ՀԱՅԿԱԿԱՆ ԽՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

Փորձար. և կլինիկ. բժշկություն

т. XXIX, №4, 1989

Экспер. и клинич. медицина

УДК 616.155.25—076.3:616.133.33—004.6

К. С. ТУМАСЯН, С. Э. АКОПОВ, Э. С. ГАБРИЕЛЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ТРОМБОЦИТАРНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРОПРАНОЛОЛА У БОЛЬНЫХ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ МОЗГОВЫХ СОСУДОВ

Изучены механизмы изменений функционального состояния тромбоцитов и их чувствительность к пропранололу у больных атеросклерозом. Выявлено изменение реактивности тромбоцитов к пропранололу в связи с их морфофункциональной организацией.

Применение β-адреноблокаторов, в частности пропранолола, в терапии больных сердечно-сосудистыми заболеваниями в существенной степени связано со способностью этих препаратов подавлять агрегацию и секрецию тромбоцитов [4, 8]. Однако анализ значения β-адреноблокаторов в регуляции тромбоцитарных функций в патологии требует учета того обстоятельства, что функциональное состояние тромбоцитов больных сердечно-сосудистыми заболеваниями претерпевает значительные изменения, касающиеся как их способности к активации и агрегации, так и чувствительности к различным физиологическим и фармакологическим агентам [2]. В связи с этим требуется специальное исследование изменений характера и механизмов действия препаратов на тромбоциты больных людей. Однако в отношении β-адреноблокаторов подобного исследования не проводилось.

Целью настоящей работы явилось изучение некоторых механизмов изменений функционального состояния тромбоцитов и их чувствительности к пропранололу у больных атеросклерозом.

Обследовано 22 больных с атеросклерозом мозговых сосудов, проявляющимся в виде дисциркуляторной энцефалопатии I—II стадии. Контролем служила группа из 22 практически здоровых доноров. Возраст обследуемых колебался от 30 до 65 лет.

Кровь забиралась из локтевой вены и стабилизировалась цитратом натрия (1:9). Агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме (БТП) исследовали на агрегометре «Payton» (США) с использованием в качестве агрегантов АДФ (2×10^{-4} М) и адреналина (1×10^{-4} М). Содержание тромбоцитов в пробе составляло 200 тыс. в 1 *мкл*. Исследование влияния на агрегацию пропранолола проводили при его добавлении в пробу в интервале концентраций $10^{-6} — 10^{-4}$ М.

Исследование транспорта Ca^{2+} в тромбоцитах проводили на суспензии отмытых клеток. Отмывку тромбоцитов проводили дифференциальным центрифугированием, повреждение клеток предупреждали добавлением апиразы и $ПГЕ_1$ [5]. Транспорт Ca^{2+} в тромбоцитах исследовали с использованием флуоресцирующего кальциевого хелатора квин-2АМ [5]. Исследование динамики мембраносвязанного Ca^{2+}

в тромбоцитах проводилось с использованием хлортетрациклина [8]. Микровязкость тромбоцитарных мембран характеризовали по отношению флуоресценции мономеров и эксимеров пирена (Fм/Fэ), причем раздельно регистрировалась флуоресценция всего мембраносвязанного пирена (при λ возб.=334 *нм*) и пирена, находящегося в прибелковых областях мембраны (при λ возб. = 280 *нм*) [1, 3]. Исследование флуоресценции проводилось на компьютеризованном спектрофотофлуориметре RF-500 «Shimadzu» (Япония).

Исследование агрегации тромбоцитов у больных дисциркуляторной энцефалопатией показало, что она варьирует в широких пределах, но в целом выше, чем в контроле. У здоровых лиц АДФ-и адреналининдуцированная агрегация составила $46{,}7 \pm 4{,}4$ и $37{,}1 \pm 7{,}2\%$, а у больных—$60{,}8 \pm 3{,}8$ и $55{,}5 \pm 5{,}3\%$ соответственно. Это еще раз подтверждает необходимость применения у этих больных лекарственных средств, понижающих способность кровяных пластинок к агрегации. Однако анализ влияния пропранолола на тромбоциты здоровых и больных людей показал, что эффективность его воздействия в последнем случае понижается. Расчет величины EC_{50} показал, что для АДФ-индуцированной агрегации она составила у здоровых лиц $(5{,}2 \pm \pm 0{,}6)) \times 10^{-5}$ М, у больных—$(9{,}7 \pm 0{,}9) \times 10^{-5}$ М ($p < 0{,}05$). Аналогичным образом EC_{50} возрастала у больных атеросклерозом и в случае адреналининдуцированной агрегации — $(1{,}3 \pm 0{,}2) \times 10^{-5}$ М и $(7{,}5 \pm 0{,}4) \times 10^{-5}$ М соответственно ($p < 0{,}001$). При этом важно отметить, что изменения чувствительности тромбоцитов к пропранололу были неодинаковы у различных больных. В табл. 1 приведено распределение обследованных по степеням антиагрегантного эффекта пропранолола, из которого следует, что среди больных возрастает количество лиц с более или менее выраженным ослаблением антиагрегантной активности пропранолола. Ясно, что терапевтическая эффективность применения данного препарата у этих больных может понижаться.

