

Малинова Л. И., Фурман Н. В., Долотовская П. В., Черноусова Л. А., Денисова Т. П.
 ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Минздрава России, Саратов

ИНДУЦИРОВАННОЕ АДЕНОЗИНДИФОСФАТОМ ВРЕМЯ СВЕРТЫВАНИЯ РЕКАЛЬЦИФИЦИРОВАННОЙ КРОВИ КАК ИНДИКАТОР РИСКА РАЗВИТИЯ ПОВТОРНЫХ ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТРОМБОЦИТАРНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ОСТРОМ КОРОНАРНОМ СИНДРОМЕ

Ключевые слова: острый коронарный синдром, антитромбоцитарная терапия, прогноз, контроль эффективности лечения, агрегатометрия.

Ссылка для цитирования: Малинова Л. И., Фурман Н. В., Долотовская П. В., Черноусова Л. А., Денисова Т. П. Индуцированное аденозиндифосфатом время свертывания рекальцифицированной крови как индикатор риска развития повторных тромботических осложнений и эффективности антитромбоцитарной терапии при остром коронарном синдроме. Кардиология. 2018;58(6):5–12.

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучить возможность применения в клинической практике индуцированного аденозиндифосфатом (АДФ) времени свертывания рекальцифицированной крови (АДФ-ВСПК) как маркера для прогнозирования течения острого коронарного синдрома (ОКС) и оценки эффективности антитромбоцитарной терапии (АТТ). *Материалы и методы.* В исследование включены 163 пациента с ОКС и 38 здоровых добровольцев (группа сравнения), все мужчины. АДФ-ВСПК определяли как время формирования сгустка цельной рекальцифицированной крови после добавления к ней 10 мкмоль АДФ. У здоровых добровольцев АДФ-ВСПК измерялось до и спустя 45 мин после перорального приема ацетилсалициловой кислоты (АСК) в дозе 250 мг. Дополнительно агрегационная активность тромбоцитов оценивалась методом оптической агрегатометрии. Расчет риска летального исхода проводился с использованием шкалы GRACE, 8-компонентной модели Granger и 9-компонентной модели Eagle. Период наблюдения составил 24 мес. Комбинированная первичная конечная точка включала летальный исход и повторные госпитализации, обусловленные сердечно-сосудистыми осложнениями. *Результаты.* Пациенты с ОКС по сравнению с группой здоровых добровольцев характеризовались более низкими значениями АДФ-ВСПК: 134,8 (109,9; 161,3) и 85,7 (60,5; 108,7) с соответственно ($p=0,015$). Прием АСК у здоровых добровольцев приводил к достоверному росту АДФ-ВСПК от 103,2 (95,1; 130,7) до 133,1 (102,8; 154,3) с ($p=0,004$). Установлены ассоциации АДФ-ВСПК, гематологических и гемостазиологических параметров, а также расчетного риска летального исхода ($R=-0,51$; $p<0,05$). Двухгодичная летальность у больных с ОКС составила 10,42%. АДФ-ВСПК менее 80 с у больных с ОКС ассоциировалось с повышением риска наступления первичной конечной точки (относительный риск 2,7 при 95% доверительном интервале от 1,1 до 6,4). *Заключение.* АДФ-ВСПК представляет собой количественный, простой в определении параметр, интегрально характеризующий состояние системы тромбоцитарного гемостаза, который может быть использован в клинической практике как маркер эффективности АТТ. У больных с ОКС АДФ-ВСПК коррелирует с расчетным риском летального исхода, а снижение АДФ-ВСПК на фоне АТТ менее 80 с является индикатором повышенного двухлетнего риска повторных сердечно-сосудистых тромботических осложнений.

Malinova L. I., Furman N. V., Dolotovskaya P. V., Chernousova L. A., Denisova T. P.
 Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russia

ADP-INDUCED RECALCIFIED BLOOD CLOTTING TIME AS A MARKER OF RETHROMBOSIS RISK AND EFFECTIVENESS OF ANTIPLATELET THERAPY IN ACUTE CORONARY SYNDROME

Keywords: acute coronary syndrome; antiplatelet therapy; prognosis; monitoring treatment effectiveness; aggregometry.

For citation: Malinova L. I., Furman N. V., Dolotovskaya P. V., Chernousova L. A., Denisova T. P. ADP-Induced Recalcified Blood Clotting Time as a Marker of Cardiovascular Rethrombosis Risk and Effectiveness of Antiplatelet Therapy in Acute Coronary Syndrome. Kardiologiya. 2018;58(6):5–12.

SUMMARY

Purpose: to assess the possibility of the use of ADP induced blood-clotting time measurement in clinical practice prognostication of the course of acute coronary syndrome (ACS) and assessment of effectiveness of antiplatelet therapy (APT). *Materials and methods.* We enrolled in the study 163 male patients admitted to the coronary unit for acute coronary syndrome (ACS) and 38 male practically

