

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИТРОМБОЦИТАРНУЮ ТЕРАПИЮ. ВОЗМОЖНЫЕ НЕСООТВЕТСТВИЯ ТЕСТОВ АГРЕГАЦИИ И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

В.В. Бодрова, О.Н. Шустова, Н.В. Голубева, А.К. Алиева, В.В. Влодзяновский, Д.В. Певзнер, А.В. Мазуров*

Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова, 121552, Москва, ул. Академика Чазова, 15а; *эл. почта: malysheva-valeri@mail.ru

Функциональную активность тромбоцитов оценивали у здоровых добровольцев (ЗД, $n=92$), пациентов со стабильной стенокардией (СС, $n=42$) и острым коронарным синдромом (ОКС, $n=73$), получающих ацетилсалициловую кислоту (АСК) + клопидогрел и АСК + тикагрелор соответственно. У всех ЗД и пациентов сравнивали показатели агрегации тромбоцитов (максимальные светопропускание и скорость, T_{max} и V_{max}) и показатели, характеризующие экспонирование маркеров активации тромбоцитов, определяемые с помощью проточной цитометрии. В группе ЗД тромбоциты активировали, используя TRAP (thrombin receptor activating peptide, пептид активирующий рецептор тромбина) 10 мкМ и 1 мкМ и ADP 20 мкМ, 5 мкМ и 2,5 мкМ; а в группах пациентов TRAP 10 мкМ и ADP 20 мкМ и 5 мкМ. Достоверные и сильные взаимосвязи между показателями агрегации и проточной цитометрии (коэффициент корреляции, r от 0,4 до $>0,6$) чаще всего выявляли у ЗД при активации тромбоцитов TRAP 1 мкМ и пациентов со СС при активации тромбоцитов ADP 20 мкМ и 5 мкМ. В то же время во многих других случаях эти взаимосвязи были достаточно слабыми ($r<0,3$), а иногда статистически недостоверными. У ЗД различия между показателями связывания PAC-1 при активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP и всеми концентрациями ADP были незначительными ($\leq 10\%$), хотя показатели связывания CD62P (для всех концентраций ADP) и агрегометрии (5 мкМ и 2,5 мкМ ADP) были существенно снижены (на 40–60%). У пациентов антитромбоцитарная терапия достоверно снижала все показатели активации тромбоцитов в сравнении со ЗД, но в существенно разной степени. Для 10 мкМ TRAP показатель связывания PAC-1 MFI (снижение на 40–50%), а для ADP в обеих концентрациях показатель агрегации T_{max} (снижение на 60–85%) оказались наиболее чувствительными к действию антитромбоцитарных препаратов, по сравнению с другими показателями, снижавшимися в меньшей степени. Полученные данные указывают на возможность несоответствия между показателями агрегации тромбоцитов и экспонирования маркеров активации (проточная цитометрия) при оценке активности тромбоцитов и эффективности антитромбоцитарных препаратов.

Ключевые слова: тромбоциты; агрегация тромбоцитов; проточная цитометрия; гликопротеин IIb-IIIa; P-селектин; антиагрегантные препараты

DOI: 10.18097/PBMC20247002099

ВВЕДЕНИЕ

Оценку функциональной активности тромбоцитов и эффективности антитромбоцитарных препаратов как в клинических, так и в экспериментальных исследованиях, чаще всего проводят с помощью тестов световой агрегометрии и проточной цитометрии [1, 2]. Для измерения агрегации тромбоциты активируют в постоянно перемешиваемой обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП) различными агонистами (ADP, TRAP (thrombin receptor activating peptide, пептид активирующий рецептор тромбина), коллаген, арахидоновая кислота и др.) и регистрируют светопропускание (Т%) суспензии, увеличивающееся при образовании агрегатов. Кривые агрегации в большинстве приборов характеризуются двумя параметрами: максимальным уровнем агрегации, рассчитываемым как максимальное увеличение светопропускания (T_{max}), и максимальной скоростью агрегации (наклоном кривой), рассчитываемой

как максимальное изменение светопропускания в минуту (V_{max}) [3, 4]. В отличие от теста агрегации измерения активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии можно проводить в цельной крови, в небольшом объеме (менее 1 мл) и при низком количестве тромбоцитов. Во время анализа тромбоциты в цельной крови предварительно выявляют (гейтируют) по их размеру и связыванию с тромбоцит-специфичными антителами (CD42b или CD41). Для оценки активности тромбоцитов методом проточной цитометрии к тромбоцитам добавляют агонисты (такие же, как и при анализе агрегации), а уровень активации измеряют по связыванию флуоресцентно-меченых антител против специфических активационных маркеров, экспонируемых на поверхности тромбоцитов. Чаще всего для этих целей используют антитело PAC-1, узнающее активированную конформацию гликопротеина (ГП) IIb-IIIa (CD41/CD61) и различные варианты антител CD62P,

Принятые сокращения: АСК – ацетилсалициловая кислота; ГП – гликопротеин; ЗД – здоровые добровольцы; ОКС – острый коронарный синдром; ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма; СС – стабильная стенокардия; ADP – аденозиндифосфат; MFI – mean fluorescence intensity, средняя интенсивность флуоресценции; TRAP – thrombin receptor activating peptide, пептид активирующий рецептор тромбина.

взаимодействующих с белком Р-селектином, который находится в покоящихся тромбоцитах в мембранах α -гранул, и появляется на поверхности активированных тромбоцитов в результате экзоцитоза гранул. Уровень связывания флуоресцентно-меченых антител обычно характеризуют с помощью двух параметров — средняя интенсивность флуоресценции пика (MFI, mean fluorescence intensity, условные единицы, у.е.) или % положительно меченых тромбоцитов [5, 6]. Несмотря на широкое использование как агрегометрии, так и проточной цитометрии для измерения активности тромбоцитов, неясно, насколько результаты, полученные этими методами, соответствуют друг другу.

