди чАСК до операции и на первые сутки после КШ, что сви-

Таблица 5. Хемилюминесцентная активность нейтрофилов с люминолом у пациентов с ИБС (Me (C₂₅–C₇₅)). p₁ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями контрольной группы; p₂ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями чАСК пациентов с ИБС; p₃ — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями рАСК пациентов с ИБС (монотерапия АСК); p₄ — уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями периода наблюдения до КШ у пациентов с ИБС.

При p < 0,05 отличия между группами считались значимыми

Table 5. Chemiluminescent activity of neutrophils with luminol in patients with coronary artery disease (Me (C₂₅–C₇₅)). p₁ is the level of statistical significance of differences in comparison with the indicators of the control group. p₂ is the level of statistical significance of differences in comparison with the hASA indices in patients with coronary artery disease. p₃ is the level of statistical significance of differences compared with the rASA parameters in patients with coronary artery disease (ASA monotherapy). p₄ is the level of statistical significance of differences compared with the corresponding indicators of the observation period before CABG in patients with coronary artery disease. At p < 0.05, differences between groups were considered significant

Показатели	Контроль (n = 36) 1	чАСК (n = 71) 2	рАСК (монотерапия АСК) (n = 18) 3	рАСК (ДАТ) (n = 15) 4
До КШ				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	354 (226-1510)	642 (208-1565)	255 (93-1417)	414 (172-964)
Imax, о.е. × 10 ³	17,21 (4,3-33,07)	13,43 (4,33-30,66)	6,87 (3,39-21,9)	17,1 (9,16-47,1)
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	39,26 (9,74-77,93)	32,26 (13,19-79-76)	19,95 (4,64-33,06)	45,57 (22,79-80,1)
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	526 (268-977)	904 (660-1382); p ₁ = 0,002	735 (489-1107)	719 (391-845)
Imax, о.е. × 10 ³	34,29 (13,04-58,47)	48,72 (13,3-94,84)	30,78 (8,7-65,04)	60,17 (14,63-108,93)
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	81,17 (26,64-157,5)	141,55 (40,32-255)	79,67 (16,64-135,55)	181,5 (30,93-373)
ИА	2,29 (1,61-2,66)	2,58 (1,86-4,33); p ₁ = 0,044	3,4 (2,3-6,73); p ₁ = 0,019	2,72 (1,46-8,22)
Первые сутки после КШ				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	354 (226-1510)	888 (255-1510)	662 (204-1624)	285 (95-1477)
Imax, о.е. × 10 ³	17,21 (4,3-33,07)	30,25 (14,69-41,68); p ₁ = 0,027; p ₄ = 0,01	10,13 (6,33-18,67); p ₂ = 0,003	43,1 (10,55-76,88)
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	39,26 (9,74-77,93)	65,31 (37,03-103,3); p ₁ = 0,02; p ₄ = 0,006	21,33 (6,79-38,73); p ₂ = 0,001	73,5 (27,13-285,4)
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	526 (268-977)	755 (478-1169)	662 (611-1276)	888 (764-1018)
Imax, о.е. × 10 ³	34,29 (13,04-58,47)	98,74 (31,02-176,5); p ₁ < 0,001; p ₄ < 0,001	47,39 (15-88,8)	82,57 (46,7-144,5); p ₁ = 0,027
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	81,17 (26,64-157,5)	250,1 (83,81-439,9); p ₁ < 0,001; p ₄ < 0,001	132,4 (38,24-178,3)	266,1 (97,79-430,4)
ИА	2,29 (1,61-2,66)	2,77 (1,68-4,93)	4,6 (2,1-6,2); p ₁ = 0,029	3,02 (1,69-5,44)