healthy volunteers (PHV). ADP induced blood-clotting time (ADP BCT) was measured as time (sec) between addition of ADP (10 μ mol) to recalcificated sample of citrate blood and clot formation. In healthy volunteers ADP BCT was determined before and 45 minutes after oral administration of acetylsalicylic acid (ASA, 250 mg). Risk of cardiovascular death was calculated using the GRACE score. Platelet function tests were performed by optical aggregometry. Follow-up period for patients with ACS was 24 months. The primary end point (PEP) was the composite of cardiovascular death and rehospitalization. *Results.* In ACS patients ADP BCT was significantly lower than in PHV: 134.8 (109.9; 161.3) vs 85.7 (60.5; 108.7) sec, $p=0.015$. In PHV ASA increased ADP BCT – 103.2 (95.1; 130.7) vs 133.1 (102.8; 154.3) sec, $p=0.041$. ADP BCT correlated with age in both PHV and patients ($R=-0.431$, $p<0.05$ and $R=-0.398$, $p<0.05$). In patients ADP BCT correlated with hematological and coagulation parameters, and with calculated cardiovascular death risk ($R=-0.51$, $p<0.05$). 24-months mortality of patients was 10.42%. ADP BCT <80 sec was associated with significant increase in the risk of occurrence of PEP (hazard ratio 2.7, 95% confidence interval 1.1 to 6.4). *Conclusion.* ADP BCT is a quantitative easily performed test characterizing platelet hemostasis and may be used in clinical practice for monitoring APT. In patients with ACS ADP BCT correlates with cardiovascular death risk. ADP BCT <80 sec (during APT) is a marker of increased 24-months risk of recurrent cardiovascular thrombotic complications.

Одну из ключевых ролей в развитии острого коронарного синдрома (ОКС) играют тромбоциты [1–4]. Нормализация (подавление) их агрегационной активности сопровождается улучшением как краткосрочного, так и долгосрочного прогноза при ОКС и является одной из основных целей его медикаментозной терапии, независимо от клинического варианта (с подъемом/без подъема сегмента ST) и выбранной стратегии лечения [5–9]. При ОКС в отсутствие противопоказаний наиболее целесообразным признано назначение двух препаратов, блокирующих разные пути активации агрегационной активности тромбоцитов, – двухкомпонентная антиагрегационная терапия (ДААТ): сочетание ацетилсалициловой кислоты (АСК) с одним из блокаторов рецепторов P2Y₁₂ тромбоцитов (клопидогрел, прасугрел или тикагрелор) [5–9]. При этом показания и методы клинико-лабораторного контроля или мониторинга ДААТ остаются темой для дискуссий. Так, с одной стороны, высокая остаточная реактивность тромбоцитов (ВОРТ) на фоне антиагрегационной терапии (ААТ) признана важным прогностическим фактором развития повторных тромботических осложнений у больных с ОКС ввиду ее ассоциации с высоким риском тромбоза (ретромбоза) интракоронарного стента. С другой стороны, интенсивное подавление агрегационной активности тромбоцитов при ДААТ ожидаемо повышает риск кровотечений [10].

Зарубежными и российскими экспертами разработаны рекомендации по оценке функциональной активности тромбоцитов (ФАТ) на фоне ААТ, в которых обозначены клинические ситуации, когда изучение ФАТ может быть полезным [11–14], и представлены основные способы контроля ФАТ: проточная цитофлуориметрия и импедансная или оптическая агрегатометрия [12–15], а также целый ряд методов оценки ФАТ у больных с ОКС [16], таких как метод определения концентрации в плазме крови компонентов α -гранул тромбоцитов, выделения с мочой тромбоксана В₂, определение продолжительности жизни аутологичных меченых тромбоцитов в кровеносном русле больного.

Однако все перечисленные методы оценки ФАТ не лишены недостатков [13, 15]. Главным, безусловно, является то, что они не стандартизованы. К относительным недостаткам известных методов оценки ФАТ также можно отнести высокую стоимость приборов и расходных материалов (одноразовых картриджей, реактивов) и, как следствие, относительную недоступность для небольших стационаров. Кроме того, применение большинства методик либо требует наличия дорогостоящей аппаратуры и опытного оператора по работе с ней, либо их проведение занимает много времени, либо их использование лимитировано «одноразовостью» получаемой информации [17].

Поэтому поиск новых, относительно недорогих и доступных методов контроля ФАТ, эффективности ААТ, прогнозирования течения заболевания, в том числе при ОКС, и определения тактики антиагрегационной (в том числе, и ААТ) терапии для каждого конкретного больного остается актуальной проблемой.

Цель исследования: изучить возможность применения в клинической практике индуцированного АДФ времени свертывания рекальцифицированной крови (АДФ-ВСПК) как маркера для прогнозирования течения ОКС и оценки эффективности ААТ.

Материал и методы

Проведено двухэтапное исследование. Первый этап: исследование динамики АДФ-ВСПК на фоне однократного перорального приема АСК у здоровых добровольцев; второй этап: проспективное исследование взаимосвязи АДФ-ВСПК и прогноза у больных с ОКС, получающих стандартную ААТ, соответствующую действующим клиническим рекомендациям [5, 6]. Длительность периода наблюдения составила 24 мес.