В данной работе мы исследовали функциональную активность тромбоцитов у здоровых добровольцев (ЗД) и пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, получающими антитромбоцитарную терапию, сравнивая результаты, полученные с помощью световой агрегометрии (показатели T_{max} и V_{max}), и проточной цитометрии (показатели MFI и % положительных тромбоцитов при связывании антител PAC-1 и CD62P).

МЕТОДИКА

Здоровые добровольцы и пациенты

В исследование были включены: здоровые добровольцы (ЗД) ($n=92$, возраст 46 ± 19 лет, соотношение мужчины/женщины 49/43), не принимавшие никаких лекарственных препаратов в течение 10 дней до забора крови, пациенты со стабильной стенокардией (СС) ($n=42$, возраст 65 ± 11 лет, соотношение мужчины/женщины 28/14), получающих ацетилсалициловую кислоту (АСК) (100 мг в сутки) и клопидогрел (75 мг в сутки), и пациенты с острым коронарным синдромом (ОКС) ($n=73$, возраст 62 ± 10 лет, соотношение мужчины/женщины 55/18), получающих АСК (100 мг в сутки) и тикагрелор (90 мг $\times 2$ раза в сутки). В группе больных ОКС были пациенты с инфарктом миокарда ($n=58$) и нестабильной стенокардией ($n=15$). Всем пациентам в первые сутки госпитализации было выполнено чрескожное коронарное вмешательство. Пациенты в обеих группах были ожидаемо старше ЗД ($p<0,001$), а также количество мужчин в группе ОКС было больше, чем в группе ЗД ($p=0,003$). Кровь у больных ОКС собирали через 4–6 дней после госпитализации. Все пациенты проходили лечение в Национальном медицинском исследовательском центре кардиологии имени академика Е.И. Чазова (НМИЦК).

Агрегация тромбоцитов

Агрегацию тромбоцитов измеряли, как описано ранее [7]. Кровь собирали в 3,8% цитрат натрия (соотношение кровь/антикоагулянт — 9/1); ОТП получали центрифугированием при 180 g в течение 10 мин. Количество тромбоцитов определяли в гематологическом анализаторе Abacus Junior B (“Diatron Ltd.”, Австрия). Агрегацию в ОТП регистрировали в анализаторе БИОЛА (“БИОЛА”, Россия) при температуре 37°C и

скорости перемешивания 800 об/мин. В группе ЗД агрегацию индуцировали 10 мкМ и 1 мкМ TRAP (последовательность SFLLRN, пептид предоставлен М.В. Овчинниковым, НМИЦК) и 20 мкМ, 5 мкМ и 2,5 мкМ ADP (“AppliChem GmbH”, Германия), а у пациентов — 10 мкМ TRAP и 20 мкМ и 5 мкМ ADP. Агонисты добавляли через 0,5 мин после начала регистрации, и измеряли агрегацию в течение 4,5 мин. Определяли максимальный уровень (T_{max} , %T) и максимальную скорость (V_{max} , %T/мин) агрегации.

Проточная цитометрия тромбоцитов

Активность тромбоцитов оценивали с помощью проточной цитометрии путём измерения экспонирования на их поверхности активированного ГП IIb-IIIa и Р-селектина, как подробно описано ранее [8]. Активированный ГП IIb-IIIa выявляли по связыванию PAC-1-FITC (“BD Biosciences”, США), а Р-селектин по связыванию CD62P-FITC (“ИМТЕК”, Россия). Контрольный мышиный IgG-FITC (“ИМТЕК”) использовали для измерения неспецифического связывания. Кровь собирали в 3,8% цитрат натрия (соотношение кровь/антикоагулянт — 9/1) и разбавляли в соотношении 1/6 буфером Тироде без $CaCl_2$ (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,36 мМ NaH_2PO_4 , 0,1% декстроза, 5 мМ HEPES, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,35), содержащим 0,35% бычьего сывороточного альбумина. К 60 мкл разведённой крови добавляли 3 мкл CD42b-APC и 10 мкл PAC-1-FITC, или 5 мкл CD62P-FITC, или 5 мкл мышиного IgG-FITC (контрольные образцы). Тромбоциты не активировали или активировали с помощью TRAP или ADP с использованием тех же концентраций, что и при измерении агрегации. Пробы инкубировали 15 мин при 37°C в темноте без перемешивания, фиксировали равным объёмом 2% параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (140 мМ NaCl, 10 мМ NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 , pH 7,35) в течение 40 мин при комнатной температуре в темноте, а затем анализировали в проточном цитометре BD FACS Canto™ II с использованием программного обеспечения BD FACS Diva™ (“BD Biosciences”, США). Тромбоциты в цельной крови гейтировали в соответствии с их размером и окрашиванием CD42b-APC и анализировали 10000 событий в области тромбоцитов. Тромбоциты в активированных образцах считались PAC-1- и CD62P-положительными (PAC-1+ и CD62P+), когда их флуоресценция превышала флуоресценцию 95% тромбоцитов в контрольных образцах (не активированные тромбоциты с контрольными мышиными IgG-FITC). Рассчитывали средний уровень флуоресценции пиков (MFI, у.е.) и проценты PAC-1- и CD62P-положительных тромбоцитов (PAC-1, % и CD62P, %).

Статистика

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 12 (“StatSoft. Inc.”, США). Большинство анализируемых переменных соответствовали нормальному распределению (критерий Шапиро-Уилка).

Данные представляли, как средние значения \pm стандартные отклонения (SD). Значимость различий оценивали с использованием *t*-критерия для средних или парного *t*-критерия (как указано). Корреляции оценивали с помощью теста Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Функциональную активность тромбоцитов в группах ЗД, не принимавших лекарственных препаратов, пациентов со СС, получавших АСК + клопидогрел, и пациентов с ОКС, получавших АСК + тикагрелор, оценивали с помощью агрегометрии и проточной цитометрии. В группе ЗД тромбоциты активировали TRAP 10 мкМ и 1 мкМ, и ADP 20 мкМ, 5 мкМ и 2,5 мкМ, а в группах пациентов — TRAP 10 мкМ, и ADP 20 мкМ и 5 мкМ. У пациентов не использовали TRAP 1 мкМ и ADP 2,5 мкМ, так как на фоне двойной антитромбоцитарной терапии эти агонисты в столь низких концентрациях стимулировали слабые активационные ответы тромбоцитов. При измерении агрегации регистрировали показатели T_{max} и V_{max} , а при измерении экспонирования маркеров активации в проточном цитометре — MFI и % положительных тромбоцитов по связыванию антител PAC-1 и CD62P.

