

# МЕДИЦИНСКАЯ ЭКОЛОГИЯ

# MEDICAL ECOLOGY

УДК 57:[618.3:616-005.6]

## ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ АТФ И ДИАДЕНОЗИН ТЕТРАФОСФАТА НА АДФ-ИНДУЦИРОВАННУЮ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

А. В. БАКУНОВИЧ<sup>1)</sup>, А. И. ЗИНЧЕНКО<sup>1,2)</sup>, К. Я. БУЛАНОВА<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова,  
Белорусский государственный университет,  
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

<sup>2)</sup>Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси,  
ул. Академика В. Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

В экспериментах *in vitro* установлено достоверное повышение степени агрегации тромбоцитов беременных женщин с преэклампсией в ответ на действие АДФ по сравнению с физиологически протекающей беременностью. Показано, что диаденозин-5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-тетрафосфат и АТФ-Mg<sup>2+</sup> способны оказать ингибирующий эффект на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов при преэклампсии. Потенциальное преимущество использования Ar<sub>4</sub>A

### Образец цитирования:

Бакунович АВ, Зинченко АИ, Буланова КЯ. Особенности влияния АТФ и диаденозин тетрафосфата на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов при преэклампсии. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2019;4:71–79.

### For citation:

Bakunovich AV, Zinchenka AI, Bulanava KYa. Features of the ATP and diadenosine tetraphosphate effect on ADP-induced platelet aggregation at pre-eclampsia. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2019;4:71–79. Russian.

### Авторы:

**Андрей Валерьевич Бакунович** – старший преподаватель кафедры экологической химии и биохимии.

**Анатолий Иванович Зинченко** – член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, доктор биологических наук, профессор; заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии<sup>2)</sup>; профессор кафедры экологической химии и биохимии<sup>1)</sup>.

**Клавдия Яковлевна Буланова** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры экологической химии и биохимии.

### Author:

**Andrei V. Bakunovich**, senior lecturer at the department of ecological chemistry and biochemistry.

*andy.bakunovich@gmail.com*

**Anatoly I. Zinchenka**, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), full professor; head of the laboratory of molecular biotechnology<sup>b)</sup>; professor at the department of ecological chemistry and biochemistry<sup>a)</sup>.

*zinch@mbio.bas-net.by*

**Klavdiya Ya. Bulanava**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of ecological chemistry and biochemistry.

*bulanova\_home@tut.by*

и его производных в качестве терапевтических средств заключается в том, что они являются более эффективными ингибиторами агрегации вследствие синергического действия на P2Y<sub>1</sub> и P2Y<sub>12</sub> рецепторы тромбоцитов и более длительного периода полураспада в кровяном русле по сравнению с АТФ. Ap<sub>4</sub>A может быть рекомендован в качестве субстрата для разработки лекарственных средств, нацеленных на снижение повышенной функциональной активности тромбоцитов при преэклампсии.

**Ключевые слова:** преэклампсия; тромбоциты; агрегация; АДФ; АТФ; диаденозин тетрафосфат.

## FEATURES OF THE ATP AND DIADENOSINE TETRAPHOSPHATE EFFECT ON ADP-INDUCED PLATELET AGGREGATION AT PRE-ECLAMPSIA

A. V. BAKUNOVICH<sup>a</sup>, A. I. ZINCHENKO<sup>a, b</sup>, K. YA. BULANOVA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,  
23/1 Daïhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

<sup>b</sup>Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus,  
2 Academician V. F. Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus

Corresponding author: A. V. Bakunovich (andy.bakunovich@gmail.com)

*In vitro* experiments established significant increase in the aggregation degree of pregnant women platelets with pre-eclampsia in response to the action of ADP, compared with a physiological pregnancy. Experiments revealed that diadenosine-5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetraphosphate and ATP-Mg<sup>2+</sup> are able to exert an inhibitory effect on ADP-induced platelet aggregation during pre-eclampsia. The potential advantage of Ap<sub>4</sub>A and its derivatives as therapeutic agents is that they have a synergistic inhibitory effect on the P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> platelet receptors and have a longer half-life in the bloodstream compared to ATP. The research results suggest using Ap<sub>4</sub>A as a substrate for the development of drugs aimed at reducing the increased functional activity of platelets during pre-eclampsia.

**Key words:** pre-eclampsia; platelets; aggregation; ADP; ATP; diadenosine tetraphosphate.

### Введение

Проблема преэклампсии у беременных женщин до настоящего времени остается актуальной, что обусловлено не только риском развития осложнений для матери и плода [1], но и высокой частотой их встречаемости. Известно, что загрязнение окружающей среды негативно влияет на течение беременности, увеличивает риск развития патологии, особенно в загрязненных радионуклидами районах и техногенно-загрязненным атмосферным воздухом. Антропогенная нагрузка влечет за собой ухудшение здоровья населения. Экологические факторы риска в крупных промышленных центрах провоцируют повышение заболеваемости беременных, увеличивая вероятность развития осложнений у рожениц и плода. Комплексная техногенная нагрузка складывается из суммарного загрязнения атмосферного воздуха, питьевой воды, почвы и качества питания, что в совокупности приводит к угнетению компенсаторно-приспособительных возможностей женского организма к вынашиванию плода. Немаловажную роль играют и социально-экономические факторы, а также образ жизни беременных женщин. Все это приводит к развитию дезадаптации организма беременных, обусловленной преэклампсией.

Характерной особенностью для беременных женщин с преэклампсией умеренной и тяжелой степени является выраженная тромбоцитопения, сочетающаяся с анизоцитозом тромбоцитов и увеличением количества мегалотромбоцитов с повышенной функциональной активностью, в частности их адгезивно-агрегационной способностью [2].

