

*Г.Б.Федосеев, Н.Н.Петрищев, Е.В.Евсюкова***ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ АСПИРИНОВОЙ АСТМОЙ**

Кафедра госпитальной терапии и патологической физиологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова.

INFLUENCE OF MELATONIN ON FUNCTIONAL THROMBOCYTES ACTIVITY IN ASPIRIN-INDUCED ASTHMA PATIENTS*G.B.Fedoseev, N.N.Petrishchev, E.V.Evsiukova***S u m m a r y**

Main metabolite of melatonin (MT) — 6-sulfatoxymelatonin (6-SOMT) urine content and the influence of different melatonin doses in vitro on ADF-induced thrombocytes (T) aggregation were studied in 17 aspirin-induced asthmatic patients (AIA), 17 non-aspirin-induced asthmatic patients (NAA) and 16 healthy subjects. It was found that daytime urine 6-SOMT excretion in aspirin-induced asthmatics was lower than evidences reduced melatonin synthesis. Melatonin level in human organism effects on ADF-induced thrombocytes aggregation and on change of its parameters in consequent addition of melatonin in vitro. Aspirin-induced asthmatics have increased intensity and rate of the first aggregation phase during incubation of enriched by T blood plasma with MT in dose 0.01 pg/ml of plasma in difference from non-asthmatics and healthy subjects that is connected with opening of receptor-operated calcium canals and/or calcium's coming out of intracellular depot. The obtained results evidence the reception's disorder of melatonin and its metabolite — N-acetyl-5-metoxikinurenamine, which chemically is like acetylsalicylic acid — in aspirin-induced asthma. It possibly defines aspirin intolerance in aspirin-induced asthma patients.

Резюме

У больных аспириновой астмой (АсБА), 17 больных неаспириновой бронхиальной астмой (НБА) и у 16 здоровых лиц изучено содержание в моче основного метаболита мелатонина (MT) — 6-сульфатоксимелатонина (6-SOMT) и влияние различных доз MT in vitro на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (Т). Установлено, что у больных АсБА снижена дневная экскреция 6-SOMT с мочой, что свидетельствует об уменьшении синтеза MT. Уровень MT в организме влияет на АДФ-индуцированную агрегацию Т и изменение ее параметров при последующем добавлении MT in vitro. У больных АсБА, в отличие от больных НБА и здоровых лиц, при инкубации обогащенной Т плазмы с MT в дозе 0,01 пг/мл плазмы увеличивается интенсивность и скорость первой фазы агрегации, что связано с открытием рецептор-управляемых каналов для кальция и/или его выходом из внутриклеточного депо. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении у больных АсБА рецепции к MT и его метаболиту — N-ацетил-5-метоксикинуренамину, который по химической структуре сходен с ацетилсалициловой кислотой. Возможно, это определяет непереносимость аспирина у больных АсБА.

В последние годы показана важная роль эпифиза в регуляции физиологических процессов в организме человека в норме и при патологии [1,6,16]. Выявлено непосредственное воздействие его основного гормона мелатонина (MT) на функциональную активность тромбоцитов, включая феномен агрегации, реакцию высвобождения, синтез метаболитов арахидоновой кислоты и транспорт серотонина [8,11,17]. Известно, что тромбоциты играют существенную роль в патогенезе аллергических реакций и заболеваний, в частности, аспириновой бронхиальной астмы (АсБА), отличающейся наиболее тяжелым течением и быстрым развитием

зависимости от глюкокортикоидных гормонов [3,5,15]. Поскольку имеются сведения о том, что в процессе метаболизма MT образуется вещество, сходное по химической структуре с ацетилсалициловой кислотой (АСК) [10], к которой чувствительность тромбоцитов у больных АсБА повышена, изучение роли MT в патогенезе этого заболевания приобретает особое значение. В литературе мы не встретили сведений о продукции MT и о его влиянии на функциональную активность тромбоцитов у больных бронхиальной астмой.

