УДК 616.151.5:615.273.53

Сравнение двух методов лабораторной оценки агрегации тромбоцитов и резистентности к антиагрегантной терапии

А.А. Шабалина[1], Е.В. Ройтман[2], М.М. Танашян[1]

[1]ФГБНУ «Научный центр неврологии»; Россия, 125367 Москва, Волоколамское шоссе, 80;
[2]ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Введение. Метод Борна стал «золотым стандартом» тромбоцитарной агрегометрии вполне заслуженно: он исторически был разработан первым, первым же вошел в клиническую практику и за счет этого приобрел самую обширную доказательную базу. Имеющиеся сведения наглядно демонстрируют его достоинства и недостатки. Метод Platelet Function Analysis (PFA) был разработан значительно позднее, но во многом в ответ на ограничения метода Борна и в соответствии с клиническим требованием иметь в практике point-of-care метод оценки агрегационной активности тромбоцитов. Особенностью PFA является оценка агрегационного ответа тромбоцитов текущей (это важно!) цельной крови в условиях имитации повреждения сосудистой стенки мелких сосудов.

Цель исследования: изучить соответствие результатов теста PFA данным, получаемым с помощью «золотого стандарта» — агрегатометрии по Борну, а также определить причины и диагностическое значение расхождений.

Материалы и методы. Обследован 51 пациент (28 мужчин и 23 женщины) с хронической цереброваскулярной патологией. Из них 35 человек получали *per os* препараты ацетилсалициловой кислоты (АСК) в дозе 100–150 мг/сут (группа 1), а 16 пациентов — клопидогрел в дозе 75 мг/сут (группа 2). Кроме того, 20 человек, получавших АСК, были обследованы дважды: до начала приема и через 14 дней. Все пациенты были обследованы по следующим показателям: концентрация гемоглобина, количество тромбоцитов, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), содержание общего белка, глюкозы, триглицеридов и общего холестерина. Также определяли коагулологические показатели: активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время с расчетом международного нормализованного отношения, уровень фибриногена и концентрацию Д-димера методом латексных частиц с высоко специфичными моноклональными антителами к Д-димеру на автоматическом коагулометре ACL ElitePro (США) с использованием наборов реагентов фирмы Instrumentation Laboratory (США).

Результаты. Группы оказались практически одинаковыми по возрасту, наличию и выраженности фонового воспалительного процесса и состоянию системы гемостаза. Оценка агрегации тромбоцитов в ответ на АДФ и адреналин у пациентов до начала приема АСК в дозе 150 мг/сут и через 2 нед не выявила противоречивых данных и показала, что оба метода отчетливо регистрируют ее угнетение. На фоне приема АСК результаты агрегометрии тромбоцитов обоими методами с индуктором АДФ совпали с коэффициентом корреляции $r = 0{,}74$ ($p < 0{,}05$), с индуктором адреналин — с коэффициентом $r = 0{,}63$ ($p < 0{,}05$). На фоне приема клопидогрела результаты АДФ-индуцированной агрегометрии, полученные обоими методами, совпадали с большим коэффициентом корреляции: $r = 0{,}82$ ($p < 0{,}05$), адреналин-индуцированной агрегации — $r = 0{,}88$ ($p < 0{,}05$). Корреляционный анализ выявил зависимость результатов, получаемых каждым методом на фоне приема АСК или клопидогрела, от следующих параметров: возраст, концентрация фибриногена, количество тромбоцитов и СОЭ, что в большей степени проявилось для PFA.

Заключение. Очевидно, что метод Борна показывает лишь то, насколько тромбоциты в целом чувствительны к действию ингибитора агрегации, тогда как метод PFA демонстрирует реальную картину образования сгустка на фоне всех имеющихся условий, т.е. как результат всего многообразия взаимодействий тромбоцитов *per se* в цельной крови. Другими словами, метод PFA отражает общий уровень тромбогенности, которая, в свою очередь, очевидно является причиной так называемой резистентности к антиагрегантам, нередко наблюдаемой у данной категории больных.

Ключевые слова: *агрегация тромбоцитов, Platelet Function Analysis, резистентность к антиагрегантам, хроническая цереброваскулярная патология.*

DOI: 10.25555/THR.2019.3.0892

The comparison between two methods of laboratory evaluation for platelet aggregation and for resistance to antiplatelet therapy

Alla A. Shabalina[1], Eugene V. Roitman[2], Marine M. Tanashyan[1]

[1]Research Center of Neurology; 80 Volokolamskoe shosse, Moscow 125367, Russia;
[2]Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Health Ministry of Russian Federation; 1 ul. Ostrovityanova, Moscow 117997, Russia

Introduction. Born's method became the "gold standard" of platelet aggregometry because it has been developed historically the first. On today it has the most extensive evidence base showing clearly its advantages and disadvantages. The Platelet Function Analysis (PFA) is a method developed much later as a response to the limitations of the Born's method in order to have a point-of-care platelet aggregometry in practice. The main feature of PFA is the evaluation of platelet aggregation occurring in flowing whole blood under conditions simulating vascular wall damage.

Aim: to study the compliance between PFA test results and the data obtained by Born's aggregatometry as well as to determine the causes and diagnostic value of their discrepancies.