8–10 сутки после КШ на фоне терапии АСК				
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	354 (226-1510)	788 (253-1264)	267 (203-1816)	1801 (1106-2350); p ₁ = 0,015; p ₂ = 0,01; p ₃ = 0,032
I _{max} , о.е. × 10 ³	17,21 (4,3-33,07)	16,5 (7,5-37,6)	16,5 (4,8-36,3)	27,87 (11,98-65,86)
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	39,26 (9,74-77,93)	36,82 (21,55-94,72)	23,91 (14,59-100,7)	85,18 (45,96-146,7)
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	526 (268-977)	895 (695-1139); p ₁ = 0,009	621 (444-1271)	1165 (755-1384); p ₁ = 0,021; p ₃ = 0,04; p ₄ = 0,043
I _{max} , о.е. × 10 ³	34,29 (13,04-58,47)	52,64 (14,29-150,7)	52,05 (34,16-92,16)	66,97 (42,9-145,9); p ₁ = 0,042; p ₄ = 0,043
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	81,17 (26,64-157,5)	142,3 (37,8-390,15)	132,2 (58,18-232,1)	178,7 (122,83-337,65); p ₁ = 0,036
ИА	2,29 (1,61-2,66)	2,42 (1,72-4,32)	3,93 (1,31-4,94)	2,3 (1,55-3,72)

Таблица 6. Корреляция между показателями хемилюминесценции нейтрофилов и тромбоцитов с люцигенином в группе чувствительных к АСК пациентов с ИБС (n = 71)

Table 6. Correlation between chemiluminescence indices of neutrophils and platelets with lucigenin in the group of ASA-sensitive patients with coronary artery disease (n = 71)

Показатель		Коэффициент корреляции (r)	Уровень значимости (p)
До КШ			
I _{max}	Спонтанная ХЛ	0,4	0,008
	Индукцированная ХЛ	0,34	0,008
S	Спонтанная ХЛ	0,27	0,036
	Индукцированная ХЛ	0,34	0,008
Первые сутки после КШ			
I _{max}	Спонтанная ХЛ	0,4	0,003
	Индукцированная ХЛ	0,44	0,002
S	Спонтанная ХЛ	0,43	0,002
	Индукцированная ХЛ	0,41	0,004

детельствует о налаженном контакте тромбоцитов и нейтрофилов, когда высокая активность по синтезу АФК одних клеток стимулирует синтез АФК другими клетками, а антиромбоцитарные препараты приводят к разрушению таких связей ввиду чувствительности клеток к терапии. У группы рАСК (ДАТ), наоборот, отсутствуют какие-либо корреляции, что свидетельствует о нарушении контактов между нейтрофилами и тромбоцитами на уров-

не сигнального влияния АФК. Наличие же положительных связей в группе рАСК (терапия АСК) между показателями ХЛ по продукции супероксид анион-радикала на первые и 8–10 сутки после КШ может быть связано со стабильной, не меняющейся во времени продукцией АФК по сравнению с чАСК. При этом активность ферментов по наработке АФК остается одинаково низкой и в тромбоцитах, и в нейтрофилах из-за рефрактерности клеток к акти-

Таблица 7. Корреляция между показателями хемилюминесценции нейтрофилов и тромбоцитов с люцигенином в группе резистентных к АСК пациентов с ИБС на монотерапии АСК (n = 18)

Table 7. Correlation between the indices of chemiluminescence of neutrophils and platelets with lucigenin in the group of ASA-resistant patients with coronary artery disease on ASA monotherapy (n = 18)

Показатель		Коэффициент корреляции (r)	Уровень значимости (p)
Первые сутки после КШ			
Imax	Спонтанная ХЛ	0,6	0,03
	АДФ-индуцированная ХЛ	0,68	0,01
ИА		0,64	0,019
8–10 сутки после КШ			
Imax	АДФ-индуцированная ХЛ	0,64	0,023
S	АДФ-индуцированная ХЛ	0,78	0,003



Рис. 1. Взаимодействие тромбоцитов и нейтрофилов в формировании резистентности к АСК у пациентов с ИБС после КШ

Примечание: АК — арахидоновая кислота, АСК — ацетилсалициловая кислота, АФК — активные формы кислорода, МВ — микровезикулы, ЦОГ-1 — циклооксигеназа 1, чАСК — чувствительные к АСК пациенты с ИБС, рАСК-резистентные к АСК пациенты с ИБС

Figure 1. Interaction of platelets and neutrophils during of the resistance formation to ASA in patients with CHD after CABG

вирующим агентам и дезагрегантам, что и проявляется в корреляционных связях.