Активация тромбоцитов, лимитирующая кровопотери организма, представляет собой один из жизненно-важных механизмов сохранения его функций. Однако ни сами тромбоциты, ни другие компоненты гемостаза не способны делать различий между травмами сосудов и другими причинами, приводящими к появлению в крови инициаторов агрегации. Ряд реакций гемостаза может инициироваться, например, в случаях дестабилизации стенок сосудов в результате их хронической дегенерации. Такие процессы могут осуществляться, в частности, в артериях при формировании атеросклеротических бляшек, ишемической болезни, гипертонии, токсикозах, возникающих также при беременности.

**Цель исследования:** изучить особенности АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов беременных женщин с преэклампсией, а также возможность применения солей АДФ и диаденозин-5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-тетрафосфата для коррекции повышенной тромбоцитарной активности.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования служила кровь беременных женщин с физиологически протекающей беременностью, составивших контрольную группу (32 пациентки) и беременных с диагнозом преэклампсии (32 пациентки) умеренной степени. Пациенты добровольно подтвердили свое согласие на участие в научном исследовании после того, как они были надлежащим образом проинформированы о целях, методах, ожидаемой пользе и возможном риске исследования. Забор крови проводили в клинических условиях при обязательном контроле отсутствия в течение месяца приема препаратов, влияющих на агрегацию тромбоцитов. Кровь стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия (9:1 по объему). Агрегацию тромбоцитов исследовали путем измерения светопропускания с применением компьютеризированного анализатора агрегации тромбоцитов AP2110 (ЗАО «СОЛАР»). Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) крови беременных женщин выделяли при комнатной температуре. ОТП получали центрифугированием цитратной крови при 1000 об/мин в течение 10 мин. Бестромбоцитарную плазму (БТП) получали центрифугированием крови при 3000 об/мин в течение 15 мин. Количество тромбоцитов в ОТП доводили до  $2 \cdot 10^8$  кл/мл разбавлением БТП. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ в концентрациях  $2,44 \cdot 10^{-7}$ - $2,44 \cdot 10^{-5}$ М. В качестве дезагреганта – Ар<sub>4</sub>А в концентрациях  $2,44 \cdot 10^{-7}$ - $2,44 \cdot 10^{-6}$ М, а также динатриевую и магниевую соли аденозинтрифосфата (АТФ) в концентрации  $7,32 \cdot 10^{-7}$ М.

Статистический анализ результатов проводился с помощью программы Statistica 10.0. Закон распределения экспериментальных данных оценивался по критерию Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения, достоверность различий оценивалась по t-критерию Стьюдента, а при непараметрическом распределении – U-теста Манна–Уитни. Сравнительный анализ эффективности дезагрегантов проводили с поправкой Тьюки (нормальное распределение) или критерия Краскела–Уоллиса (непараметрическое распределение). Различия рассматривались как статистически достоверные при уровне значимости  $P < 0,05$ . Результаты представлены в виде  $M \pm SD$  для нормального распределения экспериментальных данных и Me [P25–P75] для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения.

### Результаты исследования и их обсуждение

АДФ играет важную роль в гемостазе, процессе активации тромбоцитов и формировании тромба. Сам по себе АДФ является относительно слабым агонистом агрегации тромбоцитов, вызывающим обратимое изменение формы и слабую агрегацию, однако он является необходимым кофактором для нормальной активации кровяных пластинок такими более сильными агонистами, как тромбин, коллаген или тромбоксан А<sub>2</sub>.

На рис. 1 представлены особенности реакции тромбоцитов женщин с физиологически протекающей беременностью и беременных женщин с преэклампсией на различные концентрации АДФ. На высокие концентрации аденозиндифосфата ( $2,44 \cdot 10^{-5}$ М) тромбоциты женщин всех обследованных групп реагировали сходно-необратимой агрегацией. При снижении концентрации АДФ до  $2,44 \cdot 10^{-6}$ М реакция тромбоцитов уменьшилась, не проявляя особых различий в ответах кровяных пластинок беременных женщин исследуемых групп. При дальнейшем снижении на порядок концентрации АДФ до  $2,44 \cdot 10^{-7}$ М агрегация тромбоцитов проявлялась исключительно у беременных с преэклампсией. Так, степень и скорость агрегации при физиологической беременности находились в пределах  $0,8 \pm 0,69$  % и  $1,2$  [0,35–2,2] %/мин; тогда как при преэклампсии –  $5,46 \pm 1,72$  % и  $6,35$  [3,7–10,7] %/мин соответственно;  $P < 0,05$ . Имеющиеся статистически значимые различия в исследуемых группах согласовываются с данными авторов [3] и подтверждают возможность использования данного критерия для диагностики риска развития преэклампсии у беременных женщин.

Небольшое повышение концентрации аденозиндифосфата до  $7,32 \cdot 10^{-7}$ М позволило вызвать агрегацию тромбоцитов как у женщин с физиологической беременностью, так и у беременных с преэклампсией. Имеющиеся статистические различия в степени и скорости агрегации между физиологической беременностью и патологией ( $13,02 \pm 4,62$  % и  $13,65$  [9,7–18,6] %/мин; и  $20,09 \pm 4,10$  % и  $21,4$  [15,4–26,6] %/мин, соответственно;  $P < 0,05$ ), позволили проводить дальнейшие исследования влияния дезагрегантов при указанной концентрации инициатора агрегации – АДФ.

