

Влияние психотропных препаратов на агрегацию тромбоцитов у больных алкоголизмом

ШАМАНСКАЯ М.Г.

ст.н.с. лаборатории физиологии и патологии иммунитета и гемостаза
НИИ медицинской экологии Читинской государственной медицинской академии, Чита

ДАРЕНСКИЙ И.Д.

д.м.н., профессор, гл.н.с., Национальный научный центр наркологии,
профессор кафедры наркологии ФППОВ Московской медицинской академии
им. И.М. Сеченова (ММА), Москва

ВИТКОВСКИЙ Ю.А.

д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии с курсом клинической физиологии
Читинской государственной медицинской академии, Чита

*Изучено влияние нейротропных препаратов на агрегацию тромбоцитов у больных 2-й стадией алкоголизма в период абстиненции. Установлено, что у них повышается АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов. Применение препаратов, блокирующих D₂-дофаминовые рецепторы и β-адренорецепторы — галоперидола и пропранолола, а также агониста бензодиазепиновых рецепторов — диазепама — уменьшают агрегационный потенциал тромбоцитов. Предполагается, что агрегация тромбоцитов регулируется периферическим нейрорецепторным аппаратом. Обнаружено, что инкубация *in vitro* плазмы здоровых лиц, богатой тромбоцитами с галоперидолом, пропранололом, диазепамом тормозит АДФ-, коллаген- и адреналин-индуцированную агрегацию. Внесение в инкубационную среду антагониста флумазенила не отменяет ингибирующее действие агониста бензодиазепиновых рецепторов диазепама на агрегацию тромбоцитов.*

Ключевые слова: алкогольная зависимость, тромбоциты, агрегация тромбоцитов

Введение

Для лечения алкоголизма широко применяются психотропные препараты. Помимо действия на центральную нервную систему они оказывают влияние на иммунитет и гемостаз [2, 4, 5, 8—17]. Эти эффекты препаратов являются клеточно-опосредованными, в том числе и через тромбоциты. Известно, что кроме рецепторов к коллагену, тромбину, АДФ, арахидоновой кислоте, фактору Виллебранда и др. [2] тромбоциты обладают «периферическим» рецепторным аппаратом к нейрорегуляторным лигандам: α- и β-адренорецепторами [10, 12—14, 17], периферическими бензодиазепиновыми рецепторами [6, 9, 11, 16] и дофаминорецепторами [8, 10, 15]. Однако в этом отношении имеются противоречивые данные. Описаны различные эффекты лигандов периферических рецепторов на агрегационную активность тромбоцитов. Так, одни авторы установили, что в условиях *in vitro* дофамин в низких дозах снижает, а в высоких — увеличивает агрегацию кровяных пластинок [8]. Другие исследователи указывают на то, что дофамин независимо от дозы уменьшает или, наоборот, повышает агрегационную функцию тромбоцитов [10, 15]. Лиганды бензодиазепиновых рецепторов клоназепама, диазепама и мидазолама тормозят синтез тромбоксана А₂ и снижают агрегацию тромбоцитов [9, 16]. Более того, отмечают, что антагонист бензодиазепиновых рецепторов РК 11195 полностью отменяет блокирующее действие бензодиазепинов [11].

Целью работы было исследование влияния некоторых психотропных препаратов на агрегационную функцию тромбоцитов у больных алкогольной зависимостью.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 18 мужчин в возрасте 30—42 лет с алкогольной зависимостью. Диагностика алкогольной зависимости проводилась согласно МКБ-10. У всех пациентов установлена 2-я стадия заболевания. В исследование не включались больные с выраженной соматической и неврологической патологией неалкогольного генеза, сочетанием алкогольной зависимости с зависимостью от других психоактивных веществ, а также больные, принимавшие участие в каких-либо клинических исследованиях в течение предшествующих 3 мес. Длительность заболевания в представленной выборке варьировала от 5 до 10 лет. Преобладающей формой потребления алкоголя в обеих группах являлась псевдозапойная: она диагностировалась у девяти чел., запойная форма пьянства — у пяти пациентов.