Общее число включенных в исследование – 201 (все мужчины), из них 163 – пациенты, госпитализированные в отделение реанимации и интенсивной терапии в связи с ОКС, и 38 – клинически здоровые добровольцы (группа сравнения). Характеристика пациентов и здоровых добровольцев представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатель	Здоровые добровольцы (n=38)	ОКС (n=163)	p
Возраст, годы	35 (28; 43)	67 (54; 78)	0,021
Инфаркт миокарда, %	0	65,6	–
Нестабильная стенокардия, %	0	34,4	–
Курение, %	29,7	33,1	0,234
Отягощенная по ССЗ наследственность, %	37,8	49,7	0,178
Острый коронарный синдром в анамнезе, %	0	1,8	–
Артериальная гипертензия, %	0	73	–
Ожирение, %	21,6	25,2	0,117
Хроническая сердечная недостаточность, %	0	63,2	–
Сахарный диабет, %	0	7,4	–
Предшествующая манифестации ОКС медикаментозная терапия			
Антиагреганты, %	0	15,9	–
β-Адреноблокаторы, %	0	15,9	–
Ингибиторы АПФ, %	0	36,2	–
Нитраты, %	0	2,5	–
Антагонисты кальция, %	0	9,2	–
Статины, %	0	4,3	–
Скрининговые гематологические, биохимические и гемостазиологические параметры			
Гемоглобин, г/л	120 (125; 147)	130 (120; 141)	0,269
Эритроциты, ×10 ¹² /л	4,11 (3,59; 4,53)	4,34 (4,07; 4,86)	0,081
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	218 (200; 353)	266 (230; 312)	0,123
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	7,3 (6,3; 8,1)	8,4 (6,85; 12,8)	0,684
СОЭ, мм/ч	8 (5;13)	15 (10; 22)	0,532
Креатинин, кмоль/л	83 (76; 107)	90 (73; 105)	0,892
Глюкоза, ммоль/л	5,2 (5,1; 6,1)	6,5 (5,5; 7,4)	0,143
Общий холестерин, ммоль/л	4,78 (3,9; 5,4)	5,2 (4,3; 6,2)	0,154
Триглицериды, ммоль/л	1,1 (0,68; 1,3)	1,2 (0,7;1,7)	0,854
Протромбиновое время, с	17,8 (16,7; 19,7)	17,45 (16,6; 18,9)	0,829
Фибриноген, г/л	2,2 (1,8; 4,1)	2,6 (2,6; 2,8)	0,802
АЧТВ, с	25,85 (23,8; 29,1)	26,15 (24,1; 30,1)	0,974
Тромбиновое время, с	20,1 (16,6; 25,1)	21,3 (20,4; 25,3)	0,292
Антитромбин III, %	96 (80; 106)	89 (78; 108)	0,841

Данные представлены в виде медианы и квартильного разброса (нижний квартиль; верхний квартиль) или числа больных в процентах. ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; АПФ – ангиотензинпревращающий фермент; СОЭ – скорость оседания эритроцитов; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время. Здесь и в табл. 2: ОКС – острый коронарный синдром.

Верификацию диагноза и лечение больных ОКС проводили согласно существующим клиническим рекомендациям [5–7, 9]. Термин «клинически здоровый доброволец» в данном исследовании подразумевал, что у данного участника исследования отсутствуют жалобы, клинические симптомы и признаки патологии внутренних органов, анамнестические указания на хронические заболевания внутренних органов и центральной нервной системы, патологические изменения, выявляемые в скрининговых клинико-лабораторных анализах, при базовом физическом и инструментальном обследовании (измерение артериального давления, электрокардиограмма в 12 общепринятых отведениях); участник полностью информирован о цели проводимого исследования и добровольно подписал согласие на взятие образцов крови для клинико-лабораторного анализа. Допускалось наличие факторов риска развития сердечно-сосудистых

заболеваний, таких как курение, отягощенная по сердечно-сосудистой патологии наследственность.

У здоровых добровольцев образцы крови забирали исходно и спустя 45 мин после перорального приема (разжевывания) 250 мг АСК. Кровь брали натощак после 12–18-часового голодания и не менее чем 60-минутного воздержания от курения.

У больных с ОКС образцы крови брали в первые сутки поступления в стационар на фоне терапии, включавшей антикоагулянты и АСК и/или клопидогрел. АСК на догоспитальном этапе лечения (скорая медицинская помощь) получили 79,1% больных, их них 72,9% – нагрузочную дозу. ДАТТ (АСК + клопидогрел) проводилась в 68,7% случаев.

Длительность периода наблюдения больных с ОКС составила 24 мес. Этап наблюдения включал как непосредственные визиты пациента (на 30-й день), так и телефонные контакты, проводимые с частотой 2 раза в год.

Отслеживаемые события включали повторные случаи ОКС и смерть от сердечно-сосудистых причин.

Исследование проводилось согласно требованиям Хельсинкской декларации, получило одобрение локального этического комитета. Все участники подписали форму добровольного информированного согласия.

Гемостазиологический скрининг включал определение протромбинового времени, активированного частично тромбoplastинового времени (АЧТВ), тромбинового времени, фибриногена, антитромбина III (с использованием реактивов, контрольных материалов и плазмокالیбраторов производства НПО «РЕНАМ»).

Всем обследуемым определяли АДФ-индуцированное время свертывания рекальцифицированной крови (АДФ-ВСРК) [18] и оценивали агрегационную активность тромбоцитов: спонтанную, внутрисосудистую [19, 20] и АДФ-индуцированную (5 мкмоль) агрегацию на двухканальном анализаторе агрегации тромбоцитов 230-LA («Biola Ltd.», Москва) [21]. Для исследования использовали образцы богатой тромбоцитами плазмы. Предварительно осуществляли подсчет концентрации тромбоцитов в полученном образце. Дальнейшее исследование проводили при концентрации тромбоцитов около 200 тыс./мкл.