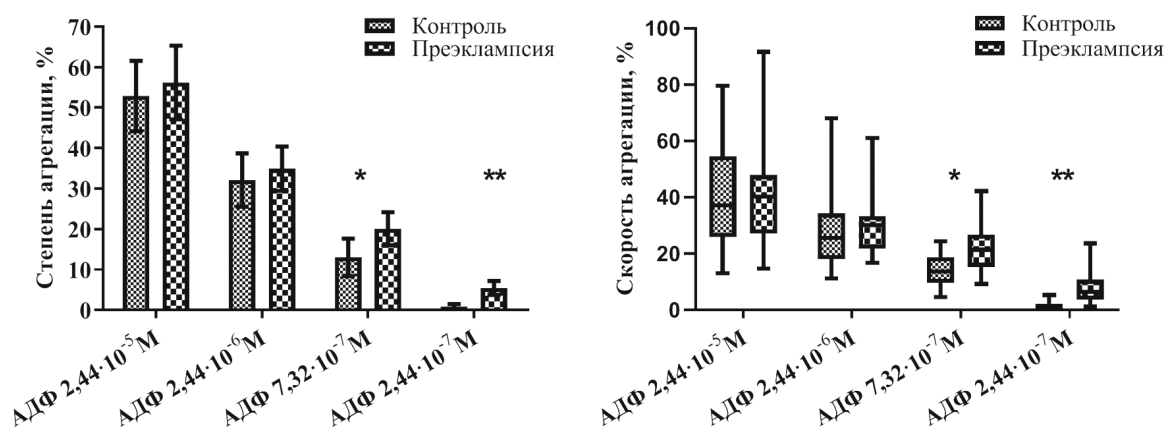


Рис. 1. Особенности реакции тромбоцитов женщин с физиологически протекающей беременностью и беременных с преэклампсией на разные концентрации АДФ \*; \*\* – достоверные различия по сравнению с соответствующим контролем ( $P < 0,05$ )

Fig. 1. Features of the platelets reaction of women with physiological pregnancy and pregnant women with pre-eclampsia at different concentrations of ADP \*; \*\* – significant differences compared with the corresponding control group ( $P < 0.05$ )

Механизм действия АДФ опосредован его взаимодействием с P2 пуринорецепторами на поверхности тромбоцитов. Так, связываясь с P2Y<sub>1</sub> рецепторами, АДФ активирует фосфолипазу С, инициируя изменение формы и агрегацию тромбоцитов за счет мобилизации внутриклеточных запасов ионов кальция [4; 5]. Взаимодействуя с P2Y<sub>12</sub> рецепторами, посредством G-белков, АДФ ингибирует аденилатциклазу, тем самым снижая уровень внутриклеточного цАМФ, вызывая изменения формы, секрецию гранул и агрегацию тромбоцитов, что имеет важное значение для полного ответа на АДФ-индуцированную агрегацию и стабилизацию агрегатов [4].

При преэклампсии гиперактивность тромбоцитов наблюдается с 16-ой недели беременности и нормализуется через 6 недель после родов. Причин для повышенной агрегации тромбоцитов при преэклампсии может быть несколько: снижение порога чувствительности для АДФ-стимулированной агрегации и увеличение секреции ионов кальция за счет нарушения функционирования Ca<sup>2+</sup>-транспортных систем, а также повышенной секрецией АТФ и АДФ из внутриклеточных депо [6]; уменьшение уровней цАМФ и цГМФ. Кроме того, преэклампсия сопряжена с высвобождением провоспалительных медиаторов из активированных тромбоцитов, что может вызвать воспалительные реакции в эндотелиальных клетках [7] и привести к эндотелиальной дисфункции.

Это осложнение беременности и родов, несмотря на современные успехи в профилактике, диагностике и лечении, является основной причиной смерти среди женщин репродуктивного возраста. Ограничения текущих способов терапии повышенной агрегационной способности тромбоцитов подчеркивают необходимость анализа различных путей активации этих клеток, выявления новых способов их коррекции, обеспечивающих целенаправленное вмешательство в процессы регуляции агрегации тромбоцитов. Перспективным соединением для этих целей может служить диаденозин-5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-тетрафосфат (Ar<sub>4</sub>A), в норме содержащийся в плотных гранулах тромбоцитов [8]. Являясь молекулой, которая включена в процессы восстановления, коррекции и защиты как на клеточном, так и на организменном уровне, Ar<sub>4</sub>A способен проявлять регуляторные функции на разных уровнях организации. В ответ на такие стрессовые влияния, как окисление и тепловой шок, диаденозин-5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-тетрафосфат выделяется из плотных гранул тромбоцитов, участвуя в реакции высвобождения. При физиологических условиях Ar<sub>4</sub>A не секретируется в одиночку, а высвобождается вместе с другими моно- и динуклеотидами, главным образом АДФ и АТФ, которые секретируются в 20–40-кратном превышении над динуклеотидами [9]. Внеклеточный Ar<sub>4</sub>A действует через пуринорецепторы и, возможно, через специфические рецепторные структуры. Представляет интерес провести анализ ингибиторных влияний Ar<sub>4</sub>A, осуществляемых через P2 пуринорецепторы, на АДФ-иницированную агрегацию тромбоцитов женщин с физиологически протекающей беременностью и с преэклампсией.

В эксперименте выявлено, что дезагрегационные свойства Ar<sub>4</sub>A носят доза-зависимый характер (рис. 2). Так, при добавлении Ar<sub>4</sub>A в концентрации  $2,44 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  в суспензию тромбоцитов, активированных АДФ, отмечается незначительное ингибирование степени и скорости агрегации тромбоцитов до равных значений в обеих исследуемых группах.