У большинства больных (12 чел.) темп прогрессивности заболевания квалифицирован как средний. На момент обследования толерантность составляла в среднем от 0,6 до 1,0 л крепких спиртных напитков в сутки. Алкогольные изменения личности установлены у большинства пациентов (9 чел.).

Больные разделены на группы в зависимости от применяемого при лечении препарата. Группа 1 — больные с клиникой выраженного гиперadrenergического синдрома, получавшие по показаниям пропранолол в

дозе 40 мг 2 раза в сутки; 2-я группа — больные с судорожным синдромом и типичным алкогольным делирием, которым вводился диазепам в дозе 60 мг/сутки; 3-я группа — больные в период ремиссии с клиникой актуализации патологического влечения к алкоголю (компульсивный вариант), которым по показаниям применялся галоперидол в дозе 10 мг/сутки.

В качестве контрольной группы обследовано 20 здоровых лиц в возрасте 25—35 лет с неотяженным неврологическим и психическим анамнезом.

У всех пациентов и лиц контрольной группы для исследований забирали венозную кровь, стабилизировали 3,8%-ным раствором цитрата натрия (соотношение крови и цитрата составляло 9:1).

Для получения богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали 10 мин со скоростью 1000 об./мин при комнатной температуре, для получения бедной тромбоцитами плазмы — 3000 об./мин в течение 15 мин. Агрегация тромбоцитов изучалась с помощью анализатора «Биола» (Москва) турбидиметрическим методом по С. Ворн (1962 г.). Состояние агрегации тромбоцитов оценивали на основе анализа показателя светопропускания. В качестве индукторов использовали адреналин, АДФ (10 мкг/мл), коллаген.

Для исследования характера влияния нейротропных препаратов плазму, богатую тромбоцитами, инкубировали с диазепамом, пропранололом, галоперидолом, флумазенилом, дофамином при температуре 37°C в течение 2 мин. Дозировка препаратов при инкубации составила для диазепама — 10 мкг/мл, пропранолола — 10 и 15 мкг/мл, галоперидола — 10 мкг/мл, флумазенила — 10 мкг/мл.

Статистическая обработка результатов исследований проведена с использованием непараметрических методов W-Вилкоксона (для связанных показателей), Манна—Уитни (для несвязанных показателей).

Результаты исследования

Установлено, что у больных алкоголизмом увеличена максимальная степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Ответ тромбоцитов на другие индукторы — адреналин и коллаген — не отличался от контрольных значений (табл. 1—3).

Через 2 ч после инфузии нейротропных препаратов агрегационный потенциал кровяных пластинок тормозился. Так, введение диазепама снижало АДФ-индуцированную агрегацию с $10,59 \pm 0,8\%$ до $8,63 \pm 0,1\%$ ($p_1 < 0,05$) (табл. 1). При этом увеличи-

Таблица 1

Влияние диазепама через 2 ч после введения на показатели агрегации тромбоцитов у больных алкоголизмом ($M \pm m$)

Показатели	Контроль (n=20)	Больные алкоголизмом (n=6)	
		До введения препарата	После введения препарата
Индуктор агрегации — адреналин			
Максимальная степень агрегации (%)	9,39±0,24	9,76±0,20 $p > 0,05$	7,97±0,44 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$
Время агрегации (мин)	1,41±0,04	1,31±0,009 $p > 0,05$	2,08±0,03 $p < 0,01$ $p_1 < 0,05$
Индуктор агрегации — АДФ			
Максимальная степень агрегации (%)	8,32±0,32	10,59±0,8 $p < 0,05$	8,63±0,18 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$
Время агрегации (мин)	0,49±0,01	0,48±0,01 $p > 0,05$	1,04±0,009 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$
Индуктор агрегации — коллаген			
Максимальная степень агрегации (%)	10,04±0,80	9,43±0,19 $p > 0,05$	8,59±0,15 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$
Время агрегации (мин)	1,22±0,03	1,18±0,01 $p > 0,05$	2,15±0,1 $p < 0,01$ $p_1 < 0,05$
Примечание. p — значимость различий в сравнении с контролем; p_1 — значимость различий в сравнении с периодом до введения препаратов			

Таблица 2

Влияние пропранолола через 2 ч после введения на показатели агрегации тромбоцитов у больных алкоголизмом (M±m)