Для определения АДФ-ВСРК использовали цельную кровь, стабилизированную цитратом натрия. Измерение АДФ-ВСРК проводилось одновременно в двух образцах крови, полученных от одного пациента. Каждый из образцов вносили в измерительную кювету, рекальцифицировали при температуре 37°C в течение 2 мин. Затем в кювету с рекальцифицированной цельной кровью помещали магнитный шарик-мешалку, проводили запуск измерения и через 3 с вносили раствор АДФ в конечной концентрации 10 мкмоль [22]. После образования сгустка фиксировали время длительности процесса для каждой пробы отдельно и считали их среднее арифметическое значение – АДФ-ВСРК. Нами использовался полуавтоматический коагулометр Thrombotimer 2 («Behnk Elektronik», Германия), с соответствующими объемами образцов (0,2 мл цитратной крови). Следует отметить, что определение АДФ-ВСРК возможно при помощи других коагулометров с соответствующей коррекцией объемов образцов и референсных значений.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 7.0 («StatSoft Inc», США). Проверка нормальности распределения производилась методом Колмогорова–Смирнова с учетом показателей эксцесса и симметричности. Количественные признаки представлены в виде медианы и квартильного разброса (нижний квартиль; верхний квартиль). Проверка статистических гипотез осуществлялась с использованием критерия U Манна–Уитни для количественных переменных и χ^2 для качественных. Проводили однофакторный

непараметрический дисперсионный анализ в несвязанных выборках, анализировали ранговую корреляцию по Спирмену и Кендаллу. Кластерный анализ осуществляли методом К-средних. Вероятность наступления летального исхода рассчитывали с использованием шкалы GRACE, 8-компонентной модели Granger (для расчета смертности в стационаре) и 9-компонентной модели Eagle (для расчета риска смерти в течение 6 мес с момента манифестации ОКС). Рассчитывали индивидуальную вариабельность (CVi10), исходя из 10 последовательных измерений, и групповую вариабельность (CVg). Оценивали относительный риск (ОР) наступления анализируемого события и его 95% доверительный интервал (ДИ). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Учитывая, что относительно ряда методов оценки агрегационной способности тромбоцитов, использующих в качестве аналита цельную кровь, временные лимиты стабильности не описаны, а для некоторых (например, система Verify Now) одним из требований преаналитической подготовки образца является соблюдение периода его выстаивания от 10 мин до 10 ч, мы определяли пределы временной стабильности АДФ-ВСРК. Для этого проводили серию измерений АДФ-ВСРК спустя 10, 30, 60, 120 и 180 мин с момента забора крови. Образец крови между измерениями хранили при комнатной температуре (19–24°C). Как видно из данных, представленных на рисунке 1, результаты оставались без существенных изменений в течение 1 ч после забора крови у всех обследованных. Дальнейшая задержка в измерении приводила

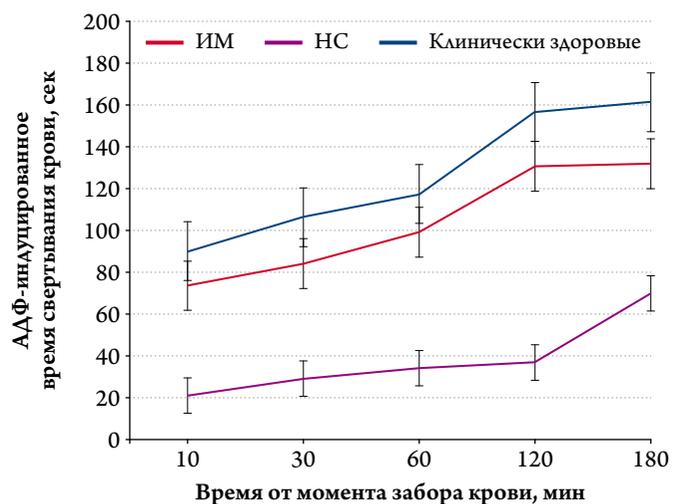


Рис. 1. Временная динамика АДФ-индуцированного времени свертывания рекальцифицированной крови у здоровых добровольцев (n=5), больных острым инфарктом миокарда (ИМ, n=3) и нестабильной стенокардией (НС, n=3).

Таблица 2. АДФ-индуцированное время свертывания рекальцифицированной крови и агрегационная активность тромбоцитов у здоровых добровольцев и больных с ОКС

Показатель	Здоровые добровольцы	ОКС	p	Здоровые добровольцы	ОКС	p
	сформированная выборка			нормализация по возрасту		
АДФ-ВСПК, с	90,2 (65,1; 130,1)	96,1(75,5; 124,0)	0,586	134,8 (109,95; 161,3)	85,65 (60,5; 108,7)	0,015
Спонтанная агрегация тромбоцитов, о. е.	0,04 (0,03; 0,06)	0,12 (0,07; 0,17)	0,000	0,03 (0,02; 0,04)	0,13 (0,07; 0,17)	0,003
Внутрисосудистая агрегация тромбоцитов, о. е.	0,05 (0,03; 0,18)	0,14 (0,04; 0,19)	0,271	0,18 (0,18; 0,18)	0,11 (0,02; 0,19)	0,416
Число тромбоцитов богатой тромбоцитами плазмы, тыс./мкл	523 (370; 538)	408 (312; 580)	0,156	621 (315; 927)	324 (238; 408)	0,232
Степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, %	49,9 (42,2; 59,4)	34,3 (24,9; 48,7)	0,046	4,67 (0; 9,35)	30,9 (12; 48,5)	0,001

АДФ-ВСПК – АДФ-индуцированное время свертывания рекальцифицированной крови; о. е. – оптическая плотность.

к увеличению АДФ-ВСПК. Тенденция к росту изучаемого параметра выявлена во всех исследованных образцах, как у здоровых добровольцев, так и у пациентов с ОКС. Полученные результаты объяснимы известными изменениями ФАТ, а также конформационными переходами белков коагуляционного каскада при хранении [23–26]. В связи с этим при оценке временной стабильности теста мы ограничились малой выборкой.