Результаты измерений активности тромбоцитов с помощью агрегации и проточной цитометрии суммированы в таблице 1. В группе ЗД самые высокие показатели активации тромбоцитов были выявлены для 10 мкМ TRAP, хотя показатели связывания PAC-1 были сопоставимы с таковыми для ADP 20 мкМ и 5 мкМ. У больных со СС и ОКС, получающих двойную антитромбоцитарную терапию, все индексы активации были ожидаемо снижены по сравнению со ЗД. Большее снижение наблюдалось у больных с ОКС по сравнению с больными СС, поскольку они получали тикагрелор — более сильный, чем клопидогрел, антагонист P2Y₁₂ рецепторов ADP. Достоверные различия между группами СС и ОКС были обнаружены по всем показателям при активации тромбоцитов ADP (20 мкМ и 5 мкМ), а при активации 10 мкМ TRAP только по показателям связывания PAC-1, но не по показателям агрегации и связывания CD62P.

Взаимосвязи между показателями агрегации и проточной цитометрии для всех агонистов во всех группах во многих случаях были слабыми (коэффициент корреляции (r) $<0,3$) и даже статистически недостоверными ($p>0,05$) (табл. 2, 3). В группе ЗД низкие, и, в основном, недостоверные корреляции были зарегистрированы при активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP и 20 мкМ ADP, предположительно из-за их насыщающего действия на все параметры активации тромбоцитов, за исключением связывания CD62P для 20 мкМ ADP. Более выраженные корреляции чаще отмечены при низких концентрациях ADP (5 мкМ и 2,5 мкМ), а наиболее высокие при активации тромбоцитов 1 мкМ TRAP ($r >0,4$ и $>0,5$ для некоторых взаимодействий) (табл. 2, примеры гистограмм для высоких и низких корреляций у ЗД — см. Дополнительные материалы, рис. S1). У пациентов

проводимая антитромбоцитарная терапия заметно снижала активность тромбоцитов, и в этой ситуации достоверные корреляции между показателями агрегации и проточной цитометрии были зарегистрированы и при активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP. Высокие корреляции наблюдались при активации тромбоцитов ADP 20 мкМ и 5 мкМ ($r >0,5$ и $>0,6$ для некоторых взаимосвязей). Однако такие корреляции чаще выявлялись у больных со СС, чем у больных ОКС, возможно в связи с сильно сниженными индексами агрегации/активации у больных ОКС, получавших вместо клопидогрела тикагрелор — более сильный блокатор P2Y₁₂ рецепторов ADP (табл. 3, примеры гистограмм для высоких и низких корреляций у пациентов — см. Дополнительные материалы, рис. S2).

Более выраженные корреляции были получены при сравнении двух тестов проточной цитометрии (табл. 2 и 3, примеры гистограмм для высокой и низкой корреляции — см. Дополнительные материалы, рис. S3). В группе ЗД корреляции между показателями связывания PAC-1 и CD62P (MFI и % положительных тромбоцитов) были достоверными в подавляющем большинстве случаев для всех концентраций TRAP и ADP. Самые высокие коэффициенты корреляции (r до 0,8) были обнаружены для 1 мкМ TRAP. У больных СС все корреляции между показателями связывания PAC-1 и CD62P были достаточно сильными ($r >0,5$ для большинства взаимосвязей), однако у больных ОКС эти же корреляции были преимущественно низкими и недостоверными. По крайней мере, при активации тромбоцитов ADP это можно объяснить низкими активационными ответами тромбоцитов из-за более мощной антитромбоцитарной терапии (тикагрелор вместо клопидогрела).

TRAP (10 мкМ) является наиболее мощным агонистом, использованным в нашем исследовании. В группе ЗД различные показатели активации тромбоцитов снижались в разной степени при активации тромбоцитов ADP по сравнению с 10 мкМ TRAP (принято за 100%) (табл. 1, рис. 1). Для 1 мкМ TRAP снижение было практически одинаковым для всех показателей агрегации и проточной цитометрии — около 50–60% (табл. 1, рис. 1). Однако при активации тромбоцитов ADP во всех применяемых концентрациях эта разница была минимальной для показателей связывания PAC-1 ($<10\%$), а для 20 мкМ ADP показатель PAC-1, MFI была даже достоверно выше, чем для TRAP 10 мкМ. В отличие от показателей связывания PAC-1, показатели связывания CD62P при использовании ADP были значительно ниже по сравнению с 10 мкМ TRAP (снижение на 40–60%), а для показателей агрегации эти различия сильно зависели от концентрации ADP (снижение от 5–20% до примерно 50% для 20 мкМ и 2,5 мкМ ADP соответственно) (табл. 1, рис. 1).

Антитромбоцитарная терапия у больных СС и ОКС приводит к статистически значимому снижению всех показателей активации тромбоцитов (табл. 1, рис. 2). Однако это снижение было сильно вариабельным

ТРОМБОЦИТЫ В ТЕСТАХ АГРЕГАЦИИ И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Таблица 1. Показатели агрегации тромбоцитов (T_{\max} , V_{\max}) и показатели их активации, измеренные с помощью проточной цитометрии (PAC-1, MFI, PAC-1, %, и CD62P, MFI, CD62P, %) у ЗД, пациентов со СС, получающих АСК + клопидогрел, и пациентов с ОКС, получающих АСК + тикагрелор