Одной из причин недостаточного ответа на антиагрегантные препараты может быть налаженное или нарушенное межклеточное взаимодействие между тромбоцитами и нейтрофилами. Предполагается, что наличие или отсутствие таких связей на уровне рецепторов и/или микровезикул может приводить к возникновению феномена резистентности тромбоцитов к АСК у пациентов с ИБС, который в ряде случаев можно преодолеть путем

назначения ДАТ вместо монотерапии АСК (рис. 1). Ведь благодаря такой терапии блокируются сразу 2 пути активации тромбоцитов, что может компенсироваться усиленным их контактом с нейтрофилами 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 клопидогрелом у больных с ИБС [25].

Таким образом, выявлены особенности в продукции АФК тромбоцитами и нейтрофилами у пациентов с ИБС в зависимости от их чувствительности к АСК и ДАТ (АСК + клопидогрел). Дальнейшее изучение влияния межклеточных контактов на резистентность тромбоцитов к АСК может помочь в поиске новых точек приложения для преодоления данного явления.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Gillette M, Morneau K, Hoang V, et al. Antiplatelet Management for Coronary Heart Disease: Advances and Challenges. *Curr Atheroscler Rep*. 2016; 18(6):35. DOI: 10.1007/s11883-016-0581-6.
- Parker WA, Storey RF. Long-term antiplatelet therapy following myocardial infarction: implications of PEGASUS-TIMI 54. *Heart*. 2016; 102(10): 783–789. DOI: 10.1136/heartjnl-2015-307858.
- Capodanno D, Angiolillo DJ. Antithrombotic Therapy for Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk Mitigation in Patients With Coronary Artery Disease and Diabetes Mellitus. *Circulation*. 2020; 142(22):2172–2188. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.045465.
- Bij de Weg JM, Abheiden CNH, Fuijkschot WW, et al. Resistance of aspirin during and after pregnancy: A longitudinal cohort study. *Pregnancy Hypertens*. 2020; 19:25–30. DOI: 10.1016/j.preghy.2019.11.008.
- Yassin AS, Abubakar H, Mishra T, et al. Aspirin Resistance: Cardiovascular Risk Game Changer. *Am J Ther*. 2019; 26(5):593–599. DOI: 10.1097/MJT.0000000000000780.
- Floyd CN, Ferro A. Antiplatelet drug resistance: Molecular insights and clinical implications. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015; 120:21–27. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2015.03.011.
- Van Oosterom N, Barras M, Cottrell N, et al. Platelet function assays for the diagnosis of aspirin resistance. *Platelets*. 2021; 24:1–10. DOI: 10.1080/09537104.2021.1942816.
- Soehnlein O. Decision shaping neutrophil-platelet interplay in inflammation: From physiology to intervention. *Eur J Clin Invest*. 2018 Feb; 48 (2). DOI: 10.1111/eci.12871.
- Dzhatdoeva AA, Proskurnina EV, Nesterova AM. Mitochondria as sources of superoxide radical anion in platelets. *Biologicheskie membrany*. 2017; 34 (6): 116–123. In Russian [Джатдоева, А.А., Проскурнина Е.В., Нестерова А.М. и др. Митохондрии как источники супероксидного анион-радикала в тромбоцитах. Биологические мембраны. 2017; 34(6):116–123]. DOI: 10.7868/S0233475517060056.
- Grinshtein YuI, Filonenko IV, Savchenko AA, et al. A method for diagnosing acetylsalicylic acid resistance. Patient on the application № 2009131242/15, 17.08.2009. In Russian [Гринштейн Ю.И., Филоненко И.В., Савченко А.А. и др. Способ диагностики резистентности к ацетилсалициловой кислоте. Патент по заявке № 2009131242/15 от 17.08.2009].
- Savchenko EA, Savchenko AA, Gerasimchuk AN, et al. Assessment of the metabolic status of platelets in health and in ischemic heart disease. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2006; 5:33–36. In Russian [Савченко Е.А., Савченко А.А., Герасимчук А.Н. и др. Оценка метаболического статуса тромбоцитов в норме и при ишемической болезни сердца. Клиническая лабораторная диагностика. 2006; 5:33–36].
- Savchenko AA, Goncharov MD, Grinsthein YI, et al. Chemiluminescent Analysis of Reactive Oxygen Species Synthesis by Platelets from Patients with Coronary Heart Disease. *Bull Exp Biol Med*. 2020; 169(4):535–538. DOI: 10.1007/s10517-020-04924-4.
- Savchenko AA, Zdzitoveckij DE, Borisov AG, et al. Chemiluminescent and enzymatic activity of neutrophilic granulocytes in patients with widespread purulent peritonitis, depending on the outcome of the disease. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2014; 69(5–6):23–28. In Russian [Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. и др. Хемилюминесцентная и ферментативная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания. Вестник РАМН. 2014; 69(5–6):23–28].
- Zapovalnaya OE, Tripolka SA. Aspirin resistance and the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in cardiac practice. *Mir Mediciny i Biologii*. 2012; 2(33):35–39. In Russian [Запоровальная О.Е., Триполка С.А. Аспиринорезистентность и применение нестероидных противовоспалительных препаратов в кардиологической практике. Світ медицини та біології. 2012; 2(33):35–39].
- Wand S, Adam EH, Wetz AJ, et al. The Prevalence and Clinical Relevance of ASA Nonresponse After Cardiac Surgery: A Prospective Bicentric Study. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018; 24(1):179–185. DOI: 10.1177/1076029617693939.
- Modica A, Karlsson F, Moee T. Platelet aggregation and aspirin non-responsiveness increase when an acute coronary syndrome is complicated by an infection. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007; 5(3):507–511. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02378.x.
- Boucher AA, Francisco BJ, Pfeiffer A, et al. Urinary 11-dehydrothromboxane B2 aspirin efficacy testing is sensitive to perioperative inflammation in pediatric solid-organ transplant patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2022; 69(2):e29413. DOI: 10.1002/pbc.29413.
- Grosser T, Fries S, Lawson JA, et al. Drug resistance and pseudoresistance: an unintended consequence of enteric coating aspirin. *Circulation*. 2013; 127(3):377–385. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.117283.
- Bhatt DL, Grosser T, Dong JF, et al. Enteric Coating and Aspirin Nonresponsiveness in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 69(6):603–612. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.11.050.
- Grinshtein YI, Savchenko AA, Kosinova AA, et al. Resistance to Acetylsalicylic Acid in Patients with Coronary Heart Disease Is the Result of Metabolic Activity of Platelets. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020; 13(8):178. DOI: 10.3390/ph13080178.
- Rahman M, Zhang S, Chew M, et al. Platelet-derived CD40L (CD154) mediates neutrophil upregulation of Mac-1 and recruitment in septic lung injury. *Ann Surg*. 2009; 250(5):783–790. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181bd95b7.