Индивидуальную вариабельность оценивали, исходя из 10 последовательных измерений (CVi10); она составила 16,7%. Групповая вариабельность (CVg) не превышала 34,7%, и была максимальной в группе пациентов с инфарктом миокарда.

Результаты определения АДФ-ВСПК у здоровых добровольцев представлены в табл. 2. Пероральный прием АСК в дозе 250 мг приводил к росту АДФ-ВСПК с 103,2 (95,1; 130,7) до 133,1 (102,8; 154,3; $p=0,004$) с. В сформированной выборке АДФ-ВСПК у здоровых добровольцев и пациентов с ОКС статистически значимо не различались, что может быть обусловлено рядом факторов, в том числе медикаментозным подавлением агрегационной активности тромбоцитов. После нормализации по возрасту длительность АДФ-ВСПК оказалась существенно ниже у больных с ОКС (см. табл. 2). При корреляционном анализе установлены ассоциации АДФ-ВСПК и возраста ($R=-0,431$; $p<0,05$), гематокрита ($R=-0,337$; $p<0,05$), количества тромбоцитов ($R=0,497$; $p<0,05$), АЧТВ ($R=-0,343$; $p<0,05$).

За период наблюдения конечной точки исследования (наступление летального исхода вследствие сердечно-сосудистых причин или повторного ОКС) достигли 24 пациента (14,72%). Летальность в сформированной выборке составила 10,42%.

При анализе значения АДФ-ВСПК для риска развития повторных сердечно-сосудистых осложнений установлено, что АДФ-ВСПК ассоциирована с расчетным риском смерти как в стационаре ($R=-0,47$; $p<0,05$), так и в течение 6 мес

с момента манифестации ОКС ($R=-0,51$; $p<0,05$). При проведении кластерного анализа сформированы два кластера с центроидами, соответствующими наличию и отсутствию верифицированного ОКС, у которых средние значения АДФ-ВСПК составили 82,34 и 111,8 с соответственно. Проводился расчет и анализ чувствительности и специфичности АДФ-ВСПК при значениях, соответствующих децилям распределения АДФ-ВСПК. Исходя из требования баланса между чувствительностью и специфичностью метода выделен пороговый уровень АДФ-ВСПК <80 с: чувствительность – 73,9%, специфичность – 47,9%. АДФ-ВСПК менее 80 с ассоциировалось с почти трехкратным повышением риска развития повторных тромботических сердечно-сосудистых событий, включающих повторный фатальный и нефатальный ОКС (ОР 2,7 при 95% ДИ от 1,1 до 6,4).

Обсуждение

Известны многие маркеры активации сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного звеньев системы гемостаза и способы оценки агрегационных свойств тромбоцитов. Среди них изучение агрегационной активности тромбоцитов (визуальный, оптический и импедансный методы), повышения концентрации в плазме крови компонентов α -гранул тромбоцитов, усиления выделения с мочой тромбоксана В2, определение продолжительности жизни в циркуляторном русле большого аутологичных меченых тромбоцитов, методы распознавания тромбофилии (в том числе генетические), методы глобальной оценки активации свертывающей системы крови (например, определение концентрации D-димера), инструментальные методы определения тромбогенного риска (анализатор PFA-100, анализатор тромбоцитарного статуса – Thrombotic status analyser, Montrose Diagnostics, UK) и др. [12–15, 27]. Однако использование большинства из них либо требует наличия дорогостоящей аппаратуры и опытного специалиста по работе с ней, либо затратно по времени и не может быть использовано

в практике ургентной медицины, либо их использование лимитировано «однобокостью» получаемой информации о состоянии системы гемостаза.

Методы исследования свертываемости крови *in vitro* должны максимально корректно отражать процесс свертывания *in vivo* [17], учитывая влияние множества факторов на ФАТ [28]. Предлагаемый метод определения АДФ-ВСПК позволяет симулировать *in vitro* образование тромба в коронарных артериях за счет следующих компонентов:

1. При постановке теста используется образец цельной нефракционированной крови, содержащий все имеющиеся у пациента компоненты системы гемостаза;
2. За счет рекальцификации цитратного образца крови удается избежать нефизиологической концентрации ионов кальция и извращения коагуляционного звена системы тромбообразования;
3. Воспроизводится турбулентный ток крови, наиболее характерный для участков сосудистого русла при наличии атеросклеротической бляшки.

Внесение индуктора агрегации тромбоцитов в образец рекальцифицированной крови запускает каскад тромбообразования, при этом на АДФ-ВСПК влияет комплекс факторов, среди которых агрегационная активность тромбоцитов, концентрация и функциональная способность факторов свертывания крови, проницаемость эритроцитарной мембраны, сдвиговые параметры поддерживаемого магнитной мешалкой течения внутри кюветы и т. д. Эритроциты являются одним из депо АДФ, при этом регуляция проницаемости клеточной мембраны является существенным фактором [29–33].

Наблюдавшиеся нами корреляции АДФ-ВСПК с возрастом, гематокритом, АЧТВ, количеством тромбоцитов укладываются в существующие представления о возраст-зависимых изменениях системы гемостаза [34–36]. В том числе сам гематокрит является возраст-зависимым параметром [37, 38], что, наиболее вероятно, могло обусловить выявленные умеренной силы отрицательные корреляции между АДФ-ВСПК и возрастом, гематокритом в сформированной выборке.