Цель работы — изучить влияние различных доз MT на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов у

Новый подход к лечению бронхиальной астмы

Аколат

зафирлукаст



Поддерживающая терапия первой линии при бронхиальной астме



Простота в применении: 1 таблетка 2 раза в сутки



Препарат выбора при недостаточном эффекте от симптоматического приема бета₂-агонистами

АКОЛАТ. Информация по назначению (сокращенный вариант). Перед назначением прочтите информацию. **Применение:** профилактика и постоянная терапия бронхиальной астмы. Назначается в качестве поддерживающей терапии первой линии пациентам с бронхиальной астмой при недостаточности эффективности терапии бета-агонистами (применяемыми при необходимости). **Дозировка:** Взрослые и дети старше 12 лет: начальная доза — 20 мг 2 раза/сут. Поддерживающая доза: 20 мг 2 раза/сут (максимальная доза — 80 мг 2 раза/сут). Не принимать во время еды. **Противопоказания:** Повышенная чувствительность к компонентам препарата. **Меры предосторожности:** Препарат следует применять регулярно, а также при обострениях бронхиальной астмы. Аколат не предназначен для купирования бронхоспазма при остром приступе бронхиальной астмы. Не изучен как

средство для лечения лабильной или нестабильной формы бронхиальной астмы. Препарат не следует назначать в качестве замены после резкой отмены кортикостероидов для ингаляций. Вступает во взаимодействие с ацетилсалициловой кислотой (Аспирин), эритромицином и теофиллином. **Беременность и лактация:** не назначать препарат во время кормления грудью. **Побочные эффекты:** Аколат хорошо переносится. Побочные эффекты обычно слабые и не требуют отмены препарата: головная боль и желудочно-кишечные расстройства. Редко в клинических исследованиях препарат приводил к повышению уровня трансаминаз в плазме крови. В исследованиях с контролируемым плацебо наблюдалось увеличение случаев инфекции (обычно слабой) у пожилых пациентов, не требующих отмены препарата. **Форма выпуска:** Таблетки, содержащие 20 мг зафирлукаста.

ZENECA

ЗЕНЕКА Москва, Бол. Строченовский пер., 22/25, Москва 113054, Россия. Тел.: (095) 2306111. Факс: (095) 2306119

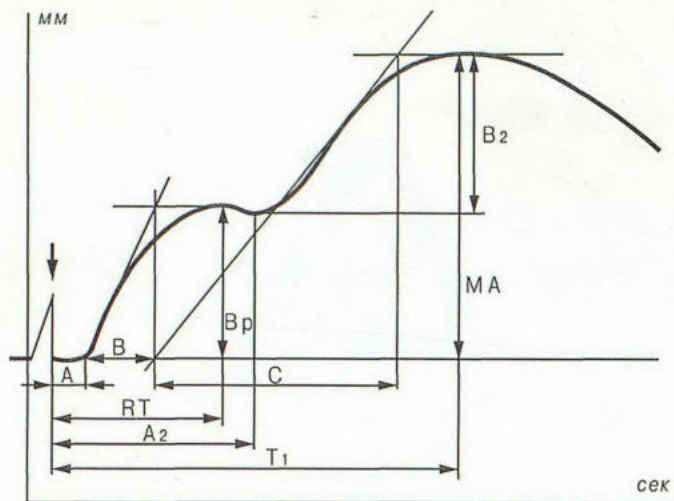


Рис. 1. Показатели агрегатограммы, характеризующие функциональную активность тромбоцитов.

По оси абсцисс — время агрегации (сек). По оси ординат — интенсивность агрегации (мм). Стрелкой обозначен момент добавления индуктора агрегации.

больных АсБА и сопоставить характер реакции на МТ *in vitro* с уровнем в моче его основного метаболита 6-сульфатоксимелатонина (6-COMT).

Обследовано 17 больных АсБА (14 женщин и 3 мужчин) в возрасте 23—60 лет, среди которых 5 имели легкую форму заболевания, 11 — средней тяжести и 1 тяжелую. Группы сравнения составили 17 больных неаспириновой бронхиальной астмой (НБА) — 9 женщин и 8 мужчин в возрасте 15—56 лет и 16 здоровых лиц (13 женщин и 3 мужчин) 27—59 лет. В группе больных НБА 5 имели легкое течение заболевания и 12 — средней тяжести. У большинства больных бронхиальной астмой (БА) наблюдался смешанный характер заболевания с наличием атопического, инфекционно-зависимого и других вариантов БА. Больные были обследованы в фазе затихающего обострения или ремиссии заболевания на фоне постоянной противоастматической терапии, которую отменяли в день исследования.