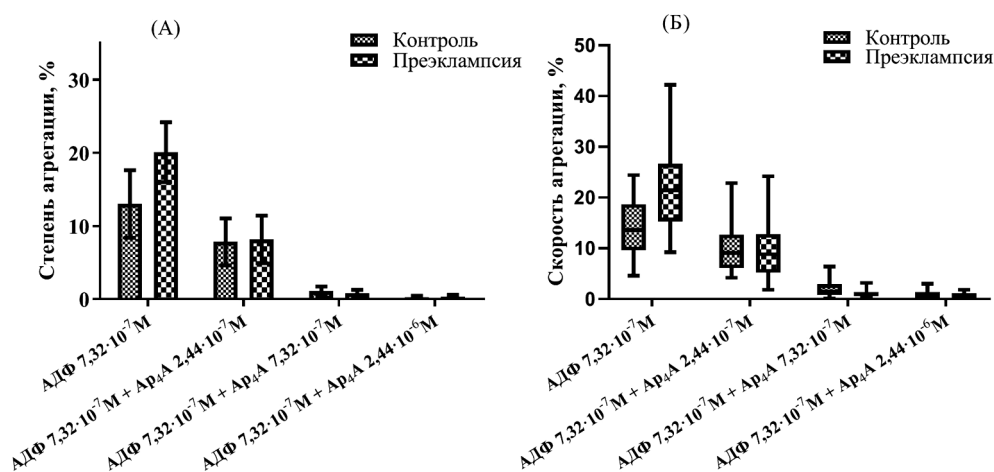


Рис. 2. Изменение степени и скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов беременных женщин с физиологической беременностью и беременных с преэклампсией при добавлении в ОТП различных концентраций  $Ap_4A$

Fig. 2. Changes in the degree and rate of ADP-induced platelet aggregation of pregnant women with physiological pregnancy and pregnant women with pre-eclampsia when different concentrations of  $Ap_4A$  are added to the platelet-rich plasma

Использование  $Ap_4A$  в концентрации  $7,32 \cdot 10^{-7} M$  значительно снижало функциональную активность тромбоцитов, вызванную аденозиндифосфатом как у женщин с физиологически протекающей беременностью, так и у беременных женщин с преэклампсией. При этом показатели степени и скорости агрегации составили: при физиологической беременности –  $1,10 \pm 0,64$  % и  $2,01 \pm 1,55$  %/мин; при преэклампсии –  $0,76 \pm 0,50$  % и  $1,09 \pm 0,73$  %/мин соответственно. Наибольший ингибирующий эффект диаденозин-5',5'''- $P^1, P^4$ -тетрафосфата при АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов был достигнут при концентрации равной  $2,44 \cdot 10^{-6} M$  (степень и скорость агрегации при физиологической беременности –  $0,24 \pm 0,21$  % и  $0,78 \pm 0,96$  %/мин; при преэклампсии –  $0,33 \pm 0,26$  % и  $0,64 \pm 0,45$  %/мин соответственно).

В настоящее время основной мишенью таких используемых антитромбоцитарных препаратов, как тиклопидин и клопидогрел, является  $P2Y_{12}$  рецептор [10]. В свою очередь, антагонисты  $P2Y_1$  рецепторов были разработаны и предложены в качестве антиагрегантов, но ни один не продвинулся к клиническим испытаниям. Потенциальное преимущество использования диаденозин-5',5'''- $P^1, P^4$ -тетрафосфата и его производных в качестве терапевтических дезагрегантов заключается в том, что, в отличие от выше перечисленных антагонистов  $P2Y_{12}$  рецептора, они также оказывают синергическое ингибирующее действие на  $P2Y_1$  рецепторы тромбоцитов [8]. Показатели  $IC_{50}$  для ингибирования каждого из этих рецепторов превышали значения  $IC_{50}$  для блокирования АДФ-стимулированной агрегации тромбоцитов, что свидетельствует о возможном синергетическом эффекте ингибирования [11]. Так, воздействуя на  $P2Y_1$  рецептор,  $Ap_4A$  блокирует активацию фосфолипазы  $C_2$ , тем самым снижая мобилизацию внутриклеточных запасов ионов кальция. Кроме того, ингибирование этого рецептора нарушает работу ряда киназ (Rho/Rho, Lyn, MAPKs), которые посредством G-белков приводят к активации цГМФ-зависимой протеинкиназы (PKG), секреции  $\alpha$ -гранул и синтезу тромбоксана  $A_2$  [12].

Ингибирование  $P2Y_{12}$  рецептора при помощи  $Ap_4A$ , дестабилизирует тромбоцитарные агрегаты, блокируя связывание тромбоцитов с фибриногеном и коллагеном, нарушая, таким образом, стабилизацию и формирование тромба. Кроме того, ингибирование  $P2Y_{12}$  активирует аденилатциклазу, тем самым повышая уровень цАМФ в клетке и снижая ответ тромбоцитов на другие агрегирующие агенты. Антагонистические эффекты цАМФ и цГМФ по отношению к кальций-зависимым процессам опосредованы через цАМФ- и цГМФ-зависимые протеинкиназы (PKA и PKG), которые фосфорилируют кальций-высвобождающий инозитол-1,4,5-трифосфат рецептор I типа, ингибируя мобилизацию кальция [13].

Интересно отметить, что тромбоциты у пациентов с синдромом Чедиака–Хигаси (редкое заболевание, характеризующееся альбинизмом, восприимчивостью к инфекции и склонностью к кровотечениям, связанное с функциональным дефектом тромбоцитов) содержат на 99 % меньше  $Ap_4A$  по сравнению с нормой и на 53 % меньше АТФ [14]. Можно предположить, что при преэклампсии значимость и роль многочисленных функций  $Ap_4A$  снижена из-за его истощения во внутриклеточных депо тромбоцитов.