Разнонаправленные изменения АЧТВ и АДФ-ВСПК также не вызывают удивления, так как это принципиально разные тесты. Основным требованием к анализируемому образцу плазмы при определении АЧТВ является отсутствие тромбоцитов и 4-го фактора тромбоцитов, связывающегося как с нефракционированным гепарином, так и с низкомолекулярными гепаринами, что приводит к сокращению АЧТВ [39]. При постановке АДФ-ВСПК в анализируемом образце содержатся и тромбоциты, играя триггерную роль в образовании сгустка, и фактор PF4. Кроме того, АЧТВ – время свертывания рекальцифицированной бедной тромбоцитами плазмы в условиях контактной и фосфолипидной активации. При АДФ-

ВСПК можно предполагать наличие фосфолипидной активации за счет содержания фрагментов клеточных мембран, однако сложно представить, что кинетика этой активации будет идентична таковой при воздействии фосфолипидной фракции реагента АЧТВ. Наличие в измерительной кювете полного «набора» форменных элементов крови не может не влиять на кинетику образования сгустка крови: тромбоцитарно-лейкоцитарная коагрегация, изменение проницаемости эритроцитарной мембраны для АДФ и т. п. при определенной скорости сдвига (хаотичное перемешивание магнитной мешалкой).

В нашем исследовании АДФ-ВСПК изменялось однонаправленно с показателями АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, которая, как известно, может использоваться для контроля ФАТ, выявления ВОРТ [10], у больных с ОКС было достоверно меньше, чем у здоровых добровольцев. По нашему мнению, это позволяет предположить, что определение данного показателя может быть полезным в качестве одного из параметров (дополнительного маркера) при прогнозировании течения ОКС и мониторинговании эффективности АТТ.

Определение АДФ-ВСПК имеет ряд возможных преимуществ как перед эталонным способом оценки агрегационной активности тромбоцитов – оптической агрегометрией, так и перед альтернативными методами оценки ФАТ. Оптическая агрегометрия в сравнении с АДФ-ВСПК требует длительной преданалитической подготовки образцов богатой и бедной тромбоцитами плазмы. В сравнении с импедансной агрегометрией или оценкой ФАТ (PFA-100, PFA-200) определение АДФ-ВСПК существенно дешевле. Так при сравнении стоимости реактивов на одного пациента для PFA-100 (Dade PFA Collagen/ADP Test Cartridge) и реактивов для определения АДФ-ВСПК по ценам на 2016 год (<http://zakupki.gov.ru>, Электронный аукцион № 0373100050614000212), определение АДФ-ВСПК было в 54 раза дешевле.

К факторам, лимитирующим полученные результаты, прежде всего следует отнести небольшой объем выборки и отсутствие контролируемого приема АТТ после выписки из стационара.

Закключение

Индукцированное аденозиндифосфатом время свертывания рекальцифицированной крови представляет собой количественный, простой в определении параметр, интегрально характеризующий состояние системы тромбоцитарного гемостаза, коррелирующий как с функциональным состоянием тромбоцитов, так и с возрастом обследуемого. Индуцированное аденозиндифосфатом время свертывания рекальцифицированной крови статистически значительно изменяется под влиянием антитромбоцитарной тера-

пии и может быть использовано в клинической практике как маркер ее эффективности в части объективизации степени подавления агрегационной активности тромбоцитов.

У больных с острым коронарным синдромом индуцированное аденозиндифосфатом время свертывания рекальцифицированной крови коррелирует с расчетным

риском летального исхода, а сокращение индуцированного аденозиндифосфатом времени свертывания рекальцифицированной крови на фоне антитромбоцитарной терапии менее 80 с является индикатором повышенного двухлетнего риска развития повторных тромботических сердечно-сосудистых осложнений.

Сведения об авторах:

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Минздрава России, Саратов

Малинова Л. И. – д.м.н, зав. отделом атеросклероза и ХИБС НИИ кардиологии, проф. кафедры терапии и геронтологии ИДПО.

Фурман Н. В. – к.м.н., зав. отделом неотложной и инвазивной кардиологии НИИ кардиологии.

Долотовская П. В. – к.м.н., н.с. отдела неотложной и инвазивной кардиологии.

Черноусова Л. А. – ст. лаборант отдела атеросклероза и ХИБС.

Денисова Т. П. – д.м.н., проф. кафедры терапии и геронтологии ИДПО.

E-mail: lidia.malinova@gmail.com

Information about the author:

Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia

Lidia I. Malinova – PhD, MD, professor.