Materials and methods. The study included 51 patients (28 men and 23 women) with chronic cerebrovascular pathology, from them 35 were intaking acetylsalicylic acid, ASA (100–150 mg/day *per os*, group 1), and clopidogrel in 16 patients (75 mg/day *per os*, group 2). In addition, 20 patients with ASA were examined twice as before as well as in 14 days. Lab testing included hemoglobin, platelet count, erythrocyte sedimentation rate, total protein, glucose, triglyceride, total cholesterol, activated partial thromboplastin time, prothrombin time as international normalized ratio, fibrinogen and D-dimer with using of ACL ElitePro coagulometer and reagents kits by Instrumentation Laboratory (USA).

Results. The groups were appeared almost identical in age, the severity of the background inflammatory and the clotting conditions. Both methods have registered clearly platelet aggregation inhibition in 2 weeks of ASA administration both in response to ADP and to epinephrine, and no any disagreements was found between the methods. By ASA administration the ADP-induced aggregations from Born's method and PFA showed the correlation $r = 0.74$ ($p < 0.05$), the epinephrin-induced aggregations have coincided with $r = 0.63$ ($p < 0.05$). In cases with clopidogrel we found large correlation coefficients as $r = 0.82$ ($p < 0.05$) and $r = 0.88$ ($p < 0.05$) between ADP-induced aggregations and between epinephrin-induced aggregations, respectively. The correlation analysis revealed that the results obtained by each method were closely related to parameters such as age, fibrinogen, platelet count and erythrocyte sedimentation rate, and that was more evident for PFA.

Conclusion. Obviously, the Born's method shows only how platelets are sensitive generally to the antiaggregation agents, whereas the PFA method plots a real picture of clot formation against all available conditions, i.e. as a result of the whole variety of platelet interactions *per se* in whole flowing blood. It does mean the PFA method reflects the overall level of thrombogenicity. In turn that is obviously the cause of the so-called resistance to antiplatelets observed often in such category of patients.

Key words: *platelet aggregation, Platelet Function Analysis, resistance to antiplatelet agents, chronic cerebrovascular disease*

DOI: 10.25555/THR.2019.3.0892

ВВЕДЕНИЕ

Современный лабораторный арсенал предлагает большое количество средств и методов для оценки функционального состояния тромбоцитов и оценки эффективности антиагрегантной терапии. «Золотым стандартом» является определение агрегации тромбоцитов в ответ на различные индукторы по методу Борна — метод, предполагающий выполнение обязательного этапа пробоподготовки с центрифугированием цельной крови для выделения фракции тромбоцитов — богатой тромбоцитами плазмы (БТП).

Специфическая пробоподготовка позволяет получать образцы, содержащие тромбоциты, т. е. непосредственно интересующий объект исследования. Оборотной стороной наличия этапа пробоподготовки является потеря естественного окружения тромбоцитов и всего комплекса их многогранного взаимодействия с плазмой крови и другими форменными элементами. Другими словами, образец представляет собой искусственную систему, которая практически утрачивает в своем роде «физиологичность».

Развитие лабораторной медицины привнесло в практику методы рутинного изучения агрегационной активности тромбоцитов из цельной крови (импедансная агрегометрия, тромбоэластография), каждый из которых обладает своими достоинствами и ограничениями, связанными с трудоемкостью и продолжительностью выполнения. Свою нишу нашли также методы point-of-care (POC), основными задачами которых являются в первую очередь выявление присутствия антиагрегантных препаратов в крови и/или оценка выраженности эффекта последних, в том числе резистентности тромбоцитов к действию антиагрегантов, и/или выявление остаточной реактивности тромбоцитов на фоне приема таких препаратов.

Несколько особняком среди POC-методов характеристики тромбоцитарной агрегации стоит метод Platelet Function Analysis (PFA), суть которого сводится к оценке агрегационного ответа тромбоцитов текущей (это важно!) цельной крови в условиях имитации повреждения сосудистой стенки мелких сосудов. Другими словами, в картридже прибора за счет присасывающего давления создается поток цельной крови по трубке, в конце которой имеется мембрана с отверстием (апертурой). Мембрана в свою очередь покрыта коллагеном и одним из индукторов тромбоцитарной агрегации — АФД или адреналином (картриджи COL/ADP и COL/EPI, соответственно). Контакт крови с такой мембраной вызывает активацию тромбоцитов, их адгезию и агрегацию и образование тромбов, которые перекрывают отверстия мембраны и останавливают ток крови. Поэтому результатом теста PFA является так называемое время закрытия (Closure Time, CT), выражаемое в секундах. В определенной степени тест PFA можно рассматривать как близкий аналог теста «время кровотечения». Как следствие, при наличии условий априори «стандартизованной» имитации повреждения сосудистой стенки (коллаген, АДФ и адреналин, уже нанесенные на мембрану) результат теста PFA собственно и будет зависеть только от функциональной активности тромбоцитов *per se* — их реактивности и других параметров, сложившихся как комплекс их взаимодействий в цельной текущей крови. Но и, разумеется, под влиянием тех или иных антиагрегатных агентов.