Анализ ингибирования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов различными концентрациями  $Ap_4A$  позволяет выбрать условия для проведения сравнительного анализа антиагрегационных способностей данного динуклеотида с уже известными ингибиторами пуринорецепторов аналогичного

действия. Так, наиболее известным препаратом, воздействующим на P2 пуринорецепторы и часто используемым в медицине для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, является АТФ. Аденозинтрифосфат способен оказывать антиаритмическое, гипотензивное и противосудорожное действие, особенно в условиях эклампсии [15].

Известно, что при преэклампсии в крови беременных женщин снижается число тромбоцитов и количество депонируемого и секретируемого ими АТФ из-за потери плотных телец. В клинической практике для инъекций, как правило, используют препараты АТФ- $\text{Na}_2$ , однако стабильность данному нуклеотиду и его функциональную активность обеспечивают ионы  $\text{Mg}^{2+}$ , дефицитом которых сопровождается преэклампсия. Таким образом, в организме аденозинтрифосфат является биологическим реагентом, который проявляет свои основные метаболические и гемодинамические свойства в комплексе с магнием, поэтому в большинстве обменных реакций требуется не только АТФ как метаболический субстрат, но и магний как кофактор, препятствующий его разрушению путем ингибирования процессов дезаминирования и дефосфорилирования АТФ тканями.

При сравнительном анализе эффективности антиагрегационных свойств АТФ и  $\text{Ar}_4\text{A}$  при преэклампсии использовали его натриевую и магниевую соли (табл. 1, 2). В результате проведенных исследований выявлено, что во всех исследуемых группах наибольший ингибирующий эффект на агрегацию тромбоцитов проявляли диаденозин-5',5'''- $\text{P}^1, \text{P}^4$ -тетрафосфат и комплекс АТФ- $\text{Mg}^{2+}$ . При этом их эффективность не отличается друг от друга при действии на тромбоциты женщин с физиологически протекающей беременностью и беременных женщин с преэклампсией. Комплекс АТФ- $\text{Na}_2$  проявляет более слабые дезагрегационные свойства как в контрольной, так и в группе женщин с осложнением беременности (табл. 1).

Таблица 1

**Изменение степени АДФ-индуцированной ( $7,32 \cdot 10^{-7}\text{M}$ ) агрегации тромбоцитов беременных женщин при добавлении в ОТП динатриевой соли АТФ ( $7,32 \cdot 10^{-7}\text{M}$ ), магниевой соли АТФ ( $7,32 \cdot 10^{-7}\text{M}$ ) и  $\text{Ar}_4\text{A}$  ( $7,32 \cdot 10^{-7}\text{M}$ )**

Table 1

**Change in the degree of ADP-induced ( $7.32 \cdot 10^{-7}\text{M}$ ) platelet aggregation of pregnant women when ATP disodium salt ( $7.32 \cdot 10^{-7}\text{M}$ ), ATP magnesium salt ( $7.32 \cdot 10^{-7}\text{M}$ ) and  $\text{Ar}_4\text{A}$  ( $7.32 \cdot 10^{-7}\text{M}$ ) are added to the platelet-rich plasma**

Состояние беременности	Дезагреганты	Степень агрегации ( $\text{M} \pm \text{SD}$ )	Уровень значимости (P) с поправкой Тьюки	
Физиологическая беременность	$\text{Ar}_4\text{A}^{(1)}$	1,10±0,65	$\text{P}_{1-2}$	$\text{P}=0,000106$
	АТФ- $\text{Na}_2^{(2)}$	2,26±0,96	$\text{P}_{1-3}$	$\text{P}=0,534643$
	АТФ- $\text{Mg}^{2+(3)}$	0,90±0,58	$\text{P}_{2-3}$	$\text{P}=0,000106$
Степень агрегации: $F=31,0289, P<0,05$				
Преэклампсия	$\text{Ar}_4\text{A}^{(1)}$	0,77±0,50	$\text{P}_{1-2}$	$\text{P}=0,000106$
	АТФ- $\text{Na}_2^{(2)}$	2,50±0,82	$\text{P}_{1-3}$	$\text{P}=0,886746$
	АТФ- $\text{Mg}^{2+(3)}$	0,84±0,57	$\text{P}_{2-3}$	$\text{P}=0,000106$
Степень агрегации: $F=74,964, P<0,05$				

Возможно, антиагрегационные эффекты АТФ- $\text{Na}_2$  на тромбоциты беременных женщин с преэклампсией менее выражены из-за дефицита иона  $\text{Mg}^{2+}$  в крови. Потребность беременной женщины в магнии нередко превышает его поступление, что позволяет рассматривать беременность как состояние физиологической гипомagneмии [16].

Дефицит этого иона сопряжен с широким спектром осложнений беременности, родов и патологии плода. По этой причине в медицинской практике для профилактики и лечения преэклампсии рекомендовано параллельно с АТФ- $\text{Na}_2$  использовать  $\text{Mg}^{2+}\text{B}_6$ .

При проведении анализа изменения скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов беременных женщин выявлено, что в группе женщин с физиологически протекающей беременностью и группе беременных с преэклампсией эффективность  $\text{Ar}_4\text{A}$  также не отличалась от АТФ- $\text{Mg}^{2+}$  (табл. 2). Однако следует отметить, что диаденозин-5',5'''- $\text{P}^1, \text{P}^4$ -тетрафосфат проявляет свои дезагрегационные способности в условиях дефицита ионов магния, характерного для преэклампсии.