Агонист	Параметр	ЗД (n — 83–92)	СС АСК + клопидогрел (n — 38–42) $p(ЗД) \leq 0,001$	ОКС АСК + тикагрелор (n — 70–73) $p(ЗД) < 0,001$
Агрегация				
TRAP, 10 мкМ	T_{\max} , %T	65±10	55±10	54±11 $p(CC)=0,467$
	V_{\max} , %T/мин	87±20	75±17	77±19 $p(CC)=0,576$
TRAP, 1 мкМ	T_{\max} , %T	32±29	—	—
	V_{\max} , %T/мин	42±31	—	—
ADP, 20 мкМ	T_{\max} , %T	62±11	26±12	14±8 $p(CC) < 0,001$
	V_{\max} , %T/мин	70±14	47±14	35±12 $p(CC) < 0,001$
ADP, 5 мкМ	T_{\max} , %T	51±16	15±9	8±6 $p(CC) < 0,001$
	V_{\max} , %T/мин	57±15	35±12	25±11 $p(CC) < 0,001$
ADP, 2,5 мкМ	T_{\max} , %T	34±23	—	—
	V_{\max} , %T/мин	39±16	—	—
Проточная цитометрия, связывание PAC-1				
TRAP, 10 мкМ	PAC-1, MFI, у.е.	3258±986	1984±685	1559±473 $p(CC) < 0,001$
	PAC-1, %	89±7	67±16	59±12 $p(CC)=0,001$
TRAP, 1 мкМ	PAC-1, MFI, у.е.	1788±882	—	—
	PAC-1, %	43±26	—	—
ADP, 20 мкМ	PAC-1, MFI, у.е.	3578±1064	2144±723	1586±527 $p(CC) < 0,001$
	PAC-1, %	90±5	63±20	48±12 $p(CC) < 0,001$
ADP, 5 мкМ	PAC-1, MFI, у.е.	3242±961	1903±637	1379±461 $p(CC) < 0,001$
	PAC-1, %	86±7	57±20	38±12 $p(CC) < 0,001$
ADP, 2,5 мкМ	PAC-1, MFI, у.е.	2917±957	—	—
	PAC-1, %	82±9	—	—
Проточная цитометрия, связывание CD62P				
TRAP, 10 мкМ	CD62P MFI, у.е.	1680±407	1348±341	1243±301 $p(CC)=0,095$
	CD62P, %	94±4	88±9	88±7 $p(CC)=0,903$
TRAP, 1 мкМ	CD62P MFI, у.е.	555±262	—	—
	CD62P, %	37±22	—	—
ADP, 20 мкМ	CD62P MFI, у.е.	745±228	566±188	426±105 $p(CC) < 0,001$
	CD62P, %	59±13	34±16	22±10 $p(CC) < 0,001$
ADP, 5 мкМ	CD62P MFI, у.е.	654±197	523±160	391±87 $p(CC) < 0,001$
	CD62P, %	53±14	30±15	19±10 $p(CC) < 0,001$
ADP, 2,5 мкМ	CD62P MFI, у.е.	595±175	—	—
	CD62P, %	47±14	—	—

Примечание. Представлены средние значения ± SD; у.е. – условные единицы; PAC-1, % и CD62P, % – здесь и далее процент PAC-1 и CD62P-положительных тромбоцитов; n – количество ЗД или пациентов; $p(ЗД) \leq 0,001$ для группы СС и $p(ЗД) < 0,001$ для группы ОКС – достоверности различий по всем тестируемым показателям от группы ЗД; $p(CC)$ – достоверности различий по указанным показателям в группе ОКС от группы СС (t -критерий для средних).

Таблица 2. Корреляции показателей агрегации (T_{\max} , V_{\max}) и показателей активации тромбоцитов, измеренных с помощью проточной цитометрии (PAC-1, MFI, PAC-1, %, и CD62P, MFI, CD62P, %) у ЗД

TRAP, 10 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,176	0,062	0,134	0,010
V_{\max}	0,148	0,183	0,137	0,158
PAC-1, MFI	—	—	0,497***	0,312**
PAC-1, %	—	—	0,219	0,268*
TRAP, 1 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,256*	0,527***	0,446***	0,449***
V_{\max}	0,247*	0,534***	0,452***	0,481***
PAC-1, MFI	—	—	0,593***	0,538***
PAC-1, %	—	—	0,794***	0,807***
ADP, 20 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,275**	0,287**	0,167	0,126
V_{\max}	0,229*	0,140	0,130	0,074
PAC-1, MFI	—	—	0,319**	0,422***
PAC-1, %	—	—	0,173	0,190
ADP, 5 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,320**	0,245*	0,265*	0,323**
V_{\max}	0,392***	0,249*	0,233*	0,202
PAC-1, MFI	—	—	0,343**	0,409***
PAC-1, %	—	—	0,250*	0,174
ADP, 2,5 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,274*	0,249*	0,349**	0,443***
V_{\max}	0,249*	0,232*	0,262*	0,213
PAC-1, MFI	—	—	0,347**	0,392***
PAC-1, %	—	—	0,276*	0,179

Примечание. Представлены коэффициенты корреляции; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверность корреляции; n – 83-92.

и зависело не только от силы агониста (ожидаемо менее выражено для 10 мкМ TRAP по сравнению с 20 мкМ и 5 мкМ ADP), но и от конкретного рассматриваемого показателя. При активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP антитромбоцитарные препараты существенно снижали показатель PAC-1, MFI (на 40–50%), в то время как другие показатели снижались менее эффективно: <20% для показателей агрегации, с 35% до 20% для PAC-1, % и CD62P MFI, и <10% для CD62P, % (табл. 1, рис. 2). При активации тромбоцитов ADP максимальное снижение отмечено для показателя агрегации T_{\max} — снижение от 60% и до 85% для 20 мкМ ADP у больных со СС (АСК + клопидогрел) и для 5 мкМ ADP у больных ОКС (АСК + тикагрелор) соответственно (табл. 1, рис. 2). Остальные показатели, в том числе V_{\max} для агрегации и все показатели активности, измеренные с помощью проточной цитометрии, были менее чувствительны к терапии: снижение от 20% до 50% и от 40% до 60%