Состав покрытия мембраны достаточно очевиден: коллаген является активатором агрегации тромбоцитов, появляющийся при повреждении сосудистой стенки. АДФ локализуется в плотных гранулах тромбоцитов, и под действием индуктора АДФ «извне» происходит выделение АДФ и других активаторов агрегации из альфа-гранул, т. е. тромбоцит активирует сам себя с из-

менением формы, дегрануляции и агрегации. Адреналин же при контакте с тромбоцитами взаимодействует с a_2-адренорецепторами, что ингибирует аденилатциклазу. Возможно, что механизм, лежащий в основе реализации эффекта адреналина и развития первой волны агрегации, не зависит от образования тромбоксана A_2, а связан со способностью адреналина прямо изменять проницаемость клеточной мембраны для ионов кальция. Вторичная агрегация при индукции процесса адреналином возникает как результат реакции высвобождения и продукции тромбоксана A_2 [1].

Такие комбинации индукторов агрегации с коллагеном исходно предназначены для оценки эффективности антиагрегантной терапии (в частности, перед эндоваскулярными операциями на сосудах головного мозга и брахиоцефальных сосудах с использованием стентов), детекции тромбоцитарных дисфункций, вызванных приемом клопидогрела, и выявления тромбоцитарной гиперфункции как маркера риска тромбозов и будущих мишеней для терапии.

Однако вполне очевидны вопросы о соответствии результатов теста PFA данным, получаемым с помощью «золотого стандарта» — агрегатометрии по Борну, а также в случае их расхождения, понимания причин и диагностического значения последнего.

Цель исследования: изучить соответствие результатов теста PFA данным, получаемым с помощью «золотого стандарта» — агрегатометрии по Борну, а также определить причины и диагностическое значение расхождений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследован 51 пациент (28 мужчин и 23 женщины; медиана возраста — 65,5 лет, минимальный возраст — 44 года, максимальный — 81 год) с хронической цереброваскулярной патологией в рамках общего клинического обследования при поступлении на лечение в ФГБНУ «НЦН».

Из них 35 человек получали *per os* препараты ацетилсалициловой кислоты (АСК) в дозе 100–150 мг/сут (группа 1), а 16 пациентов — клопидогрел в дозе 75 мг/сут (группа 2). Назначение препаратов АСК и клопидогрела проведено в соответствии с рекомендациями Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) [2], а также с рекомендациями по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторными ишемическими атаками Европейского (ESO, 2008) и Американского обществ по инсульту (AHA, ACCP) [3–5].

Кроме того, 20 человек (10 мужчин и 10 женщин, медиана возраста — 70,5 лет), получавших АСК, были обследованы дважды: до начала приема и через 14 дней.

Определение степени агрегации тромбоцитов с индукторами АДФ (АДФ-АТ) и адреналин (Адр-АТ) по методу *G. Born* проводили по стандартной схеме на лазерном агрегометре «Биола» (Россия). Параллельно выполняли тест PFA с использованием картриджей, несущих те же индукторы агрегации — COL/ADP и COL/EPI соответственно, на анализаторе PFA-200 (Сименс, Германия). Результатом теста PFA является время закрытия апертуры (Closure Time, CT).

Дополнительно все пациенты были обследованы по следующим показателям: концентрация гемоглобина, количество тромбоцитов, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), содержание общего белка, глюкозы, триглицеридов и общего холестерина. Также определяли коагулологические показатели: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время с расчетом международного нормализованного отношения (МНО), уровень фибриногена и концентрацию Д-димера методом латексных частиц с высоко специфичными моноклональными антителами к Д-димеру на автоматическом коагулометре ACL ElitePro (США) с использованием наборов реагентов фирмы Instrumentation Laboratory (США).

Статистический анализ данных и математическая обработка проведены с использованием программы Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica 10 (StatSoft Inc., США) на Intel-совместимом компьютере. Использованы параметрические и непараметрические методы анализа, описательная статистика с вычислением медианы (Me) и стандартного отклонения (σ). Для определения взаимного влияния показателей использовали корреляционный анализ с применением критерия Пирсона (с целью определения взаимного влияния между количественными показателями). Для оценки значимости различий между группами использовали критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне ошибки $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение групп по состоянию гомеостаза пациентов не выявило достоверных различий (**табл. 1**).

Как можно видеть, группы оказались практически одинаковыми по возрасту, наличию и выраженности фонового воспалительного процесса и состоянию системы гемостаза.

Таблица 1 / Table 1

Показатели гомеостаза в группах обследованных пациентов (Me; σ)

Homeostasis parameters in groups of examined patients (Me; σ)

Показатель	Группа 1 (n = 35)	Группа 2 (n = 16)	p
Возраст, лет	66,0; 7,5	66,0; 6,2	> 0,05
Гемоглобин, г/л	118,0; 18,1	110,5; 13,0	> 0,05
СОЭ, мм/ч	20,0; 13,5	19,0; 6,9	> 0,05
АЧТВ, с	28,4; 3,84	28,70; 3,05	> 0,05
МНО	1,086; 0,460	1,078; 0,490	> 0,05
Фибриноген, г/л	3,66; 0,60	4,15; 0,77	> 0,05
Д-димер, нг/л	290,0; 110,4	302,0; 203,9	> 0,05
Тромбоциты, × 10^9/л	184,0; 63,5	211,5; 39,1	> 0,05

 ISSN 2078-1008

Оба метода отразили снижение агрегационной активности тромбоцитов. Однако в тесте по Борну это проявилось более отчетливо, особенно для АДФ-индуцированной агрегации (**табл. 2**).