Таблица 2

Изменение скорости АДФ-индуцированной ( $7,32 \cdot 10^{-7}M$ ) агрегации тромбоцитов беременных женщин при добавлении в ОТП динатриевой соли АДФ ( $7,32 \cdot 10^{-7}M$ ), магниевой соли АДФ ( $7,32 \cdot 10^{-7}M$ ) и  $Ar_4A$  ( $7,32 \cdot 10^{-7}M$ )

Table 2

Change in the rate of ADP-induced ( $7.32 \cdot 10^{-7}M$ ) platelet aggregation of pregnant women when ATP disodium salt ( $7.32 \cdot 10^{-7}M$ ), ATP magnesium salt ( $7.32 \cdot 10^{-7}M$ ) and  $Ar_4A$  ( $7.32 \cdot 10^{-7}M$ ) are added to the platelet-rich plasma

Состояние беременности	Дезагреганты	Me [P25-P75]	H(P)	
Физиологическая беременность	$Ar_4A^{(1)}$	1,4 [0,85-2,9]	$P_{1-2}$	H=2,493, P=0,1143
	АДФ- $Na_2^{(2)}$	2,3 [0,95-4,05]	$P_{1-3}$	H=6,082, P=0,0137
	АДФ- $Mg^{2+(3)}$	0,9 [0,5-1,55]	$P_{2-3}$	H=14,517, P=0,0001
Тест Краскела–Уоллиса: $H=15,457, P<0,05$				
Преэклампсия	$Ar_4A^{(1)}$	0,95 [0,55-1,25]	$P_{1-2}$	H=24,198, P=0,0000
	АДФ- $Na_2^{(2)}$	3,6 [1,85-4,3]	$P_{1-3}$	H=3,208, P=0,0733
	АДФ- $Mg^{2+(3)}$	0,8 [0,3-0,95]	$P_{2-3}$	H=29,072, P=0,0000
Тест Краскела–Уоллиса: $H=37,456, P<0,05$				

Обнаруженная высокая физиологическая активность  $Ar_4A$  может быть обусловлена его полифункциональностью. Это соединение является специфическим ингибитором взаимодействия АДФ с пуриновыми рецепторами тромбоцитов, а также, возможно, действует на многие внутриклеточные системы через свои специфические P2D пуринорецепторы [17]. Существует ряд доказательств, предполагающих наличие уникальных рецепторов для динуклеотидов. Например, диаденозинтрифосфат и  $Ar_4A$  оказывают воздействие на сердце кролика, которое не изменяется при добавлении АДФ, АДФ, АМФ или аденозина [18], а также был описан [19] специфический рецептор для динуклеотидов в синапсоммах мозга крыс. Данный рецептор преимущественно стимулировался диаденозинполифосфатами ( $Ar_nA$ ) и был нечувствителен к АДФ, УТФ, аденозину и их аналогам.

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод о возможности использования для коррекции повышенной агрегационной способности тромбоцитов при преэклампсии магниевых солей АДФ, однако следует учесть, что длительность эффекта соединений АДФ ограничена высокими скоростями дезаминирования и дефосфорилирования. Таким образом, при проектировании будущих лекарственных средств необходимо учитывать, что физиологические эффекты пуринергической сигнальной системы зависят не только от химической структуры или количества нуклеотидов, поступивших во внеклеточное пространство, но и от их соотношения с продуктами деградации, в образовании которых принимает участие ряд ферментов. К ним следует отнести эктонуклеотидазы, среди которых различают как растворимые, так и экспрессированные на поверхности клеток формы. Так, по данным авторов [20], активность экто-АДФазы и экто-АДФазы в 10 раз выше, чем активность гидролазы  $Ar_4A$ . Гематологические исследования показали, что способ, с помощью которого  $Ar_4A$  расщепляется гидролазой, асимметричен. При этом образуется АДФ и АМФ. АДФ и АТФ способны влиять на скорость гидролиза  $Ar_4A$  в крови путем конкурентного ингибирования  $Ar_nA$ -гидролаз. При этом в присутствии АДФ скорость разложения  $Ar_4A$  резко уменьшается. Таким образом, в естественных условиях после секреции  $Ar_4A$  из тромбоцитов он оказывается защищенным от деградации окружающими его нуклеотидами, поэтому способен действовать в качестве сигнальной молекулы в отдаленных местах. Вместе с другими эктоэнзимами, которые гидролизуют нуклеотиды, гидролазы  $Ar_4A$  нуждается в ионах двухвалентных металлов для максимальной каталитической активности [20]. В качестве этих ионов могут выступать  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ . Так, максимальная активность эктогидролазы достигается при миллимолярных концентрациях ионов  $Mg^{2+}$ , тогда как при более высоких концентрациях (10 мкМ, а также при 200 мкМ) гидролиз  $Ar_4A$  резко тормозится [20]. Восполнение дефицита  $Mg^{2+}$  при преэклампсии позволяет продлевать также период эффективного влияния  $Ar_4A$  в качестве лекарственного средства.

## Заключение

У беременных женщин с преэклампсией установлено достоверное повышение степени агрегации в ответ на действие АДФ по сравнению с физиологически протекающей беременностью. Увеличение степени агрегации, возможно, связано с нарушением баланса выделяемых в ходе реакции высвобождения биологически активных веществ, регулирующих агрегацию и дезагрегацию тромбоцитов (АДФ,  $Ar_4A$ ,  $Ca^{2+}$  и др.). Риском развития преэклампсии являются наследственные, экологические, социально-экономические факторы и психологический статус беременных. Заболевания и осложнения техногенного происхождения выявляются не сразу, а имеют длительный латентный период, нередко переходящий в хроническую форму. Антропогенное воздействие влечет изменение резистентности организма и постепенное проявление патологии, однако в связи с перестройкой организма беременных к вынашиванию плода, данный процесс может значительно усиливаться. Расширенный мониторинг, влияние указанных факторов и раннее выявление повышенной агрегационной способности тромбоцитов у беременных с преэклампсией может в значительной мере способствовать своевременной диагностике, профилактике и терапии данного осложнения беременности.