Таким образом, у больных с церебральным атеросклерозом наряду с увеличением агрегируемости тромбоцитов наблюдается понижение их чувствительности к β-адреноблокаторам. Закономерно встает вопрос о причинах подобного явления. Поскольку ранее было показано значение изменения микровязкости мембран в механизмах изменений тромбоцитарных функций и влияние на них пропранолола, было проведено сравнение микровязкости мембран тромбоцитов здоровых лиц и больных атеросклеротической энцефалопатией. Как видно из табл. 2, в последнем случае возрастает отношение Fм/Fэ как для всего мембраносвязанного пирена, так и для его прибелковой фракции. Это означает, что в патологии имеет место увеличение микровязкости тромбоцитарных мембран, возможно, определяющее изменение реактивности тромбоцитов.

Последующий анализ показал, что увеличение микровязкости тромбоцитарных мембран сопровождается усилением поступления Ca^{2+} в их цитоплазму (табл. 2). Это явление может определять раз-

витие тромбоцитарной гиперагрегируемости, поскольку именно с увеличением внутритромбоцитарной концентрации Ca^{2+} связывают процессы их активации [7]. Представилось вероятным, что изменение чувствительности тромбоцитов к пропранололу в той или иной степени

Таблица 1

Влияние пропранолола (10^{-4} М) на агрегацию тромбоцитов здоровых лиц и больных атеросклеротической энцефалопатией

Группа обследованных	Агрегант	Степень антиагрегантного эффекта пропранолола в % от исходной величины			
		>90	90–50	50–20	<20
Здоровые лица, п=22	АДФ	27,0	73,0	0	0
	адреналин	91,0	6,0	0	0
Больные атеросклеротической энцефалопатией, п=20	АДФ	5,0	60,0	25,0	5,0
	адреналин	65,0	30,0	5,0	0

Примечание. В графах приведен процент обследованных с соответствующим уровнем антиагрегантной активности пропранолола.

Таблица 2

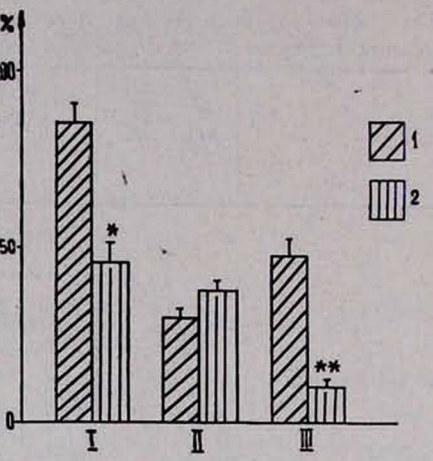
Транспорт Ca^{2+} и эксимеризация пирена в тромбоцитах здоровых лиц и больных атеросклеротической энцефалопатией

Группа обследованных	Концентрация Ca^{2+} в тромбоцитах, *ммоль*		Fм/Fэ пирена в тромб.	
	базальный уровень	после активации	λ возб. 280нм	λ возб. 334нм
Больные атеросклеротической энцефалопатией, п=20	75,1±2,9	867,1*±106,6	2,27*±0,31	1,91*±0,17
Здоровые лица, п=22	72,3±3,0	415,7 ± 97,0	1,47 ±0,2	1,30±0,09

Примечание. Звездочкой отмечены варианты, достоверно отличающиеся от контрольных цифр.

связано с изменением транспорта Ca^{2+}. Поэтому был проведен анализ его влияния на этот процесс у больных атеросклеротической энцефалопатией. Оказалось, что в контроле прирост концентрации Ca^{2+} в тромбоцитах в присутствии пропранолола составляет 28,2±6,7% от максимальной, у больных же—37,4±7,9%. Однако это различие является недостоверным, а кроме того, не было обнаружено строгого соответствия между изменением влияния пропранолола на прирост внутритромбоцитарного Ca^{2+} и агрегацию клеток. Гораздо более тесной оказалась эта связь в отношении динамики изменений концентрации Ca^{2+}, связанного с мембраной тромбоцитов. Воздействие индуктора агрегации приводит к уменьшению флуоресценции хлортетрациклина, связанного с мобилизацией Ca^{2+} с внутренней поверхностью плазмалеммы. При этом оказалось, что пропранолол резко подавляет этот процесс, причем в концентрации на порядок меньше, чем он

влияет на поток Ca^{2+} в тромбоциты извне. Как видно на рисунке, эффект пропранолола на уменьшение флуоресценции хлортетрациклина под действием сочетания АДФ с адреналином у больных резко понижается, что соответствует уменьшению его антиагрегантного эф-



Изменение влияния пропранолола на функциональное состояние тромбоцитов здоровых лиц (1) и больных атеросклеротической энцефалопатией (2). I. Антиагрегантный эффект пропранолола. II. Изменение относительного прироста концентрации Ca^{2+} в цитоплазме тромбоцитов. III. Степень уменьшения пропранололом падения интенсивности флуоресценции хлортетрациклина в кровяных пластинках. По оси ординат—эффект в % от исходной величины.