Как было отмечено выше, тест PFA в определенной степени можно рассматривать как некий аналог теста «время кровотечения», поэтому действие антиагрегантов закономерно должно удлинять его результаты, т. е. перекрытие апертуры картриджа сгустками, образующимися на перекрывающей ее мембране, должно происходить позднее. Однако таких ожидаемых результатов выявлено не было. Более того, медиана значений времени закрытия CT у пациентов, принимавших АСК, оказалось даже короче величины нижней границы нормального диапазона. К тому же можно отметить, что клопидогрел в назначенной дозе также в меньшей степени угнетал тромбоцитарную агрегацию, чем ожидалось.

Объяснения данным наблюдениям достаточно просты: образование сгустка является результатом работы всей системы гемостаза, в которой тромбоциты являются всего лишь одним из ее компонентов. Действие антиагрегантов не приводит к тому, что тромбоцит становится абсолютно интактным агентом в отношении межмолекулярных взаимодействий с мембранами других клеток и белками, в том числе собственно факторами свертывания крови. Кроме того, антиагреганты не снижают количество циркулирующих тромбоцитов, т. е. площадь контактной поверхности, на которой происходят реакции свертывания, также не изменяется.

Тогда в качестве комментария следует заметить, что метод Борна показывает лишь то, насколько тромбоциты в целом чувствительны к действию ингибитора агрегации. А метод PFA демонстрирует реальную картину образования сгустка на фоне всех имеющихся условий.

Как следствие, полученные результаты (**табл. 2**) свидетельствуют, что только угнетение тромбоцитарной агрегации может оказаться недостаточным условием для снижения общей тромбогенности. Более того, данные факты позволяют предположить о наличии у ряда пациентов резистентности к антиагрегантам, и этот аспект требует дальнейшего изучения и пересмотра протокола обследования с включением определения индивидуальной чувствительности тромбоцитов к антитромбоцитарным препаратам. Резистентность к антиагрегантам, в частности к АСК, возможно определить как лабораторный или клинический феномен [6, 7]. «Лабораторная резистентность» к антитромбоцитарным лекарствам определяется как недостаточное блокирование остаточной реактивности тромбоцитов (в частности, ассоциированной с продуцируемым тромбоксаном A_2) в исследованиях *in vitro*, несмотря на использование антитромбоцитарных лекарств [8, 9]. Клиническая же резистентность представляет развитие на фоне приема АСК атеротромботических событий; последнее можно отнести также к понятию «клинического неуспеха терапии антиагрегантами» [9, 10].

Распространенность этого явления варьирует в достаточно широких пределах — от 2 до 43% [2, 10, 11], и связано это в первую очередь с отсутствием общепринятой методики оценки указанного состояния и широкой вариабельностью результатов.

Таблица 2 / Table 2

Агрегация тромбоцитов в группах обследованных пациентов (Me; σ)

Platelet aggregation in groups of examined patients (Me; σ)

Агрегация тромбоцитов	Нормальные значения	Группа 1 (n = 35)	Группа 2 (n = 16)
АДФ-АТ,%	60–90	28,0; 8,6	38,0; 17,3
Адр-АТ,%	40–70	25,0; 7,6	41,5; 19,4
COL/ADP, с	90–115	81,0; 16,1	100,0; 27,6
COL/EPI, с	140–190	126,0; 25,9	160,5; 43,2

Также оценивая результаты, представленные в **таблице 2**, создается впечатление, что тест PFA слабее отражает антиагрегатное действие АСК и особенно клопидогрела. Однако такое впечатление, по нашему мнению, очевидно ошибочно, если сразу вспомнить, что определение степени агрегации тромбоцитов по методу Борна проводится в образцах БТП, т. е. в искусственной аналитической системе, лишенной комплекса взаимодействий тромбоцитов с другими клетками крови и с намеренно созданной концентрацией тромбоцитов, существенно превышающей таковую в циркулирующей крови. В свою очередь, образец для исследования в тесте PFA — это цельная венозная кровь, взятая в системы с забуференным 3,8%-м цитратом натрия, т. е. возможно говорить о минимизации различий микроокружения тромбоцитов между циркулирующей кровью и условиями теста PFA (в картридже). К слову, проба с цельной кровью является одним из основных требований к тестам (методам) POC.

Корреляционный анализ выявил зависимость результатов, получаемых обоими методами на фоне приема АСК и клопидогрела, от следующих параметров: возраст, концентрация фибриногена, количество тромбоцитов и СОЭ (**табл. 3**).

Полученные данные достаточно легко объяснимы. Более важным представляется то, что в большинстве случаев коэффициенты корреляции для теста PFA оказались выше, чем для метода Борна. Тем самым подтверждается предположение, что тест PFA в большей степени отражает реальную ситуацию, т. е. результат всего многообразия взаимодействий тромбоцитов *per se* в цельной крови.

Отдельно были изучены вопросы совпадения результатов, получаемых обоими методами детекции.