у пациентов со СС и ОКС соответственно. Наименьшее снижение отмечено для показателя CD62P, MFI у пациентов со СС — всего лишь около 20% для обеих концентраций ADP (табл. 1, рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки функционального состояния тромбоцитов у здоровых лиц, пациентов с нарушениями гемостаза, и пациентов, получающих антитромбоцитарные препараты, стандартно используют тесты световой агрегометрии и проточной цитометрии. В нашем исследовании мы сравнили показатели, получаемые с помощью обоих тестов при исследовании активности тромбоцитов у ЗД и пациентов со СС и ОКС, получающих двойную антиагрегантную терапию АСК + клопидогрел и АСК + тикагрелор соответственно. Мы получили достаточно неожиданные результаты. Оказалось, что корреляции между показателями, характеризующими агрегацию

ТРОМБОЦИТЫ В ТЕСТАХ АГРЕГАЦИИ И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Таблица 3. Корреляции показателей агрегации (T_{\max} , V_{\max}) и показателей активации тромбоцитов, измеренных с помощью проточной цитометрии (PAC-1, MFI, PAC-1, %, и CD62P, MFI, CD62P, %) у пациентов со СС (АСК + клопидогрел) и ОКС (АСК + тикагрелор)

СС (АСК + клопидогрел)				
TRAP, 10 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,452**	0,578***	0,285	0,417**
V_{\max}	0,482**	0,204	0,297	0,217
PAC-1, MFI	—	—	0,635***	0,410**
PAC-1, %	—	—	0,358*	0,540***
ADP, 20 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,562***	0,651***	0,496***	0,680***
V_{\max}	0,422**	0,489**	0,269	0,407**
PAC-1, MFI	—	—	0,425**	0,551***
PAC-1, %	—	—	0,556***	0,677***
ADP, 5 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,524***	0,593***	0,426**	0,607***
V_{\max}	0,456**	0,596***	0,288	0,560***
PAC-1, MFI	—	—	0,366*	0,502**
PAC-1, %	—	—	0,579***	0,655***
ОКС (АСК + тикагрелор)				
TRAP, 10 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,364**	0,149	-0,001	-0,056
V_{\max}	0,327**	-0,090	0,024	-0,056
PAC-1, MFI	—	—	0,417***	0,236
PAC-1, %	—	—	0,234	0,230
ADP, 20 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,507***	0,402***	0,294*	0,301*
V_{\max}	0,484***	0,301*	0,160	0,132
PAC-1, MFI	—	—	0,233	0,231
PAC-1, %	—	—	0,417***	0,255*
ADP, 5 мкМ				
	PAC-1, MFI	PAC-1, %	CD62P, MFI	CD62P, %
T_{\max}	0,315**	0,324**	0,322**	0,376**
V_{\max}	0,239	0,263*	0,222	0,305*
PAC-1, MFI	—	—	0,171	0,186
PAC-1, %	—	—	0,308**	0,164

Примечание. Представлены коэффициенты корреляции; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверность корреляции; n – 38-41 для группы СС и n – 78-82 для группы ОКС.

тромбоцитов (T_{\max} и V_{\max}) и экспрессию активированного GPIIb/IIIa и P-селектина (MFI и % положительных тромбоцитов при связывании антител PAC-1 и CD62P соответственно), не всегда были высокими, а, наоборот, довольно часто низкими и даже статистически незначимыми. Это было справедливо даже для показателей связывания PAC-1, хотя регистрируемые этим антителом конформационные изменения GPIIb/IIIa и последующее связывание фибриногена

активированным рецептором напрямую опосредуют агрегацию тромбоцитов. В ряде случаев низкие корреляции можно было объяснить: 1) насыщением агрегационных/активационных ответов при применении сильных агонистов (например, 10 мкМ TRAP для всех индексов и 20 мкМ ADP для индексов агрегации и связывания PAC-1 в группе 3Д), или 2) наоборот, очень низкими ответами при сильном подавлении активности тромбоцитов антиагрегантными препаратами