Исследование агрегационной активности тромбоцитов проводили утром с 9 до 11 часов. Кровь брали натощак. Обогащенную тромбоцитами плазму получали из цитратной крови (1:9) центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 минут [3,8]. Для получения бедной тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут. В качестве индуктора агрегации использовали раствор динатриевой соли АДФ ("Reanal", Венгрия) в трис-буфере 7,47. Конечная концентрация индуктора в пробе составляла $1,2 \times 10^{-6}$ М.

С целью изучения влияния МТ на агрегацию тромбоцитов проводили инкубацию 0,4 мл обогащенной тромбоцитами плазмы с 0,05 мл МТ в течение 3 минут. Для этого 0,5 мг МТ ("Sigma", США) разводили в 0,01% растворе этанола, а затем в 500 мл 0,9% раствора NaCl. Конечные концентрации МТ в пробах составили 0,01; 0,1; 1,0; 100; 10000 мг/мл плазмы.

Агрегационную активность тромбоцитов определяли с помощью анализатора агрегации тромбоцитов АТ-02.

Для характеристики процесса агрегации определяли ее интенсивность, максимальную амплитуду (МА) всей агрегации, ее первой (B_p) и второй (B) волн в мм, длительность агрегации: время от момента добавления индуктора до достижения максимальной амплитуды всей агрегации (T_1) и ее первой волны (RT), время от момента добавления индуктора до начала первой (A) и второй (A_2) волн агрегации в секундах, а также скорость первой (B) и второй (C) волн агрегации в мм/сек (рис.1).

Наряду с агрегацией тромбоцитов изучали уровень экскреции с мочой в дневное (с 9 до 21) и ночное (с 21 до 9 часов утра) время суток основного метаболита МТ 6-COMT иммуноферментным методом с помощью набора "DRG Instruments GmbH" (Германия). Мочу собирали в пластиковые контейнеры, определяли объем каждого образца, затем брали пробы по 5 мл, которые хранили при -20°C до проведения анализа.

Исследования проведены в период с 1 ноября 1996 г. по 15 февраля 1997 г. Полученные результаты обработаны статистически с использованием парного Т-критерия Вилкоксона, критерия λ -Колмогорова-Смирнова. Достоверность корреляционных связей между показателями агрегации тромбоцитов и экскрецией 6-COMT с мочой определяли при вероятности 95% с помощью парного метода Спирмана. Статистический анализ проводили на персональном компьютере IBM-486 РС/АТ с использованием программ пакета "Statgraphics" и "Statistica".

Результаты исследований показали, что больные АсБА отличаются от здоровых лиц и больных НБА низким уровнем экскреции 6-COMT с мочой в дневные часы (таблица). Из таблицы видно, что за счет этого у них наиболее выражены различия дневной и ночной экскреции 6-COMT с мочой, тогда как у больных НБА они отсутствуют из-за высокого уровня экскреции 6-COMT в дневное время.

Наши предыдущие исследования показали, что у здоровых лиц существует корреляционная связь между уровнем экскреции 6-COMT в ночное время и параметрами АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, зарегистрированной в утренние часы. Так, чем выше уровень 6-COMT, тем меньше длительность первой фазы агрегационного процесса — A_2 ($R=-0,7$, $p=0,02$). У больных АсБА обнаружена другая корреляционная связь: при повышении уровня 6-COMT увеличиваются скорость первой фазы агрегации тромбоцитов — B ($R=0,7$, $p=0,02$) и второй ее волны — C ($R=0,6$, $p=0,05$). У больных НБА корреляционные связи отсутствуют.