Так, на фоне приема АСК результаты агрегометрии тромбоцитов с индуктором АДФ совпали с коэффициентом корреляции $r = 0{,}74$ ($p < 0{,}05$). Для понимания того, что привело к такой низкой корреляции, которая *apriori* ожидалась несколько выше, были изучены так называемые остатки регрессии (остатки регрессии — это разности между наблюдаемыми значениями и значениями, предсказанными изучаемой регрессионной моделью) [12], а именно, влияние на них таких параметров как

Таблица 3 / Table 3

Коэффициенты корреляции результатов агрегометрии с другими изученными параметрами

Correlation coefficients of aggregometry results with other examined parameters

Параметр	Группа 1				Группа 2			
	АДФ-АТ	COL/ADP	Адр-АТ	COL/EPI	АДФ-АТ	COL/ADP	Адр-АТ	COL/EPI
Возраст	0,35	0,36	0,08	0,35	0,13	0,296	0,13	0,07
Тромбоциты	0,23	0,22	0,12	0,13	0,34	0,20	0,11	0,25
Фибриноген	0,20	0,15	0,16	0,04	0,598	0,49	0,67	0,63
СОЭ	0,38	0,01	0.39	0,57	0,03	0,01	0,02	0,07

Примечание: $p < 0,05$ для всех значений.
Note: $p < 0.05$ for all values.

возраст, концентрация фибриногена, количество тромбоцитов и СОЭ. Установлено, что основное влияние на остатки оказала величина СОЭ ($r = 0,68$; $r^2 = 0,46$; $p < 0,05$).

Для адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов на фоне приема АСК данные обоих методов коррелировали между собой с коэффициентом $r = 0,63$ ($p < 0,05$), т. е. еще меньшим, чем для АДФ-индуцированной агрегации. Анализ остатков регрессии выявил их преимущественную зависимость от возраста пациента ($r = 0,32$; $p < 0,05$) и концентрации фибриногена ($r = 0,20$; $p < 0,05$); остальные детерминанты оказались незначимы.

По некоторым литературным данным, частота резистентности к антиагрегантам отличается в зависимости от используемой тест-системы [13]. Кроме того, существует физиологическая вариабельность ответа тромбоцитов на индукторы тромбообразования вне зависимости от назначения антиагреганта.

Данный факт наводит на попутное размышление о причинах индивидуальной неэффективности АСК, т. е. «аспиринорезистентности», которая может скрываться в том, что АСК является не только и даже не столько антиагрегантным агентом. Не следует забывать, что АСК обладает крайне широким спектром эффектов, прежде всего связанных с ее противовоспалительным действием [14]. Другими словами, одна и та же доза АСК может расходоваться по-разному в зависимости от состояния (запросов, потребностей) организма.

На фоне приема клопидогрела результаты АДФ-индуцированной агрегометрии, полученные обоими методами, совпадали с бóльшим коэффициентом корреляции: $r = 0,82$ ($p < 0,05$), чем на фоне приема АСК. При этом на остатки регрессии преимущественное влияние оказывал возраст больного ($r = 0,33$; $p < 0,05$).

Данные адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов на фоне клопидогрела совпали еще плотнее: $r = 0,88$; $r^2 = 0,78$ ($p < 0,05$). Однако здесь для остатков регрессии значимым оказалось только количество тромбоцитов ($r = 0,32$; $p < 0,05$), что, по-видимому, также отражало эффективность антиагрегантного действия назначенной дозы клопидогрела; т. е. в крови осталось большое количество тромбоцитов, не подвергшихся действию этого препарата, или, другими словами, количества клопидогрела элементарно не хватило для охвата всего пула тромбоцитов или даже его большей части.

Представленные выше данные в значительной степени отразили резистентность к антиагрегантам. Однако они нисколько не предполагают «глобальных измышлений» о том, что «препараты не работают», «препараты плохие» и т. п.

Оценка агрегации тромбоцитов в ответ на АДФ и адреналин у пациентов до начала приема АСК в дозе 150 мг/сут и через 2 нед не выявила противоречивых данных и показала, что оба метода отчетливо регистрируют ее угнетение (**табл. 4**).

И в то же время данные такого сравнительного анализа не противоречат приведенным выше рассуждениям. Если оценить, насколько изменилась агрегация тромбоцитов в ответ на индукторы (например, в %), то оба метода продемонстрировали сравнимые результаты. Так, метод Борна выявил, что АСК «вывела» из агрегационного ответа чуть более половины тромбоцитов, исходно чувствительных к этому антиагреганту. А тест

Таблица 4 / Table 4

Агрегационный ответ тромбоцитов до и через 14 суток приема ацетилсалициловой кислоты в дозе 150 мг/сут (Me; σ)

Platelet aggregation response before and after 14 days of taking acetylsalicylic acid at a dose of 150 mg/day (Me; σ)

Параметр	До приема АСК	Через 14 суток	p	% изменения
Тромбоциты, × 10^9/л	189,5; 71,8	184,5; 73,6	> 0,05	2,64
АДФ-АТ,%	64,5; 9,53	29,5; 7,3	< 0,05	54,3
Адр-АТ,%	62,0; 8,86	25,5; 7,04	< 0,05	58,9
COL/ADP, с	75,5; 16,7	138,5; 12,66	< 0,05	45,5
COL/EPI, с	119,5; 31,5	236,5; 21,3	< 0.05	49,5

PFA показал то же самое, но в значениях чуть меньше половины, т. е. в детекции антиагрегантного ответа оба метода ничем друг другу не уступают.