E-mail: lidia.malinova@gmail.com

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Panchenko E.P., Dobrovolsky A.B. Thrombosis in cardiology. Mechanisms of development and possibilities of therapy. Moscow: Sport-i-Kultura; 1999. 464 pp. Russian (Панченко Е. П., Добровольский А. Б. Тромбозы в кардиологии. Механизмы развития и возможности терапии. Москва: Спорт и культура, 1999; 464 с).
- Panchenko E.P. The concept of atherothrombosis – the basis of the pathogenesis of cardiovascular disease. The main directions of antithrombotic therapy. Russian Medical Journal 2005;13 (7):433–440. Russian (Панченко Е. П. Концепция атеротромбоза – основа патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний. Основные направления антитромботической терапии. Русский медицинский журнал 2005;13 (7):433–440).
- Furie B., Furie V. C. Mechanisms of thrombus formation. N Engl J Med 2008;359 (9):938–949. DOI: 10.1056/NEJMra08010823 59/9/938 [pii]
- Koupenova M., Kehrel B.E., Corkrey H.A., Freedman J.E. Thrombosis and platelets: an update. Europ Heart J 2017;38:785–791. DOI:10.1093/eurheartj/ehv550.
- Recommendations of Society of Specialists in emergency cardiology. Diagnosis and treatment of patients with acute coronary syndrome without ST-segment elevation // [site of Society of specialists in emergency cardiology] 2015. URL: http://medspecial.ru/upload/medialibrary/aa9/диагностика_и_лечение.pdf. (Date of access 11.01.2017) Russian (Рекомендации Общества специалистов по неотложной кардиологии. Диагностика и лечение больных с острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST электрокардиограммы // [сайт Общества специалистов по неотложной кардиологии] 2015. URL: http://medspecial.ru/upload/medialibrary/aa9/диагностика_и_лечение.pdf. (Дата обращения 11.01.2017)).
- Recommendations of Society of Specialists in emergency cardiology. Diagnosis and treatment of patients with acute myocardial infarction with ST segment elevation// [site of Society of specialists in emergency cardiology] 2014. URL: <http://medspecial.ru/upload/medialibrary/34a/recomend-all-11111.pdf> (Date of access 11.01.2017). Russian (Рекомендации Общества специали-
- алистов по неотложной кардиологии. Диагностика и лечение больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST электрокардиограммы // [сайт Общества специалистов по неотложной кардиологии]. 2014 URL: <http://medspecial.ru/upload/medialibrary/34a/recomend-all-11111.pdf> (Дата обращения 11.01.2017)).
- Steg P.G., James S.K., Atar D. et al. The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC) ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. Eur Heart J 2012;33:2569–2619. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs215
- Kolh P., Windecker S., Alfonso F. et al. The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). Eur Heart J 2014;35:2541–2619. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu278.
- Roffi M., Patrono C., Collet J. P. et al. Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC) 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Eur Heart J 2016; 37:267–315. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv32.
- Tantry U.S., Bonello L., Aradi D. et al. Working Group on On-Treatment Platelet Reactivity. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. J Am Coll Cardiol 2013;62 (24):2261–2273. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.07.101
- Aradi D., Storey R.F., Komocsi A. et al. Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. Expert position paper on the role of platelet function testing in patients undergoing percutaneous coronary intervention. Eur Heart J 2014;35 (4):209–215. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv375