В связи с выявленной закономерностью представлялось интересным выяснить, какое влияние на функциональную активность тромбоцитов на этом фоне оказывает МТ, добавленный *in vitro*. При этом мы использовали дозы МТ, соответствующие его физиологическим концентрациям в организме (1,0 и 100 пг/мл плазмы), в 100 и 10 раз ниже минимальной физиологической концентрации (0,01 и 0,1 пг/мл) и

Содержание 6-COMT (нг/мл) в моче у больных АсБА, НБА и здоровых лиц

Время суток	Больные АсБА	Больные НБА	Здоровые	p_1	p_2	p_3
9.00—21.00	12,7±2,7	32,7±9,9	19,9±5,8	<0,05	<0,05	>0,1
21.00—9.00	33,7±6,8	32,4±7,4	45,1±10,1	>0,2	>0,2	>0,2
p_4	<0,01	>0,1	<0,01			

Примечание. p_1 — достоверность различий показателей у больных АсБА и здоровых лиц, p_2 — больных АсБА и НБА, p_3 — у больных НБА и здоровых, p_4 — между показателями 6-COMT в дневной и ночной порциях мочи.

в 100 раз превышающие максимальную физиологическую концентрацию в плазме (10000 пг/мл).

Установлено, что у больных АсБА в отличие от больных НБА и здоровых лиц инкубация обогащенной тромбоцитами плазмы с 0,01 пг/мл МТ ведет к увеличению интенсивности первой фазы АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (Вр) — рис.2. Из рисунка видно, что у больных НБА под влиянием этой же дозы МТ увеличивается интенсивность всей агрегации (МА) за счет ее второй волны (В2), что указывает на стимуляцию синтеза метаболита арахидоновой кислоты — тромбоксана. У здоровых лиц доза МТ 0,01 пг/мл плазмы тормозит агрегацию тромбоцитов: увеличивается длительность латентного периода (А) и первой фазы агрегационного процесса (А2).

Добавление МТ в дозе 0,1 пг/мл плазмы у больных АсБА так же, как и меньшая доза, ведет к активации первой фазы агрегации тромбоцитов: увеличивается ее скорость (В) с $1,0 \pm 0,22$ до $1,08 \pm 0,23$ мм/сек ($p < 0,05$). У больных НБА и здоровых лиц эта доза на агрегацию тромбоцитов не влияет.

Мелатонин в дозах 1,0, 100 и 10000 пг/мл плазмы у больных АсБА не изменяет параметры агрегации. В то же время у больных НБА и у здоровых лиц максимальная физиологическая концентрация МТ (100 пг/мл плазмы) вызывает изменение первой фазы агрегационного процесса: у больных НБА укорачивается интервал RT ($p < 0,01$), а у здоровых удлиняется интервал А2 ($p < 0,05$). Что же касается дозы МТ 10000 пг/мл плазмы, то только у здоровых людей она снижает интенсивность всей агрегации тромбоцитов (МА) и ее первой волны Вр ($p < 0,05$).

Далее мы попытались выяснить, связаны ли особенности реакции тромбоцитов на добавление различных доз МТ *in vitro* с уровнем экскреции 6-COMT с мочой в дневные и ночные часы. Индивидуальный анализ корреляционных связей показал, что у больных АсБА изменение параметров агрегации тромбоцитов не коррелирует с величиной экскреции 6-COMT. У больных НБА и у здоровых лиц корреляционные связи имеются лишь при воздействии МТ в минимальной физиологической концентрации. У здоровых людей чем выше экскреция 6-COMT с мочой в ночные часы, тем больше выражено торможение агрегации тромбоцитов (ее первой фазы) при добавлении МТ *in vitro* ($R = 0,8$, $p < 0,05$). Как у здоровых, так и у больных НБА имеются

обратные корреляционные связи между интенсивностью и скоростью процесса и содержанием 6-COMT в моче в дневное время ($R = -0,8$ и $-0,9$, $p < 0,01$).