В настоящее время наиболее вероятными причинами резистентности к АСК признаны: усиление образования метаболитов арахидоновой кислоты по липооксигеназному пути, приводящих к ингибированию синтеза простациклина в эндотелиальных клетках, несмотря на снижение продукции тромбоксана A_2 [11]; полиморфизм гена циклооксигеназы, приводящий к синтезу аспиринчувствительной или аспиринорезистентной изоформ фермента [15]; полиморфизм гена гликопротеина GP IIb/IIIa, обусловливающий синтез гликопротеинов с повышенным сродством к фибриногену [16]; дисфункция эндотелия, сопровождающаяся повышением активности фактора Виллебранда и снижением уровня простациклина [17]; гиперхолестеринемия, увеличивающая ригидность мембран тромбоцитов и ухудшающая чувствительность гликопротеиновых рецепторов.

Агрегация тромбоцитов при использовании индукторов агрегации — АДФ и адреналина — опосредована активацией пуринергических и адренергических рецепторов и осуществляется через систему G-протеинов. АДФ связывается с двумя G-белками рецепторов P2Y1 и P2Y12. Связывание АДФ с рецептором P2Y1 вызывает изменение формы и инициирует агрегацию тромбоцитов (первичную волну) за счет мобилизации кальция. Рецептор P2Y12 считается основным АДФ-рецептором и ответственным за полную агрегацию тромбоцитов через ингибирование аденилциклазы [18]. Вторая волна АДФ-индуцированной агрегации должна подавляться АСК и в большей степени клопидогрелом, так как рецептор P2Y12 является также мишенью для клопидогрела [1].

Адреналин связывается с α_2-адренергическим рецептором на поверхности тромбоцитов, что приводит к ингибированию аденилциклазы и высвобождению ионов кальция. Агрегация тромбоцитов с адреналином визуально аналогична агрегации с АДФ с наличием начальной первичной волны агрегации, высвобождением сохраненного АДФ из тромбоцитов и второй волны необратимой агрегации. Как и с АДФ, эта вторая волна агрегации должна подавляться АСК.

Возможно, в формировании резистентности тромбоцитов к антиагрегантам играет роль дисфункция эндотелия и изменение мембранных характеристик тромбоцитов, при которых нарушается ацетилирование циклооксигеназы, проницаемость клеточной мембраны для ионов кальция и блокада рецепторов тромбоксана A_2 [19–21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод Борна стал «золотым стандартом» тромбоцитарной агрегометрии вполне заслуженно: он исторически был разработан первым, первым же вошел в клиническую практику и за счет этого приобрел самую обширную доказательную базу. Имеющиеся сведения наглядно демонстрируют его достоинства и недостатки. Метод Platelet Function Analysis был разработан значительно позднее, но во многом в ответ на ограничения метода Борна и в соответствии с клиническим требованием иметь в практике point-of-care метод оценки агрегационной активности тромбоцитов.

Полученные нами результаты продемонстрировали в целом идентичность обоих методов как средств оценки ответа на терапию антиагрегантами. Но при этом также акцентировали внимание на особенностях каждого метода как с точки зрения лабораторной техники, так и с точки зрения понимания, трактовки получаемых данных.

Метод PFA, вероятно, единственный, который в одном приборе дает возможность оценить этапы как адгезии, так и агрегации тромбоцитов, формируя тем самым основное отличие от метода Борна. За счет этого результат теста PFA становится в своем роде близким аналогом теста «время кровотечения», более реалистично отражает уровень тромбогенности на фоне приема антиагрегантов. Мы полагаем это крайне важным, поскольку именно общий уровень тромбогенности как совокупность всех условий, предрасполагающих к тромбообразованию, определяет риск тромботических осложнений.

В этой связи остается актуальным вопрос об адекватности, достаточности назначений антиагрегантов вообще и в дозах, установленных действующими рекомендациями. Вполне очевидно, что данный вопрос требует уточнения, которое невозможно без сочетания клинических и лабораторных исследований. А последние, в свою очередь, потребуют выбора методов, адекватно отражающих состояние не столько отдельных компонентов системы гемостаза, сколько совокупность всех условий, определяющих высокий уровень тромбогенности у данной категории больных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare there is no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев С.А., Мелкумян А.Л., Берковский А.Л. и др. Клинико-лабораторная диагностика нарушений функции тромбоцитов. Методическое руководство. *М.*, 2013. 76 с. Режим доступа: http://www.renam.ru/wp-content/uploads/2017/02/Issledovanie-agregacii-trombocitov.pdf.
2. Косарев В.В., Бабанов С.А. Антиагреганты: клинико-

REFERENCES

1. Vasiliev S.A., Melkumyan A.L., Berkovsky A.L. et al. Clinical and laboratory diagnosis of platelet dysfunction. Methodological guideline. [Kliniko-laboratornaya diagnostika narushenij funkcii trombocitov. Metodicheskoe rukovodstvo]. *Moskva*, 2013. 76 s (in Russ.). Available at: http://www.renam.ru/wp-content/uploads/2017/02/Issledovanie-agregacii-trombocitov.pdf.
2. Kosarev V.V., Babanov S.A. Antiplatelet agents: clinical and phar-

фармакологические подходы к применению при ишемической болезни сердца. *РМЖ.* 2009;18(9):1172–6.

3. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25(5):457–507. DOI: 10.1159/000131083.
4. Jauch E.C., Saver J.L., Adams H.P. et al; American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Peripheral Vascular Disease, Council on Clinical Cardiology Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2013;44(3):870–947. DOI: 10.1161/STR.0b013e318284056a.
5. Meschia J.F., Bushnell C., Boden-Albala B. et al; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Functional Genomics and Translational Biology; Council on Hypertension. Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2014;45(12):3754–832. DOI: 10.1161/STR.0000000000000046.
6. Hankey G.J., Eikelboom J.W. Aspirin resistance. *Lancet.* 2006;367(9510):606–17. DOI: 10.1016/S0140–6736(06)68040–9.
7. Krasopoulos G., Brister S.J., Beattie W.S., Buchanan M.R. Aspirin resistance and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2008;336(7637):195–8. DOI: 10.1136/bmj.39430.529549.BE.
8. Michelson A.D., Frelinger L.A., Furman M.I. Resistance to antiplatelet drugs. *Eur Heart J.* 2006;8(Suppl G):G53–8. DOI: 10.1093/eurheartj/sul056.
9. Танашян М.М., Домашенко М.А., Раскуражев А.А. Аспиринорезистентность: клинические и молекулярно-генетические методики оценки. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2016;10(1):41–6.
10. Michelson A.D., Cattaneo M., Eikelboom J.W. et al. Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost.* 2005;3(6):1309–11. DOI: 10.1111/j.1538–7836.2005.01351.x.
11. Grotemeyer K.H., Scharafinski H.W., Husstedt I.W. Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non-responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res.* 1993;71:397–403.
12. Остатки регрессии. Интеллектуальный Портал Знаний statistica.ru. *Режим доступа*: http://statistica.ru/glossary/general/ostatki-regressii.
13. Lordkipanidzé M. Advances in monitoring of aspirin therapy. *Platelets.* 2012;23(7):526–36. DOI: 10.3109/09537104.2012.711865.
14. Карпов Ю.А. Ацетилсалициловая кислота — ключевая позиция в первичной и вторичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений. *РМЖ.* 2008;16(11):1554–8.
15. Halushka M., Walker L.P., *Halushka* P.V. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73(1):122–30. DOI: 10.1067/mcp. 2003.1.
16. Andrioli G., Minuz P., Solero P. et al. Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A2 in subjects with Pl(A2) polymorphism of beta(3) subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol.* 2000;110(4):911–8. DOI: 10.1046/j.1365–2141.2000.02300.x.
17. Суслина З.А. Ишемические нарушения мозгового кровообращения и система простаноидов (клинико-биохимическое исследование): Автореф. дис. докт. мед. наук. *М.*, 1990. 49 с.
18. Бакунович А.В., Буланова К.Я., Лобанок Л.М. Молекулярные

macological approaches to the use in ischemic heart disease. [Antiagreganty: kliniko-farmakologicheskie podhody k primeneniyu pri ishemicheskoj bolezni serdca]. *RMZh.* 2009;18(9):1172–6 (in Russ.).

3. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25(5):457–507. DOI: 10.1159/000131083.
4. Jauch E.C., Saver J.L., Adams H.P. et al; American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Peripheral Vascular Disease, Council on Clinical Cardiology Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2013;44(3):870–947. DOI: 10.1161/STR.0b013e318284056a.
5. Meschia J.F., Bushnell C., Boden-Albala B. et al; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Functional Genomics and Translational Biology; Council on Hypertension. Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2014;45(12):3754–832. DOI: 10.1161/STR.0000000000000046.
6. Hankey G.J., Eikelboom J.W. Aspirin resistance. *Lancet.* 2006;367(9510):606–17. DOI: 10.1016/S0140–6736(06)68040–9.
7. Krasopoulos G., Brister S.J., Beattie W.S., Buchanan M.R. Aspirin resistance and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2008;336(7637):195–8. DOI: 10.1136/bmj.39430.529549.BE.
8. Michelson A.D., Frelinger L.A., Furman M.I. Resistance to antiplatelet drugs. *Eur Heart J.* 2006;8(Suppl G):G53–8. DOI: 10.1093/eurheartj/sul056.
9. Tanashyan M.M., Domashenko M.A., Raskurazhev A.A. Aspirin resistance: clinical and molecular genetic evaluation techniques. [Aspirinorezistentnost': klinicheskie i molekulyarno-geneticheskie metodiki ocenki]. *Annaly klinicheskoj i eksperimental'noj nevrologii.* 2016;10(1):41–6 (in Russ.).
10. Michelson A.D., Cattaneo M., Eikelboom J.W. et al. Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost.* 2005;3(6):1309–11. DOI: 10.1111/j.1538–7836.2005.01351.x.
11. Grotemeyer K.H., Scharafinski H.W., Husstedt I.W. Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non-responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res.* 1993;71:397–403.
12. Remains of regression. Intellectual Knowledge Portal statistica.ru. [Ostatki regressii. Intellektual'nyj Portal Znanij statistica.ru]. *Available at*: http://statistica.ru/glossary/general/ostatki-regressii (in Russ.).
13. Lordkipanidzé M. Advances in monitoring of aspirin therapy. *Platelets.* 2012;23(7):526–36. DOI: 10.3109/09537104.2012.711865.
14. Karpov U.A. Acetylsalicylic acid — key position in primary and secondary prevention of cardiovascular diseases and their complications. [Acetilsalicilovaya kislota — klyuchevaya poziciya v pervichnoj i vtorichnoj profilaktike serdechno-sosudistyh zabolevanij i ih oslozhnenij]. *RMZh.* 2008;16(11):1554–8 (in Russ.).
15. Halushka M., Walker L.P., Halushka P.V. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73(1):122–30. DOI: 10.1067/mcp. 2003.1.
16. Andrioli G., Minuz P., Solero P. et al. Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A2 in subjects with Pl(A2) polymorphism of beta(3) subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol.* 2000;110(4):911–8. DOI: 10.1046/j.1365–2141.2000.02300.x.
17. Suslina Z.A. Ischemic disorders of cerebral circulation and prostanoid system (clinical and biochemical research). [Ishemicheskie narusheniya mozgovogo krovoobrashcheniya i sistema prostanoidov (kliniko-biohimicheskoe issledovanie)]. Avtoref. dis. dokt. med. nauk. *Moskva*, 1990. 49 s (in Russ.).
18. Bakunovich A.V., Bulanova K. Ya., Lobanok L.M. Molecular