12. Andreev D. A. The significance of platelet functional activity testing in the prevention of cardiovascular complications in patients receiving antiplatelet therapy. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2014;10 (6):679–687. Russian (Андреев Д. А. Роль тестирования функциональной активности тромбоцитов в профилактике сердечно-сосудистых осложнений у больных, получающих антитромбоцитарную терапию. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии* 2014;10 (6):679–687.) DOI:10.20996/1819-6446-2014-10-6-679-687
13. Mirzaev K. B., Andreev D. A., Sychev D. A. Evaluation of platelet aggregation in clinical practice. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2015;11 (1):85–91. Russian (Мирзаев К. Б., Андреев Д. А., Сычев Д. А. Оценка агрегации тромбоцитов в клинической практике. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии* 2015;11 (1):85–91.) DOI:10.20996/1819-6446-2015-11-1-85-91.
14. Gurbel P. A., Becker R. C., Mann K. G. et al. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50 (19):1822–1834. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.07.051.
15. Braunwald E., Angiolillo D., Bates E. et al. Assessing the current role of platelet function testing. *Clin Cardiol* 2008;31 (3):10–16. DOI: 10.1002/clc.20361
16. Ferroni P., Riondino S., Vazzana N. et al. Biomarkers of platelet activation in acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2012;108 (6):1109–1123. DOI: 10.1160/TH12-08-0550
17. Vorob'ev A. I. (Ed.) *Practical coagulation*. Moscow: *Prakticheskaya medicina* 2011; 192 pp. Russian (Воробьев А. И. (ред.) *Практическая коагулология*. М.: *Практическая медицина* 2011; 192 с.)
18. Furman N. V., Malinova L. I., Puchin'jan N. F., Dolotovskaja P. V. Method of assessing risk of recurrent thrombotic events in patients with acute coronary syndrome // *Inventions. Utility Models*. 2011;15:8 p. Russian (Фурман Н. В., Малинова Л. И., Пучиньян Н. Ф., Долотовская П. В. Способ оценки риска повторных тромботических событий у больных острым коронарным синдромом // *Изобретения. Полезные модели*. Официальный бюллетень федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам 2011;15:8 с.). <http://www.freepatent.ru/images/patents/41/2419800/patent-2419800.pdf>
19. Ikonnikova E. I., Chernousova L. A., Moshkina I. R. The method of research of intravascular platelet aggregation in vitro. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika)* 1999;6:20–21. Russian (Иконникова Е. И., Черноусова Л. А., Мошкина И. Р. Способ исследования внутрисосудистой агрегации тромбоцитов in vitro. *Клиническая лабораторная диагностика* 1999;6:20–21).
20. Ikonnikova E. I., Dovgalevskij P. Ya., Chernousova L. A., Moshkina I. R. Method study of intravascular platelet aggregation in vitro // *The patent №2102754 of the Russian Federation for invention*. Russian (Иконникова Е. И., Довгалецкий П. Я., Черноусова Л. А., Мошкина И. Р. Способ исследования внутрисосудистой агрегации тромбоцитов in vitro // *Патент Российской Федерации №2102754 на изобретение*), <http://www.findpatent.ru/patent/210/2102754.html>
21. Gabbasov Z. A., Popov B. G., Gavrilov I. Yu. et al. A new highly sensitive method for the analysis of platelet aggregation. *Laboratornoe delo* 1989;10:15–18. Russian (Габбасов З. А., Попов Б. Г., Гаврилов И. Ю. и др. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. *Лабораторное дело* 1989;10:15–18).
22. Riess H., Braun G., Brehm G., Hiller E. Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood. *Am J Clin Pathol* 1986;85 (1):50–56. DOI:10.1093/ajcp/85.1.50
23. Henzler-Wildman K., Kern D. Dynamic Personalities of Proteins. *Nature* 2007;450:964–972. DOI:10.1038/nature06522
24. Karplus M., Kuriyan J. *Molecular Dynamics and Protein Function*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102 (10):6679–6685. DOI: 10.1073/pnas.0408930102
25. Kern D., Zuiderweg E. R. P. The Role of Dynamics in Allosteric Regulation. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:748–757. DOI:10.1016/j.sbi.2003.10.008
26. Scheraga H. A. My 65 years in protein chemistry. *Q Rev Biophys* 2015;48 (2):117–177. DOI: 10.1017/S0033583514000134
27. Tynngård N., Lindahl T. L., Ramström S. Assays of different aspects of haemostasis – what do they measure? *Thrombosis J* 2015;13:8. DOI: 10.1186/s12959-015-0036-2
28. Munnix I. C. A., Cosemans J. M. E. M., Auger J. M., Heemskerk J. W. M. Platelet response heterogeneity in thrombus formation. *Thromb Haemost* 2009;102:1149–1156. DOI: 10.1160/TH09-05-0289.
29. Storozhok S. A., Sannikov A. G., Belkin A. V. Dependence of stability of red cell membranes deformability on intermolecular interactions of cytoskeleton proteins Tyumen State University Herald 2009;3:3–10. Russian (Сторожок С. А., Санников А. Г., Белкин А. В. Зависимость стабильности деформабельности мембран эритроцитов от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета. *Вестник Тюменского государственного университета* 2009;3:3–10).
30. Glushkov V. S., Storozhok S. A., Petrovec A. M. Modification of the structure of membranes of red blood cells as the modulator changes the membrane permeability for ADP in shear deformation *Izvestiya Chelyabinskogo nauchnogo centra URO RAN* 2004;1 (22):225–230. Russian (Глушков В. С., Сторожок С. А., Петровец А. М. Модификация структуры мембран клеток крови как модулятор изменения проницаемости мембран для АДФ при сдвиговой деформации. *Известия Челябинского научного центра УРО РАН* 2004;1 (22):225–230). http://elibrary.lt/resursai/Uzsenio%20leidiniai/Celiabinsk/2004_1/2004_1_16_3.pdf
31. McHedlishvili G., Maeda N. Blood flow structure related to red cell flow: Determinant of blood fluidity in narrow microvessels, *Jpn J Physiol* 2001;51 (1):19–30. <http://DOI.org/10.2170/jjphysiol.51.19>
32. Mohandas N. and Gallagher P. G. Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood* 2008;112 (10):3939–3948. DOI: 10.1182/blood-2008-07-161166.
33. Fung Y. C. *Biomechanics. Mechanical Properties of Living Tissues*. Springer-Verlag New York 1993, P. 109–164. ISBN 978-1-4757-2257-4
34. Zakharova N., Nikolaeva A., Treneva E. et al. Importance of disturbances in blood aggregation state system in development of cardiovascular diseases in conditions of physiological and accelerated ageing *Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences* 2014;5–2 (16):857–859. Russian (Захарова Н. О., Николаева А. В., Тренева Е. В. и др. Значение нарушений в системе агрегатного состояния крови в развитии сердечно-сосудистых заболеваний в условиях физиологического и ускоренного старения. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2014;5–2 (16):857–859). <http://cyberleninka.ru/article/n/znachenie-narusheniy-v-sisteme-agregatnogo-sostoyaniya-krovi-v-razvitiy-serdechno-sosudistyh-zabolevaniy-v-usloviyah-fiziologicheskogo-i-uskorenogo-stareniya>
35. Abbate R., Prisco D., Rostagno C. et al. Age-related changes in the hemostatic system. *Int J Clin Lab Res* 1993;23 (1):1–3. DOI: 10.1007/BF02592271
36. Mari D., Ogliaeri G., Castaldi D. et al. Hemostasis and ageing. *Immunity & Ageing* 2008;5:12. DOI:10.1186/1742-4933-5-12
37. Boggs D. R., Patrene K. Hematopoiesis and aging v. A decline in hematocrit occurs in all aging female B6D2F1 mice. *Exp Aging Res* 1986;12 (3):131–134. <http://dx.DOI.org/10.1080/03610738608259449>
38. Kubota K., Shirakura T., Orui T. et al. Changes in the blood cell counts with aging. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi* 1991;28 (4):509–514.
39. Berkovskij A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V. et al. Methods for determining the activity of heparin: a teaching manual. Moscow: GBOU DPO РМАРО, 2015: 64 pp. Russian (Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В. и др. Методы определения активности гепарина: учебно-методическое пособие М.: ГБОУ ДПО «РМАРО», 2015: 64 с.) http://www.renau.ru/dokumentaciya/metodicheskie-posobiya/Metody_opredeleniya_aktivnosti_geparina.pdf/view

Поступила 15.06.17 (Received 15.06.17)