Показатели	Контроль (n=20)	Больные алкоголизмом (n=6)	
		До введения препарата	После введения препарата
Индуктор агрегации — адреналин			
Максимальная степень агрегации (%)	9,39±0,24	9,92±0,29 p>0,05	8,60±0,19 p<0,05 p ₁ <0,05
Время агрегации (мин)	1,41±0,04	1,34±0,04 p>0,05	1,61±0,08 p<0,01 p ₁ <0,05
Индуктор агрегации — АДФ			
Максимальная степень агрегации (%)	8,32±0,32	10,27±0,57 p<0,05	9,39±0,30 p<0,05 p ₁ <0,05
Время агрегации (мин)	0,49±0,01	0,49±0,01 p>0,05	0,88±0,09 p<0,01 p ₁ <0,05
Индуктор агрегации — коллаген			
Максимальная степень агрегации (%)	10,04±0,80	9,43±0,19 p>0,05	8,96±0,12 p>0,05 p ₁ <0,05
Время агрегации (мин)	1,22±0,03	1,16±0,02 p>0,05	1,67±0,08 p<0,01 p ₁ <0,05
Примечание. p — значимость различий в сравнении с контролем; p ₁ — значимость различий в сравнении с периодом до введения препаратов			

Таблица 3

Показатели агрегации тромбоцитов, при активации различными индукторами у больных алкоголизмом после введения галоперидола через 2 ч в сравнении с контролем (M±m)

Показатели	Контроль (n=20)	Больные алкоголизмом (n=6)	
		До введения препарата	После введения препарата
Индуктор агрегации — адреналин			
Максимальная степень агрегации (%)	9,39±0,24	9,76±0,20 p>0,05	8,77±0,29 p>0,05 p ₁ <0,05
Время агрегации (мин)	1,41±0,04	1,32±0,03 p>0,05	1,75±0,06 p<0,01 p ₁ <0,05
Индуктор агрегации — АДФ			
Максимальная степень агрегации (%)	8,32±0,32	10,17±0,52 p<0,05	9,46±0,43 p>0,05 p ₁ <0,05
Время агрегации (мин)	0,49±0,01	0,48±0,01 p>0,05	0,64±0,07 p<0,05 p ₁ <0,05
Индуктор агрегации — коллаген			
Максимальная степень агрегации (%)	10,04±0,80	9,4±0,19 p>0,05	9±0,64 p>0,05 p ₁ <0,05
Время агрегации (мин)	1,22±0,03	1,14±0,02 p>0,05	1,47±0,05 p<0,05 p ₁ <0,05
Примечание. p — значимость различий в сравнении с контролем; p ₁ — значимость различий в сравнении с периодом до введения препаратов			

валось время агрегации с $0,48 \pm 0,01$ мин до $1,04 \pm 0,009$ мин ($p_1 < 0,05$).

Подобно этому, уменьшалась амплитуда кривой адреналин- и коллагениндуцированной агрегации тромбоцитов и удлинялось ее время ($p_1 < 0,05$).

У пациентов, которым вводили пропранолол и галоперидол, наблюдалась такая же динамика показателей АДФ-, адреналин- и коллагениндуцированной агрегации кровяных пластинок — через 2 ч регистрировалось снижение степени и увеличение времени агрегации ($p_1 < 0,05$) (табл. 2, 3).

Таким образом, психотропные препараты снижают агрегационный потенциал тромбоцитов у больных алкоголизмом. Мы предположили, что влияние лекарственных средств на агрегацию осуществляется непосредственно на кровяных пластинках. В связи с этим следующую серию экспериментов проводили в условиях *in vitro*, для чего богатую тромбоцитами плазму здоровых лиц инкубировали с различными нейротропными препаратами и исследовали агрегационную функцию тромбоцитов (табл. 4).