механизмы агрегации тромбоцитов. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология.* 2017;(4):40–51.

19. Танашян М.М., Хамидова З.М., Ионова В.Г. и др. Способ выявления резистентности к антиагрегантным препаратам у больных с прогрессирующим церебральным атеросклерозом. *Патент РФ* на изобретение №2012106483/15 (009859). 10.04.2013. Бюл. №10. 2 с. Режим доступа: http://www.freepatent.ru/images/patents/469/2478965/patent-2478965.pdf.

20. Суслина З.А., Танашян М.М., Домашенко М.А. Проблема резистентности к антиагрегантным препаратам у пациентов с цереброваскулярными заболеваниями. *Вестник РАМН.* 2011;(7):3–8.

21. Антонова К.В., Медведев Р.Б., Шабалина А.А. и др. Нарушения углеводного обмена и церебральный атеросклероз у больных с ишемическими нарушениями мозгового кровообращения. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2016;10(1):20–6.

mechanisms of platelet aggregation. [Molekulyarnye mekhanizmy agregacii trombocitov]. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya.* 2017;(4):40–51 (in Russ.).

19. Tanashyan M.M., Khamidova Z.M., Ionova V.G. et al. Method for detecting antiplatelet drugs resistance in patients with progressing cerebral atherosclerosis. [Sposob vyyavleniya rezistentnosti k antiagregantnym preparatam u bol'nyh s progressiruyushchim cerebral'nym aterosklerozom]. *Patent RF* na izobretenie №2012106483/15 (009859). 10.04.2013. Byul. №10. 2 s (in Russ.). Available at: http://www.freepatent.ru/images/patents/469/2478965/patent-2478965.pdf.

20. Suslina Z.A., Tanashyan M.M., Domashenko M.A. Resistance to antiplatelet drugs in patients with cerebrovascular disorders. [Problema rezistentnosti k antiagregantnym preparatam u pacientov s cerebrovaskulyarnymi zabolevaniyami]. *Vestnik RAMN.* 2011;(7):3–8 (in Russ.).

21. Antonova K.V., Medvedev R.B., Shabalina A.A. et al. Carbohydrate metabolism disorders and cerebral atherosclerosis in patients with ischemic cerebrovascular diseases. [Narusheniya uglevodnogo obmena i cerebral'nyj ateroskleroz u bol'nyh s ishemicheskimi narusheniyami mozgovogo krovoobrashcheniya]. *Annaly klinicheskoj i eksperimental'noj nevrologii.* 2016;10(1):20–6 (in Russ.).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шабалина А.А. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории гемореологии, гемостаза и фармакокинетики с клинической лабораторной диагностикой ФГБНУ «НЦН». E-mail: ashabalina@yandex.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9604-7775.

Ройтман Евгений Витальевич — д.б.н., профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ. E-mail: roitman@hemostas.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3015-9317. Scopus Author ID: 7004167632. Researcher ID: M-6541-2017.

Танашян М.М. — д.м.н, профессор, зам. директора по научной работе, руководитель 1-го неврологического отделения ФГБНУ «НЦН». ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5883-8119.

Для цитирования: Шабалина А.А., Ройтман Е.В., Танашян М.М. Сравнение двух методов лабораторной оценки агрегации тромбоцитов и резистентности к антиагрегантной терапии. *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2019;(3):64–71.

Статья поступила: 29.06.2019; принята к печати: 30.08.2019.

ABOUT THE AUTHORS:

Alla A. Shabalina — PhD, Leading Researcher, Head of Laboratory of Hemorheology, Hemostasis and Pharmacokinetics with Clinical Laboratory Diagnostics RCN. E-mail: ashabalina@yandex.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9604-7775.

Eugene V. Roitman — MD (Biology), PhD, Professor, Department of Oncology, Hematology and Radiation Therapy, RNRMU n.a. N.I. Pirogov HM of RF. E-mail: roitman@hemostas.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3015-9317. Scopus Author ID: 7004167632. Researcher ID: M-6541-2017.

Marine M. Tanashyan — MD, PhD, Professor, Deputy Director for Science, Head of Neurological Department №1 RCN. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5883-8119.

For citation: Shabalina A.A., Roitman E.V., Tanashyan M.M. The comparison between two methods of laboratory evaluation for platelet aggregation and for resistance to antiplatelet therapy. [Sravnenie dvuh metodov laboratornoj ocenki agregacii trombocitov i rezistentnosti k antiagregantnoj terapii]. *Tromboz, gemostaz i reologiya.* 2019;(3):64–71 (in Russ.).

Received: 29.06.2019; accepted: 30.08.2019.