В результате исследования влияния  $Ar_4A$  на функциональные свойства тромбоцитов доказано, что данный динуклеотид обладает способностью снижать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов до уровня, не выходящего за пределы нормы. Результаты исследований позволяют рекомендовать использование  $Ar_4A$  в качестве основы для получения лекарственного средства, предназначенного для снижения повышенной агрегационной способности тромбоцитов при ряде заболеваний, включая преэклампсию. Применение  $Ar_4A$  в качестве лекарственного средства позволит обеспечить более совершенный способ профилактики и лечения тромботических состояний, поскольку этот динуклеотид является аналогом природного компонента плотных телец тромбоцитов человека, не вызывающих отрицательных побочных эффектов на систему крови.

## Библиографические ссылки

1. Felfernig-Boehm D, Salat A, Vogl SE, Murabito M, Felfernig M, Schmidt D, Mittlboeck M, Husslein P, Mueller MR. Early detection of preeclampsia by determination of platelet aggregability. *Thrombosis Research*. 2000;98(2):139–146. DOI: 10.1016/s0049-3848(99)00224-8.
2. Onisai M, Vladareanu A.-M, Bumbea H, Ciorascu M, Pop C, Andrei C, Nicolescu A, Voican I, Vasilescu S, Visan L, Adrian II, Horhoianu V, Marinescu B, Vladareanu R. A study of the hematological picture and of platelet function in preeclampsia-report of a series of cases. *Maedica-Journal of Clinical Medicine*. 2009;4(4):326–337.
3. Сидоренко ВН. Тромбоцитарно-эндотелиальные механизмы в патогенезе, ранней диагностике, профилактике и лечении поздних гестозов [диссертация]. Минск: [б. н.]; 2005. 259 с.
4. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thrombosis and Haemostasis*. 2001;86(1):222–232.
5. Kolen KV, Slegers H. Integration of P2Y receptor-activated signal transduction pathways in G protein-dependent signalling networks. *Purinergic Signaling*. 2006;2(3):451–469. DOI: 10.1007/s11302-006-9008-0.
6. Babic G, Novokmet S, Jankovic S. Changes of platelets' function in preeclampsia. *General European Journal of Medicine*. 2011;6(6):696–700. DOI: 10.2478/s11536-011-0076-3.
7. Kazmi RS, Cooper AJ, Lwaleed BA. Platelet function in pre-eclampsia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2011;37(2):131–136. DOI: 10.1055/s-0030-1270339.
8. Chang H, Yanachkov IB, Michelson AD, Li Y, Barnard MR, Wright GE, Frelinger AL. Agonist and Antagonist Effects of Diadenosine Tetraphosphate, a Platelet Dense Granule Constituent, on Platelet P2Y1, P2Y12 and P2X1 Receptors. *Thrombosis Research*. 2010;125(2):159–165. DOI: 10.1016/j.thromres.2009.11.006.
9. Lüthje J, Miller D, Ogilvie A. Unproportionally high concentrations of diadenosine triphosphate ( $Ap_3A$ ) and diadenosine tetraphosphate ( $Ap_4A$ ) in heavy platelets. *Consequences for in vitro studies with human platelets. Blut*. 1987;54(4):193–200. DOI: 10.1007/bf00594193.
10. Winchester DE, Wen X, Brearley WD, Park KE, Anderson RD, Bavry AA. Efficacy and safety of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors during elective coronary revascularization: a meta-analysis of randomized trials performed in the era of stents and thienopyridines. *Journal of the American College Cardiology*. 2011;57(10):1190–1199. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.10.030.
11. Chang H, Yanachkov IB, Dix EJ, Li, YF, Barnard MR, Wright GE, Michelson AD, Frelinger AL. Modified diadenosine tetraphosphates with dual specificity for P2Y1 and P2Y12 are potent antagonists of ADP-induced platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;10(12):2573–2580. DOI: 10.1111/jth.12035.
12. Brass LF, Stalker TJ. Mechanisms of platelet activation. In: *Platelets Hematology Cardiovascular Disorders*. Cambridge: University Press; 2008. p. 37–52.
13. Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochemical Pharmacology*. 2001;62(9):1153–1161. DOI: 10.1016/s0006-2952(01)00760-2.
14. Kim BK, Chao FC, Leavitt R, Fauci AS, Meyers KM, Zamecnik PC. Diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate deficiency in blood platelets of the Chédiak-Higashi syndrome. *Blood*. 1985;66(3):735–737.
15. Podrasky E, Xu D, Liang BT. A novel phospholipase C- and cAMP-independent positive inotropic mechanism via a P2 purinoceptor. *The American Journal Physiology*. 1997; 273(5). Part 2:H2380–2387. DOI: 10.1152/ajpheart.1997.273.5.H2380.
16. Semczuk M, Semczuk-Sikora A. New data on toxic metal intoxication (Cd, Pb, and Hg in particular) and Mg status during pregnancy. *Medical Science Monitor. International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2001;7(2):332–340.



17. Miras-Portugal MT, Castro E, Mateo J, Pintor J. The diadenosine polyphosphate receptors: P2D purinoceptors. *Ciba Foundation Symposium*. 1996;198:35–47. DOI: 10.1002/9780470514900.ch2.
18. Pohl U, Ogilvie A., Lamontagne D, Busse R. Potent effects of AP3A and AP4A on coronary resistance and autacoid release of intact rabbit hearts. *The American Journal of Physiology*. 1991;260(5):H1692–H1697. DOI: 10.1152/ajpheart.1991.260.5.H1692.
19. Pintor J, Miras-Portugal MT. P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system. *General Pharmacology*. 1995;26(2):229–235. DOI: 10.1016/0306-3623(94)00182-m.
20. Ogilvie A, Lüthje J, Pohl U, Busse R. Identification and partial characterization of an adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine hydrolase on intact bovine aortic endothelial cells. *Biochemical Journal*. 1989;259(1):97–103. DOI: 10.1042/bj2590097.