Таким образом, у больных АсБА снижена экскреция 6-COMT с мочой и изменена реакция тромбоцитов на добавление различных доз МТ *in vitro*. Известно, что суточная экскреция 6-COMT — основного метаболита МТ достоверно отражает продукцию гормона, главным источником которого в организме является эпифиз [7]. Синтез МТ из серотонина в пинеалоцитах происходит в темноте и резко снижается на свету [1,6]. Дополнительными источниками МТ являются тромбоциты, энтерохромаффинные клетки кишечника, лимфоциты и макрофаги, а также сетчатка глаза и др. [4,9,13]. Тромбоциты являются переносчиками серотонина и имеют ферментативный аппарат для синтеза из него МТ [13]. Можно полагать, что у больных АсБА имеется снижение захвата серотонина тромбоцитами. В результате этого в них уменьшается синтез МТ в дневное время, что, наряду с низким синтезом базального уровня гормона в эпифизе, определяет особенности экскреции 6-COMT с мочой. В пользу нашего предположения свидетельствуют данные литературы о низкой способности тромбоцитов у больных АсБА накапливать и сохранять серотонин [14].

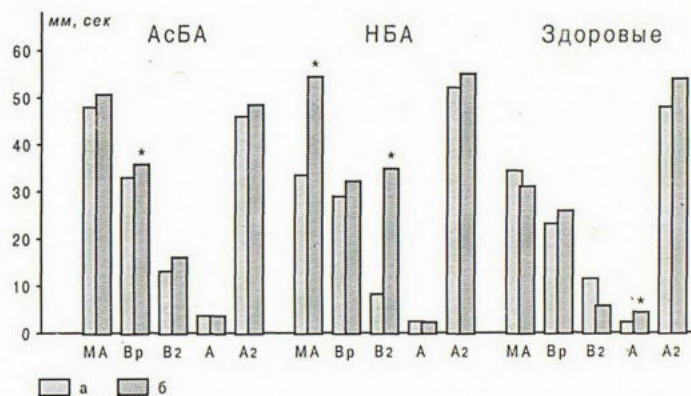


Рис.2. Изменение показателей АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных бронхиальной астмой и здоровых лиц под влиянием мелатонина (0,01 пг/мл) плазмы.

По оси ординат — показатели агрегации до (а) и после (б) инкубации с мелатонином ($M \pm m$). Звездочки над столбиками показывают достоверные изменения показателей ($p < 0,05$) по парному критерию Вилкоксона. См. объяснения в тексте.

Наряду с уменьшением синтеза МТ у больных АсБА выявлена особенность реакции тромбоцитов на добавление *in vitro* минимальных доз МТ: наблюдается увеличение интенсивности и скорости первой фазы АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, что связано с открытием рецептор-управляемых каналов для ионов кальция и/или выходом кальция из внутриклеточных депо. Известно, что в норме МТ ингибирует каналы для входа Ca^{2+} в клетку, реализуя свое воздействие через рецепторы, сцепленные с Gi- и Go-протеинами [2,18]. Возможно, у больных АсБА имеется дефект в системе Gi- и Go-протеинов, что определяет их нечувствительность к МТ. Однако в тромбоцитах имеется система Gs-протеинов, α -субъединицы которых также способны активировать определенные каналы для кальция [2,12]. Вероятно, именно через эту систему протеинов осуществляется влияние минимальных доз МТ на тромбоциты больных АсБА. О нарушении рецепции тромбоцитов к МТ также свидетельствует наличие только у них положительной корреляционной связи между скоростью первой и второй фазы АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов и ночным содержанием 6-СОМТ в моче, а также отсутствие каких-либо связей при дальнейшем добавлении МТ *in vitro*. Открытие рецептор-управляемых кальциевых каналов, как и низкий базальный уровень МТ в дневные часы, уменьшает стабильность тромбоцитарной мембраны и повышает агрегацию тромбоцитов.

Таким образом, у больных АсБА механизм реакции тромбоцитов на МТ отличается от такового у здоровых лиц. У больных НБА воздействие минимальной дозы МТ (0,01 пг/мл плазмы) также осуществляется другим путем — через увеличение интенсивности второй волны агрегации за счет высвобождения арахидоновой кислоты и последующего синтеза тромбоксана.