Установлено, что инкубация плазмы здоровых людей, богатой тромбоцитами, с агонистом бензодиазепиновых рецепторов (диазепам, 10 мкг/мл) отменяла эффект агрегации, несмотря на внесение индукторов агрегации (адреналин, $p < 0,01$; коллаген, $p < 0,01$; АДФ, $p < 0,01$). Внесение в инкубационную среду антагониста бензодиазепиновых рецепторов — флумазенила — не влияло на АДФ-, коллаген-, адреналинндуцированную агрегацию кровяных пластинок ($p > 0,05$) и не отменяло эффект диазепама ($p < 0,01$). Полученные факты можно объяснить тем, что флумазенил является антагонистом центральных бензодиазепиновых рецепторов, которые стереохимически отличаются от периферических. В отличие от него,

диазепам способен связываться как с центральными, так и с периферическими бензодиазепиновыми рецепторами. Поэтому при совместной инкубации кровяных пластинок с флумазенилом и диазепамом выявлено преобладающее действие агониста бензодиазепиновых рецепторов, снижающее агрегационную функцию тромбоцитов.

Внесение в плазму здоровых лиц, богатую тромбоцитами, блокатора D_2 -дофаминовых рецепторов галоперидола также тормозило агрегацию на фоне индукторов различной природы: адреналина ($p < 0,01$), АДФ ($p < 0,01$), коллагена ($p < 0,01$).

Блокатор β -адренорецепторов пропранолол также снижал агрегацию после инкубации с тромбоцитами на традиционные индукторы — адреналин ($p < 0,01$), АДФ ($p < 0,01$) и коллаген ($p < 0,01$). Следует заметить, что пропранолол обладал дозозависимым эффектом: с увеличением дозы препарата уменьшалась амплитуда кривой агрегации.

Обсуждение результатов

Таким образом, обнаружено, что психотропные препараты оказывают влияние на агрегационную функцию тромбоцитов как после их применения по показаниям у больных алкоголизмом, так и в условиях *in vitro* при инкубировании с богатой тромбоцитами плазмой здоровых лиц. В основном, действие препаратов разных групп на агрегацию кровяных пластинок оказалось ингибирующим. Можно предположить, что механизмы торможения агрегации должны быть разными.

Ингибирующее влияние диазепама вызвано ковалентным связыванием препарата с гликопротеиновыми рецепторами $GP IIb/IIIa$, имеющими общую

Таблица 4

Влияние лигандов нейрорецепторов на агрегационную функцию тромбоцитов *in vitro* (максимальная степень агрегации, %) ($M \pm m$)

Контроль (физ. раствор) n=20	Предварительная инкубация с препаратами					
	Пропранолол		Диазепам 10 мкл	Галоперидол 10 мкл	Флумазенил 10 мкл	Флумазенил + диазепам 10 мкл
	15 мкл	20 мкл				
	Индуктор адреналин					
7,51±0,30	2,24±0,29 p<0,01	1,26±0,10 p<0,01	1,27±0,06 p<0,01	1,22±0,05 p<0,01	7,84±0,20 p>0,05	1,27±0,06 p<0,01
	Индуктор коллаген					
8,69±0,47	4,88±0,65 p<0,01	1,64±0,13 p<0,01	1,43±0,06 p<0,01	1,67±0,18 p<0,01	8,71±0,69 p>0,05	1,48±0,09 p<0,01
	Индуктор АДФ					
7,51±0,30	2,24±0,29 p<0,01	1,26±0,10 p<0,01	1,27±0,06 p<0,01	1,22±0,05 p<0,01	7,84±0,20 p>0,05	1,27±0,06 p<0,01
Примечание. p — значимость различий в сравнении с исходной индукцией адреналином — критерий W-Вилкоксона (для связанных независимых)						

RGD-последовательность для связывания с фибриногеном [7]. При этом антагонист флумазенил не отменял действие диазепама. Другой возможный механизм связан с метаболизмом арахидоновой кислоты. При этом диазепам изменяет конформацию мембраны тромбоцита, что сказывается на активности фосфолипазы C, уровне фосфоинозиотида, образовании тромбосана A₂, торможении мобилизации Ca²⁺ и фосфорилировании белка P-47 [16].