## References

1. Felfernig-Boehm D, Salat A, Vogl SE, Murabito M, Felfernig M, Schmidt D, Mittlboeck M, Husslein P, Mueller MR. Early detection of preeclampsia by determination of platelet aggregability. *Thrombosis Research*. 2000;98(2):139–146. DOI: 10.1016/s0049-3848(99)00224-8.
2. Onisai M, Vladareanu A.-M, Bumbea H, Ciorascu M, Pop C, Andrei C, Nicolescu A, Voican I, Vasilescu S, Visan L, Adrian II, Horhoianu V, Marinescu B, Vladareanu R. A study of the hematological picture and of platelet function in preeclampsia-report of a series of cases. *Maedica-Journal of Clinical Medicine*. 2009;4(4):326–337.
3. Sidorenko VN. *Trombotsitarno-endothelialnye mekhanizmy v patogeneze, ranney diagnostike, profilaktike i lechenii pozdnykh gestozov* [Platelet-endothelial mechanisms in pathogenesis, early diagnosis, prevention and treatment of late gestosis] [dissertation]. Minsk: [publisher unknown]; 2005. 259 p. Russian.
4. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thrombosis and Haemostasis*. 2001;86(1):222–232.
5. Kolen KV, Slegers H. Integration of P2Y receptor-activated signal transduction pathways in G protein-dependent signalling networks. *Purinergic Signaling*. 2006;2(3):451–469. DOI: 10.1007/s11302-006-9008-0.
6. Babic G, Novokmet S, Jankovic S. Changes of platelets' function in preeclampsia. *General European Journal of Medicine*. 2011;6(6):696–700. DOI: 10.2478/s11536-011-0076-3.
7. Kazmi RS, Cooper AJ, Lwaleed BA. Platelet function in pre-eclampsia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2011;37(2):131–136. DOI: 10.1055/s-0030-1270339.
8. Chang H, Yanachkov IB, Michelson AD, Li Y, Barnard MR, Wright GE, Frelinger AL. Agonist and Antagonist Effects of Diadenosine Tetraphosphate, a Platelet Dense Granule Constituent, on Platelet P2Y1, P2Y12 and P2X1 Receptors. *Thrombosis Research*. 2010;125(2):159–165. DOI: 10.1016/j.thromres.2009.11.006.
9. Lüthje J, Miller D, Ogilvie A. Unproportionally high concentrations of diadenosine triphosphate (Ap3A) and diadenosine tetraphosphate (Ap4A) in heavy platelets. *Consequences for in vitro studies with human platelets. Blut*. 1987;54(4):193–200. DOI: 10.1007/bf00594193.
10. Winchester DE, Wen X, Brearley WD, Park KE, Anderson RD, Bavry AA. Efficacy and safety of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors during elective coronary revascularization: a meta-analysis of randomized trials performed in the era of stents and thienopyridines. *Journal of the American College Cardiology*. 2011;57(10):1190–1199. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.10.030.
11. Chang H, Yanachkov IB, Dix EJ, Li, YF, Barnard MR, Wright GE, Michelson AD, Frelinger AL. Modified diadenosine tetraphosphates with dual specificity for P2Y1 and P2Y12 are potent antagonists of ADP-induced platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;10(12):2573–2580. DOI: 10.1111/jth.12035.
12. Brass LF, Stalker TJ. Mechanisms of platelet activation. In: *Platelets Hematology Cardiovascular Disorders*. Cambridge: University Press; 2008. p. 37–52.
13. Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochemical Pharmacology*. 2001;62(9):1153–1161. DOI: 10.1016/s0006-2952(01)00760-2.
14. Kim BK, Chao FC, Leavitt R, Fauci, AS, Meyers KM, Zamecnik PC. Diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate deficiency in blood platelets of the Chédiak-Higashi syndrome. *Blood*. 1985;66(3):735–737.
15. Podrasky E, Xu D, Liang BT. A novel phospholipase C- and cAMP-independent positive inotropic mechanism via a P2 purinoceptor. *The American Journal of Physiology*. 1997; 273(5). Part 2:H2380–2387. DOI: 10.1152/ajpheart.1997.273.5.H2380.
16. Semczuk M, Semczuk-Sikora A. New data on toxic metal intoxication (Cd, Pb, and Hg in particular) and Mg status during pregnancy. *Medical Science Monitor. International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2001;7(2):332–340.
17. Miras-Portugal MT, Castro E, Mateo J, Pintor J. The diadenosine polyphosphate receptors: P2D purinoceptors. *Ciba Foundation Symposium*. 1996;198:35–47. DOI: 10.1002/9780470514900.ch2.
18. Pohl U, Ogilvie A., Lamontagne D, Busse R. Potent effects of AP3A and AP4A on coronary resistance and autacoid release of intact rabbit hearts. *The American Journal of Physiology*. 1991;260(5):H1692–H1697. DOI: 10.1152/ajpheart.1991.260.5.H1692.
19. Pintor J, Miras-Portugal MT. P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system. *General Pharmacology*. 1995;26(2):229–235. DOI: 10.1016/0306-3623(94)00182-m.
20. Ogilvie A, Lüthje J, Pohl U, Busse R. Identification and partial characterization of an adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine hydrolase on intact bovine aortic endothelial cells. *Biochemical Journal*. 1989;259(1):97–103. DOI: 10.1042/bj2590097.

Статья поступила в редакцию 01.11.2019.  
Received by editorial board 01.11.2019.