фекта. Коэффициент корреляции между этими эффектами пропранолола составил 0,74, в отношении же его влияния на поток Ca^{2+} извне — только 0,31. Следовательно, можно предположить, что влияние пропранолола на функциональное состояние тромбоцитов связано с его способностью предотвращать мобилизацию Ca^{2+} с внутренней поверхностью тромбоцитарной мембраны. Именно нарушение этой способности пропранолола может объяснить изменение его тромбоцитарных эффектов в патологии.

Итак, тромбоциты больных церебральным атеросклерозом претерпевают мембранную перестройку, приводящую к изменениям Ca^{2+}-связывающей способности плазмалеммы, а это определяет сдвиги их реактивности. Однако анализ влияния пропранолола велся в БТП, а значит, изменения чувствительности тромбоцитов могли быть связаны и с воздействием сыворотки, в значительной степени модифицирующей функциональное состояние кровяных пластинок [2]. Чтобы оценить возможность подобного явления, было проведено исследование влияния сыворотки больных атеросклерозом на агрегацию тромбоцитов, транспорт Ca^{2+} в них и эффект пропранолола. Оказалось, что сыворотка больных стимулирует агрегацию инкубированных в ней тромбоцитов и усиливает поступление в них Ca^{2+} извне. Однако эффект пропранолола при этом существенно не изменялся. Следовательно, наблюдаемые в патологии изменения реактивности тромбоцитов

к пропранололу связаны в основном с изменением морфофункциональной организации самих клеток, что должно учитываться при проведении фармакотерапии тромбоцитарных дисфункций у больных атеросклерозом с применением β-адреноблокаторов.

Кафедра фармакологии Ереванского
медицинского института

Поступила 5/V 1988 г.

Կ. Ս. ԹՈՒՄԱՍՅԱՆ, Ս. Է. ՀԱԿՈԲՈՎ, Է. Ս. ԳԱԲՐԻԵԼՅԱՆ

ՊՐՈՊՐԱՆՈԼՈԼԻ ԹՐՈՄԲՈՑԻՏԱՐ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ ՈՒՂԵՂԱՑԻՆ ԱՆՈԹՆԵՐԻ ԱԹԵՐՈՍԿԼԵՐՈԶՈՎ ՀԻՎԱՆԴՆԵՐԻ ՄՈՏ

Աշխատանքում ներկայացված են փորձարարական հետազոտությունների արդյունքները աթերոսկլերոտիկ էնցեֆալոպաթիայով հիվանդների արյան թիթեղիկների ագրեգացիոն հատկության ուժեղացման վերաբերյալ։

Պարզվել է, որ արյան թիթեղիկների զգայունությունը հակաագրեգատային հատկությունով օժտված պրոպրանոլոլի հանդեպ իջել է, որը պայմանավորված է պլազմալեմայի Ca^{2+}—կապող հատկության փոփոխմամբ՝ կախված թրոմբոցիտների թաղանթային վերակառուցումից ուղեղային անոթների աթերոսկլերոզով հիվանդների մոտ։

K. S. TOUMASSIAN, S. E. AKOPOV, E. S. GABRIELIAN

THE INVESTIGATION OF PROPRANOLOL THROMBOCYTIC EFFECTS AT PATIENTS WITH CEREBROVASCULAR ATHEROSCLEROSIS

The mechanisms of the changes in the functional state of thrombocytes and their sensibility towards propranolol have been studied in patients with atherosclerosis. The changes of thrombocytes' reactivity towards propranolol, in connection with their morphofunctional organization are found out.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980.
2. *Габриелян Э. С., Акопов С. Э.* Клетки крови и кровообращение. Ереван, 1985.
3. *Окунь К. М., Калер Г. В., Волковец Т. М.* и др. Биохимия, 1986, 7, с. 1132.
4. *Потапова Г. Н., Попов Е. Г., Габбасов З. А.* и др. Кардиология, 1982, 3, с. 41.
5. *Hamberg M., Svensson J., Wakabajashi T., Sauelsson B.* Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1974, 71, 2, 345.
6. *Owen N., Le Breton C.* Amer. J. Physiol., 1931, 241, 4, 613.
7. *Tsien R., Pozzan T., Rink T.* J. Cell. Biol., 1982, 94, 2, 325.
8. *Vlachakis N., Aledort L.* Amer. J. Cardiol., 1980, 45, 2, 321.