Известно, что агрегационная функция тромбоцитов зависит от экспрессии рецепторов к индукторам агрегации и гликопротеиновым рецепторам к фактору фон Виллебранда и фибриногену [2]. В покое кровяная пластинка испытывает тоническое ингибирующее влияние со стороны аденилатциклазной системы: высокий уровень цАМФ в цитозоле препятствует экспрессии этих рецепторов. Растворивание тромбоцитов с последующей агрегацией осуществляется индукторами через соответствующие рецепторы, сигнализация от которых сопряжена с функцией гетеродимерного G-белка. Так, действие катехоламинов на тромбоциты осуществляется через α₂-адренорецепторы, связывание которых с лигандом вызывает торможение активности аденилатциклазы и снижение концентрации цАМФ в цитозоле. Казалось, что под влиянием β-адреноблокатора пропранолола следовало бы ожидать повышение агрегационной функции тромбоцитов, поскольку связывание β-адренорецепторов с агонистами активирует аденилатциклазу и тем самым повышает уровень цАМФ. Однако выявлено, что пропранолол, являясь блокатором β-адренорецепторов сам угнетал адреналин-, коллаген- и АДФ-индуцированную агрегацию кровяных пластинок. Такое действие препарата можно объяснить только тем, что он препятствует диссоциации α- от βγ-субъединиц G-белка, которое приводит не только к торможению ответа β-адренорецепторов, но и других, включая α-адренорецепторы. Именно диссоциация субъединиц G-протеина является необходимым условием активации рецепторов. В поддержку этого утверждения может выступать факт ингибирования агрегационной функции при добавлении не только адреналина, но и АДФ и коллагена, биологические эффекты которых связаны с другими рецепторами и реализуются при условии диссоциации α- от βγ-субъединиц G-белка. Если это утверждение верно, то данное исследование уточняет механизмы сигнализации в кровяной пластинке при действии агонистов адренорецепторов. Подобный механизм торможения вполне вероятен и для блокатора D₂-дофаминовых рецепторов — галоперидола.

Безусловно, фазные колебания нейротрансмиттеров в течение алкогольного цикла [1, 3], а также применяемая психотропная терапия при алкогольной зави-

симости способны влиять на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, через собственный рецепторный аппарат кровяных пластинок. В связи с этим можно полагать, что рецепторы тромбоцитов участвуют в механизмах компенсации нарушений нейрорегуляторных влияний у больных алкогольной зависимостью, так как их экспрессия изменяется в зависимости от уровня нейрогуморального регулятора в микроокружении, увеличиваясь при снижении и уменьшаясь при повышении концентрации лиганда в микросреде [5].

Выводы

У больных 2-й стадией алкоголизма в период абстиненции повышается АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов. Применение препаратов, блокирующих D₂-дофаминовые рецепторы и β-адренорецепторы — галоперидола и пропранолола, а также агониста бензодиазепиновых рецепторов — диазепама — уменьшают агрегационный потенциал тромбоцитов.

Агрегация тромбоцитов регулируется периферическим нейрорецепторным аппаратом. Инкубация *in vitro* плазмы здоровых лиц, богатой тромбоцитами с галоперидолом, пропранололом, диазепамом тормозят АДФ-, коллаген- и адреналин-индуцированную агрегацию. Внесение в инкубационную среду антагониста флумазенила не отменяет ингибирующее действие агониста бензодиазепиновых рецепторов диазепама на агрегацию тромбоцитов.

Благоприятное действие психотропных препаратов на психическое и соматическое состояние больных алкогольной зависимостью обусловлено действием психотропных препаратов как на центральную нервную систему, так и на периферическую кровь.

Список литературы

1. Анохина И.П. Основные биологические механизмы алкогольной и наркотической зависимости // Руководство по наркологии / Под ред. Н.Н. Иванца. — М.: Медпрактика, 2002. — Т. 1. — С. 33—41.
2. Баркаган З.С., Момот А.П. Основы диагностики нарушений гемостаза. — М.: Ньюдиамед-АО, 1999. — 224 с.
3. Даренский И.Д. Аддиктивный цикл. — М.: Логос, 2008. — 265 с.
4. Зинченко В.П., Долгачева Л.П. Внутриклеточная сигнализация. — Пушкино, 2003.
5. Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммунофизиология. — М.: Изд-во ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 2005. — 160 с.
6. Шушпанова Т.В., Семке В.Я. Периферические бензодиазепиновые рецепторы тромбоцитов при алкоголизме // Журнал неврологии и психиатрии. — 2006. — №11. — С. 53—56.
7. Blackburn B., Mcdowell R., Gadek T., Webb R. Benzazepine platelet aggregation inhibitors having specificity for the GPIIb/IIIa receptor. — US Patent 5403836. — 1995. — Apr. 4.
8. Braunstein K.M., Sarji K.E., Kleinfelder J., Schraibman H.B., Colwell J.A., Eurenus K. The effects of dopamine on hu-