22. Rahman M, Roller J, Zhang S, et al. Metalloproteinases regulate CD40L shedding from platelets and pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis. *Inflamm Res*. 2012; 61(6):571–579. DOI: 10.1007/s00011-012-0446-6.

23. Maugeri N, Rovere-Querini P, Baldini M, et al. Oxidative stress elicits platelet/leukocyte inflammatory interactions via HMGB1: a candidate for microvessel injury in systemic sclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(7):1060–1074. DOI: 10.1089/ars.2013.5298.

24. Schrottmaier WC, Mussbacher M, Salzmann M, et al. Platelet-leukocyte interplay during vascular disease. *Atherosclerosis*. 2020; 307:109–120. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.04.018.

25. Wang XL, Deng HF, Li T, et al. Clopidogrel reduces lipopolysaccharide-induced inflammation and neutrophil-platelet aggregates in an experimental endotoxemic model. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019; 33(4):e22279. DOI: 10.1002/jbt.22279.

Информация об авторах:

Гончаров Максим Дмитриевич, соискатель, кафедра терапии Института последипломного образования, КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, врач лабораторной диагностики, Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии Минздрава России г. Красноярска;

Гринштейн Юрий Исаевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой терапии Института последипломного образования, КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого;

Савченко Андрей Анатольевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии, КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН».

Author information:

Maxim D. Goncharov, MD Student, Department of Therapy, Krasnoyarsk State Medical University; Doctor of Laboratory Diagnosis, Federal Center of Cardiovascular Surgery;

Yury I. Grinshtein, MD, PhD, professor, Head of Chair of Therapy, Krasnoyarsk State Medical University;

Andrei A. Savchenko, MD, professor, Head of the Department of Physiology, Krasnoyarsk State Medical University, Head of laboratory of the cellular-molecular physiology and pathology, Research Institute for Medical Problems in the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the RAS.