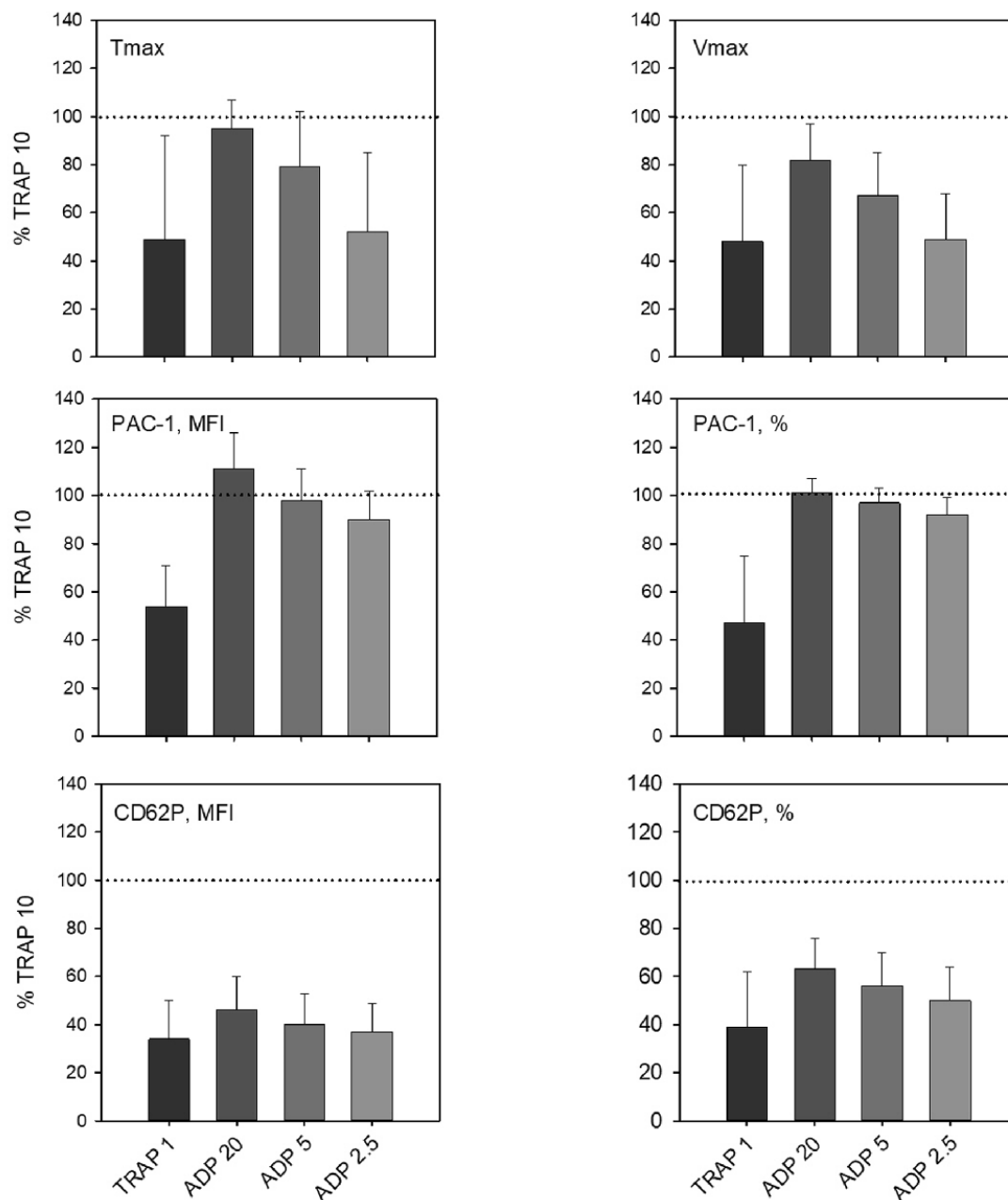


Рисунок 1. Сравнение показателей агрегации тромбоцитов (T_{max} , V_{max}) и показателей активации тромбоцитов, измеренных с помощью проточной цитометрии (PAC-1, MFI, PAC-1, % и CD62P, MFI, CD62P, %), при активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP (100%) и другими агонистами (1 мкМ TRAP и 20 мкМ, 5 мкМ, 2,5 мкМ ADP) в группе ЗД. Представлены средние значения \pm SD. Снижение всех показателей от 10 мкМ TRAP достоверно ($p < 0,001$), кроме 20 мкМ ADP, MFI (достоверное увеличение, $p < 0,001$), 20 мкМ ADP, PAC-1, % (отличий нет, $p = 0,102$), и 5 мкМ ADP, PAC-1, MFI (отличий нет, $p = 0,150$) (t -критерий для пар). Абсолютные значения – см. таблица 1.

(например, при активации тромбоцитов 5 мкМ ADP у пациентов с ОКС, получающих АСК и мощный ингибитор рецепторов ADP — тикагрелор). С более общей точки зрения зарегистрированные расхождения в показателях агрегации и проточной цитометрии можно объяснить разными условиями, использованными в этих тестах. Агрегацию проводили в неразбавленной, постоянно перемешиваемой ОТП при температуре 37°C, тогда как все манипуляции при измерении активности в проточном цитометре проводили в не перемешиваемой и сильно разбавленной

цельной крови (частично для предотвращения агрегации) и при комнатной температуре. Это предположение подтверждается тем фактом, что Frijmovic и соавт. [9] обнаружили сильную корреляцию между параметрами агрегации и связывания PAC-1, когда оба теста проводили в разбавленной ОТП и в одинаковых условиях (в этом исследовании агрегацию регистрировали не по изменениям светопропускания, а по уменьшению в суспензии количества единичных (не агрегированных) тромбоцитов). Наиболее часто высокие корреляции между показателями агрегации тромбоцитов