Результаты наших исследований дают основание полагать, что у больных АсБА в связи с низким уровнем МТ в дневные часы мало вырабатывается и его метаболита — N-ацетил-5метоксикинуренамина. Повышение чувствительности рецепторного аппарата тромбоцитов и извращенная реакция не только на МТ, но и на его метаболит, сходный по химической структуре с ацетилсалициловой кислотой, может служить предпосылкой к появлению непереносимости аспирина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арушанян Э.Б., Арушанян Л.Г. Модулярные свойства эпифизарного мелатонина: Обзор // Пробл. эндокринологии. — 1991. — № 3. — С.65—68.

2. Голубев А.Г. Все больше и больше трансмисмиттеров, транспортеров и рецепторов // Международ. мед. обзоры. — 1994. — Т.2, № 5. — С.360—365.
3. Евсюкова Е.В. Роль тромбоцитов в патогенезе аспириновой бронхиальной астмы: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб, 1991.
4. Райхлин Н.Т., Кветной И.М. Мелатонин: внеэпифазарные источники синтеза гормона в норме и патологии // Нейробиологические аспекты современной эндокринологии. — М., 1991. — С.49—50.
5. Федосеев Г.Б., Петрищев Н.Н., Евсюкова Е.В. Роль тромбоцитов в патогенезе аспириновой бронхиальной астмы // Пульмонология. — 1992. — № 3. — С.23—29.
6. Arendt J. Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. — London: Chapman and Hall, 1995.
7. Bojkowski Ch.J., Arendt J., Shih V.C., Markey S.P. Melatonin secretion in humans assessed by measuring its metabolite, 6-sulfatymelatonin // Clin. Chem. — 1987. — Vol.33, № 8. — P.1343—1348.
8. Cardinali D.P., Del Zar M.M., Vacas M.I. The effect of melatonin in human platelets // Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Lat.-Am. — 1993. — Vol.43, № 1—2. — P.1—13.
9. Guerlotte J., Greve P., Bernard V. et al. Hydroxyindole-O-methyltransferase in the chicken retina: immunocytochemical localization and daily rhythm of mRNA // Eur. J. Neurosci. — 1996. — Vol.8, № 4. — P.710—715.
10. Kelly R.W., Amato F., Seamark R.F. N-acetyl-5-methoxy-kynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol.121, № 1. — P.372—379.
11. Kornblihtt L.I., Finocchiaro L., Molinas F.C. Inhibitory effect of melatonin on platelet activation, induced by collagen and arachidonic acid // J. Pineal Res. — 1993. — Vol.14, № 4. — P.184—191.
12. Kroll M.H., Schafer A.I. Biochemical mechanisms of platelet activation // Blood. — 1989. — Vol.74, № 4. — P.1181—1195.
13. Launay J.M., Lamaitre B.J., Husson H.P. et al. Melatonin synthesis by rabbit platelets // Life Sci. — 1982. — Vol.31, № 14. — P.1487—1494.
14. Malmgren R., Unde G., Zetterstrom O. et al. Lowered glutathioneperoxidase activity in asthmatic patients with food and aspirin intolerance // Allergy. — 1986. — Vol.41. — P.43—45.
15. Morley J., Sanjar S., Page C.P. The platelet in asthma // Lancet. — 1984. — Vol.2, № 8412. — P.1142—1144.
16. Reiter R.J. Melatonin biosynthesis, regulation and effects // The Melatonin Hypothesis. Breast Cancer and Use of Electric Power / Eds R.G. Stevens, B.W. Wilson, L.E. Anderson. — Columbus: Battelle Press, 1997. — P.25—48.
17. Vacas V.I., Del Zar M.M., Martinuzzo V., Falcon C., Carreras L.O., Cardinali D.P. Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane B2 production by melatonin. Correlation with plasma melatonin levels // J. Pineal Res. — 1991. — Vol.11, № 3—4. — P.135—139.
18. Vanecek J. Melatonin inhibits increase of intracellular calcium and cyclic AMP in neonatal rat pituitary via independent pathways // Mol. Cell. Endocrinol. — 1995. — Vol.107, № 2. — P.149—153.

Поступила 13.01.98.