man platelet aggregation, in vitro // Pharmacol. Exp. Ther. — 1977. — Vol. 200(2). — P. 449—457.

9. Choppin A., Berry C.N. Peripheral benzodiazepine ligands inhibit aggregation and thromboxane synthesis induced by arachidonic acid in rabbit platelets in vitro // Thromb. Res. — 1995. — Vol. 78(4). — P. 293—302.

10. Emerson M., Paul W., Clive P., Page C.P. Regulation of platelet function by catecholamines in the cerebral vasculature of the rabbit // Br. J. Pharmacol. — 1999. — Vol. 127(7). — P. 1652—1656.

11. Rajtar G., Zolkowska D., Kleinrok Z. Effect of diazepam and clonazepam on the function I of isolated rat platelet and neutrophil // Med. Sci. Monit. — 2002. — Vol. 8(4). — P. 137—144.

12. Kerry R., Scrutton M.C. Platelet β -adrenoceptors // Br. J. Pharmacol. — 1983. — Vol. (79). — P. 681—691.

13. Knight C.J., Panesar M., Wilson D.J., Chronos N.A., Patel D., Fox K., Goodall A.H. Different effects of calcium antagonists, nitrates, and beta-blockers on platelet function. Possible importance for the treatment of unstable angina // Circulation. — 1997. — Vol. 95(1). — P. 125—132.

14. Lanza F., Cazenave J.P. Studies on α_2 -adrenergic receptors on intact and functional washed human platelets by binding of ^3H -dihydroergocryptine and ^3H -yohimbine-correlation of ^3H -yohimbine binding with the potentiation by adrenaline of ADP-induced aggregation // Thromb. Haemost. — 1985. — Vol. 54. — P. 402—408.

15. Schedel A., Schloss P., Kluter H., Bugert P. Dopamine is a coactivator for platelet adhesion to collagen and acts via D_2 -like receptors // J. Thromb. Haemost. — 2007. — Vol. 5. — Suppl. 2. — P. W—270.

16. Sheu J.R., Hsiao G., Luk H.N., Chen Y.W., Chen T.L., Lee L.W., Lin C.H., Chou D.S. Mechanisms Involved in the Antiplatelet Activity of Midazolam in Human Platelets // Anesthesiology. — 2002. — Vol. 96 (3). — P. 651—658.

17. Steen V.M., Holmsen H., Aarbakke G. The platelet-stimulating effect of adrenaline through α_2 -adrenergic receptors requires simultaneous activation by a true stimulatory platelet agonist // Thromb. Haemost. — 1993. — Vol. 70. — P. 506—513.

NEUROTHROPIC DRUGS INFLUENCE ON PLATELET AGGREGATION IN PATIENTS WITH ALCOHOLISM

SHAMANSKAYA M.G., DARENSKY I.D., VITKOVSKY YU.A.

In abstinence of patients with 2nd stage of alcoholism the neurothropic drugs influence on platelet aggregation was studied. It was established that their ADP-induced aggregation increased. Administration of drugs blocking the D_2 -dopamine and β adrenoceptors — haloperidol and propranolol, and agonist of benzodiazepine receptors — diazepam decreased the platelet aggregation. It was suggested that platelet aggregation have regulating by peripheral neuroreceptors. It was observed that in vitro incubation of platelet enriched plasma of healthy objects with haloperidol, propranolol, diazepam inhibited ADP-, collagen- and adrenalin-induced aggregation. Adding of antagonist flumazenil into incubating surrounding did not brake the inhibiting action of diazepam the agonist of benzodiazepine receptors on platelet aggregation.

Key words: alcoholic dependence, platelets, platelet aggregation