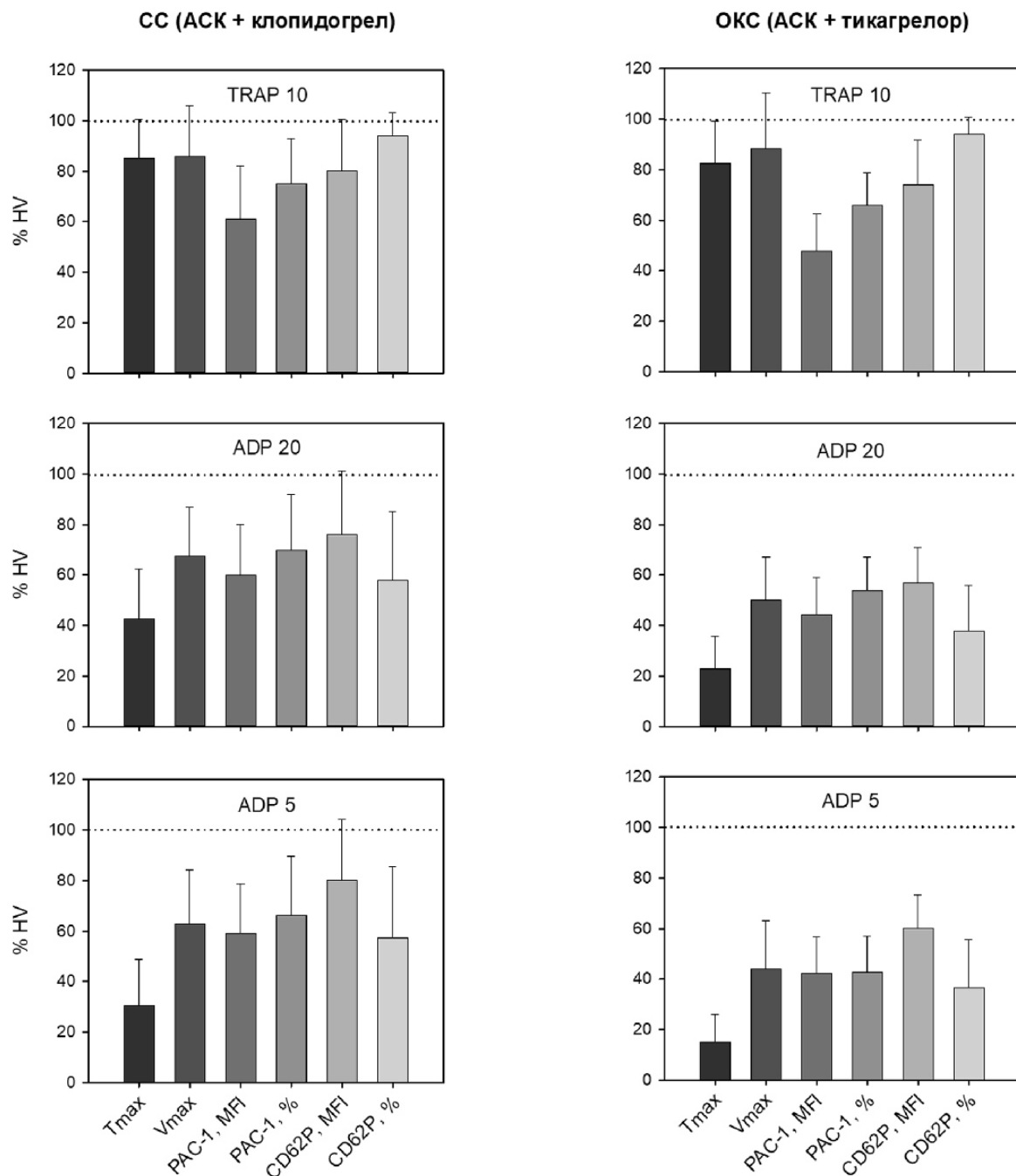


Рисунок 2. Снижение показателей агрегации (T_{max} , V_{max}) и показателей активации тромбоцитов, измеренных с помощью проточной цитометрии (PAC-1, MFI, PAC-1, % и CD62P, MFI, CD62P, %) у больных со СС (АСК + клопидогрел) и ОКС (АСК + тикагрелор) по сравнению со ЗД (100%). Представлены средние значения \pm SD. Все различия от ЗД достоверны ($p < 0,001$, t -критерий для средних). Абсолютные значения – см. таблица 1.

и показателями их активации, измеренными с помощью проточной цитометрии, выявляли для промежуточных (не насыщающих и не очень низких) агрегационных/активационных ответов, например в группе ЗД, когда тромбоциты активировали 1 мкМ TRAP, и в группе пациентов со СС (АСК + клопидогрел), при активации тромбоцитов всеми использованными агонистами (для 10 мкМ TRAP только для индексов PAC-1). Наши результаты у пациентов со СС были сопоставимы с результатами, полученными Gremmel и соавт. [10], которые обнаружили почти такие же корреляции ($r \approx 0,5-0,6$)

между уровнем агрегации тромбоцитов и уровнями экспонирования активированного ГП IIb/IIIa и Р-селектина, при активации тромбоцитов ADP у пациентов со СС после чрескожного вмешательства, получавших ту же антиагрегантную терапию (АСК + клопидогрел).

Уровни экспонирования активированного ГП IIb/IIIa (связывание антитела PAC-1) и белка α -гранул Р-селектина (связывание антитела CD62P), регистрируемые с помощью проточной цитометрии, продемонстрировали лучшую корреляцию друг с другом, чем с показателями агрегации.

Очевидно, это обусловлено тем, что в отличие от агрегации, эти измерения выполняются в идентичных условиях, хотя и регистрируют принципиально разные реакции тромбоцитов — активацию рецептора фибриногена (ГП IIb-IIIa) и экзоцитоз α -гранул. Как и в случае с агрегацией, самые высокие корреляции были зарегистрированы для 1 мкМ TRAP в группе ЗД и для всех агонистов у пациентов с СС (АСК + клопидогрел).

В группе ЗД активация тромбоцитов отмечена при использовании 10 мкМ и 1 мкМ TRAP и 20 мкМ, 5 мкМ и 2,5 мкМ ADP. TRAP (10 мкМ) был самым сильным агонистом и, при его использовании ожидаемо регистрировались максимально высокие показатели агрегации тромбоцитов и экспонирования маркеров активации. Снижение концентрации TRAP до 1 мкМ приводило примерно к одинаковому снижению (50–60%) всех показателей; однако при активации тромбоцитов ADP (все концентрации) эти изменения сильно различались для разных показателей. Показатели агрегации для 20 мкМ ADP были близки к таковым для 10 мкМ TRAP и постепенно снижались для 5 мкМ и 2,5 мкМ ADP. В то же время для всех концентраций ADP показатели связывания PAC-1 были практически одинаковыми, а показатели связывания CD62P были значительно ниже по сравнению с 10 мкМ TRAP. Эти данные показывают, что сравнение активации тромбоцитов, стимулируемой различными агонистами, может дать сильно различающиеся результаты в зависимости от применяемого теста.

Мы также обнаружили, что чувствительность к двойной антиагрегантной терапии (АСК + клопидогрел у больных со СС и АСК + тикагрелор у больных с ОКС) сильно варьирует при использовании разных способов измерения функционального состояния тромбоцитов. Степень ингибирования активации тромбоцитов у пациентов по сравнению со ЗД при использовании одного и того же агониста могла варьировать в несколько раз для разных показателей. Например, у пациентов со СС и ОКС при активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP показатель PAC-1, MFI снижался на 40–50%, а CD62P, % менее чем на 10%, а при активации тромбоцитов 5 мкМ ADP показатель T_{max} в тесте агрегации снижался на 70–85%, а CD62P, MFI лишь на 20–40%. Существенные расхождения в уровнях ингибирования были также обнаружены между показателями PAC-1, MFI и показателями агрегации, при активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP, между показателем T_{max} и всеми остальными показателями, при активации тромбоцитов обеими дозами ADP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные указывают на возможность несоответствия между показателями агрегации тромбоцитов и экспонирования маркеров активации (проточная цитометрия) при оценке активности тромбоцитов и эффективности антитромбоцитарных препаратов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.А. Овчинникову (НМИЦК) за предоставление TRAP.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда, грант № 22-15-00005.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все добровольцы и пациенты предоставили добровольное информированное согласие на использование их образцов крови в исследовательских целях. Проведение исследования было одобрено независимым этическим комитетом НМИЦК (протокол № 279 от 25 апреля 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Lordkipanidze M., Hvas A.-M., Harrison P. (2019) Clinical tests of platelet function. In: Platelets, 4th ed. (Michelson A.D., Cattaneo M., Frelinger A.L., Newman P.J., eds.), Academic Press, pp. 593–608.
2. Larsen J.B., Hvas A.-M., Hojbjerg J.A. (2023) Platelet function testing: Update and future directions. Semin. Thromb. Hemost., **49**(6), 600–608. DOI: 10.1055/s-0042-1757898
3. Hayward C.P.M., Moffat K.A. (2017) Platelet Aggregation. In: Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders (Gresele P., Kleiman N.S., Lopez J.A., Page C.P., eds.), Springer, pp. 619–636.
4. le Blanc J., Mullier F., Vayne C., Lordkipanidze M. (2020) Advances in platelet function testing — light transmission aggregometry and beyond. J. Clin. Med., **9**, 2636. DOI: 10.3390/jcm9082636
5. Linden M.D. (2013) Platelet flow cytometry. Methods Mol. Biol., **992**, 241–262. DOI: 10.1007/978-1-62703-339-8_18
6. Blair T.A., Frelinger A.L., Michelson A.D. (2019) Flow Cytometry. In: Platelets, 4th ed. (Michelson A.D., Cattaneo M., Frelinger A.L., Newman P.J., eds.), Academic Press, pp. 627–651.
7. Хаспекова С.Г., Зюряев И.Т., Якушкин В.В., Наймушин Я.А., Сироткина О.В., Зайцева Н.О., Руда М.Я., Мазуров А.В. (2014) Средний объем тромбоцитов: взаимосвязи с агрегационной активностью тромбоцитов и уровнем экспрессии гликопротеинов IIb-IIIa и Ib. Биомедицинская химия, **60**(1), 94–108. [Khaspekov S.G., Zyuryaev I.T., Yakushkin V.V., Naimushin Ya.A., Sirotkina O.V., Zaytseva N.O., Ruda M.Ya., Mazurov A.V. (2014) Mean platelet volume: Interactions with platelet aggregation activity and glycoprotein IIb-IIIa and Ib expression levels. Biomeditsinskaya Khimiya, **60**(1), 94–108.] DOI: 10.18097/PBMC20146001094

8. Bodrova V.V., Shustova O.N., Khaspekova S.G., Mazurov A.V. (2022) Platelet reticulated forms, size indexes, and functional activity. Interactions in healthy donors. *Platelets*, **33**, 398-403. DOI: 10.1080/09537104.2021.1922659
9. Frojmovic M.M., Mooney R.F., Wong T. (1994) Dynamics of platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor expression and fibrinogen binding. II. Quantal activation parallels platelet capture in stir-associated microaggregation. *Biophys. J.*, **67**, 2069-2075. DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80690-3
10. Gremmel T., Koppensteiner R., Panzer S. (2015) Comparison of aggregometry with flow cytometry for the assessment of agonists'-induced platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy. *PLOS One*, **10**(6), e0129666. DOI: 10.1371/journal.pone.0129666

Поступила в редакцию: 04. 04. 2024.
После доработки: 10. 04. 2024.
Принята к печати: 13. 04. 2024.

ASSESSMENT OF PLATELET FUNCTIONAL ACTIVITY IN HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS RECEIVING ANTIPLATELET THERAPY. POSSIBLE INCONSISTENCIES BETWEEN AGGREGATION AND FLOW CYTOMETRY TESTS

V.V. Bodrova*, O.N. Shustova, N.V. Golubeva, A.K. Alieva, V.V. Vlodzyanovsky, D.V. Pevzner, A.V. Mazurov

Chazov National Medical Research Center of Cardiology,
15a Academician Chazov str., Moscow, 121552 Russia; *e-mail: malysheva-valeri@mail.ru

Platelet functional activity was assessed in healthy volunteers (HV, n=92), patients with stable angina pectoris (SA, n=42) and acute coronary syndrome (ACS, n=73), treated with acetylsalicylic acid (ASA) + clopidogrel and ASA + ticagrelor, respectively. In all HV and patients we have compared parameters of platelet aggregation (maximum light transmission and velocity, T_{max} and V_{max}) and parameters, characterizing exposure of platelet activation markers, evaluated by flow cytometry. HV platelets were activated by 10 μ M, 1 μ M TRAP, and 20 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M ADP; patient platelets were activated by 10 μ M TRAP and by 20 μ M and 5 μ M ADP. Strong and significant correlations between the aggregation and flow cytometry parameters (the r correlation coefficient from 0.4 up to >0.6) most frequently were registered in HV platelet during activation by 1 μ M TRAP and in SA patients during platelet activation by 20 μ M and 5 μ M ADP. However, in many other cases these correlations were rather weak ($r < 0.3$) and sometimes statistically insignificant. In HV the differences in PAC-1 binding parameters between platelets activated by 10 μ M TRAP (the strongest agonist) and all ADP concentrations were negligible ($\leq 10\%$), while CD62P binding (at all ADP concentrations) and LTA parameters for (5 μ M and 2.5 μ M ADP) were significantly lower (by 40–60%). Antiplatelet therapy in patients decreased all parameters as compared to HV, but to varying extents. For 10 μ M TRAP the MFI index for PAC-1 binding (40–50% decrease) and for both ADP concentrations the T_{max} values (60–85% decrease) appeared to be the most sensitive in comparison with the other parameters that decreased to a lesser extent. The data obtained indicate a possibility of inconsistency between different LTA and flow cytometry parameters in assessing platelet activity and efficacy of antiplatelet drugs.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: platelets; platelet aggregation; flow cytometry; glycoprotein IIb-IIIa; P-selectin; antiplatelet drugs

Funding. The work was supported the Russian Science Foundation, project No. 22-15-00005.

Received: 04.04.2024; revised: 10.04.2024; accepted: 13.04.2024.