

СТОЛЯР

Марина Александровна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ К
АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЕ У БОЛЬНЫХ С
ХРОНИЧЕСКИМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ОПУХОЛЯМИ
МЕТОДОМ ИМПЕДАНСНОЙ АГРЕГОМЕТРИИ**

Специальность:

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук доцент **Ольховский Игорь Алексеевич**

Официальные оппоненты:

Сироткина Ольга Васильевна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры лабораторной медицины и генетики.

Ройтман Евгений Витальевич - доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «17» декабря 2019 года в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, дом 54 и на сайте <https://nrcerm.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Известно, что нарушения тромбоцитарного гемостаза вносят существенный вклад в патогенетические механизмы развития внутрисосудистых тромбозов и кровоточивости. Многочисленные клинические данные подтверждают высокую эффективность профилактической дезагрегационной терапии малыми дозами ацетилсалициловой кислоты в профилактике атеротромботических событий у пациентов высокого риска развития инфаркта миокарда и ишемических инсультов [Espinosa E.V., Murad P.J., 2011]. АСК также широко применяется при хронических миелопролиферативных заболеваниях в связи с развивающимся тромбоцитозом и реологическими нарушениями. Показано, что патогенетической основой большинства случаев ХМО является мутация V617F в гене янускиназы-2, которая вызывает независимую от наличия ростовых факторов активацию пролиферации клеток-предшественниц эритромиелопоэза [Levine R.L., Wernig G., 2006]. Возникающие при этом дефекты образования тромбоцитов сопровождаются не только их количественными, но и качественными изменениями, в частности выраженным прокоагулянтным фенотипом [Barbui T., Finazzi G., 2013]. Мутация JAK2 V617F является независимым фактором риска смерти от инфаркта и тромбоэмболии [Nielsen C., Birgens H.S., Nordestgaard B.G., Wojesen S.E., 2012]. Вместе с тем, остаются неясными механизмы влияния избыточной активации янускиназы на агрегационную активность тромбоцитов и их чувствительность к эффекту АСК.

Опыт широкого применения АСК демонстрирует факт существования категории больных, резистентных к дезагрегационному действию АСК. Одновременно показано, что терапия АСК даже в низких дозах повышает в 2–4 раза риск серьезных геморрагических осложнений. Кроме того, наличие скрытого синдрома Виллебранда или его развитие при высоких значениях тромбоцитоза вызывает кровоточивость и является противопоказанием к приему АСК [Tiede A., Rand J.H., 2010]. Не нашли должного обсуждения и гендерные различия в эффективности аспиринопрофилактики [Christiaens L., Ragot S., 2008]. В связи с вышесказанным, очевидна целесообразность индивидуального учета агрегационных характеристик тромбоцитов перед назначением и в процессе терапии дезагрегантами. Предложены прогностические методы определения аспиринорезистентности на агрегометре импедансным и оптическим тестами после предварительной инкубации АСК с образцами крови *in vitro*. Вместе с тем, в доступных источниках нет сведений о сравнительной информативности оптического и импедансного методов оценки резистентности к АСК в тестах *in vitro*. До сих пор не решены проблемы стандартизации агрегационных методов, нет сведений о биологической вариации получаемых результатов агрегометрии, необходимых для оптимального подхода к определению границ «нормы» функционального ответа тромбоцитов.

Степень разработанности темы

В последние годы были широко изучены клиническая вариабельность ответа на АСК и феномены «резистентности», «антиагрегантной устойчивости» или «высокой реактивности тромбоцитов при лечении», определяемые как биохимическая неспособность антиагреганта ингибировать функции тромбоцитов *ex vivo*, [Hankey G.J., Eikelboom J.W., 2006]. Существуют различные методы тестирования функции тромбоцитов для оценки их ингибирования, вызванного АСК: оптическая агрегометрия, анализатор функции тромбоцитов-100 (PFA-100, Германия), VerifyNow (США), импедансная агрегометрия, проточная цитофлуориметрия. Но на сегодняшний день отсутствует стандартизованная технология оценки ответа тромбоцитов на терапию АСК, которая бы учитывала индивидуальную биологическую вариацию агрегации, а данные о пользе существующих методов оценки эффекта АСК весьма противоречивы. В настоящее время стало понятно, что наиболее объективным является проведение исследования функции тромбоцитов методами, обеспечивающими максимально приближенные условия к условиям *in vivo*, одним из

которых является импедансная агрегометрия, которая позволяет тестировать агрегацию в цельной крови пациента. Однако исследование технологии *in vitro* определения чувствительности тромбоцитов к АСК методом импедансной агрегометрии у пациентов с ХМО не проводилось.

Цель исследования

Определить биологические и аналитические характеристики метода импедансной агрегометрии тромбоцитов и особенности влияния ацетилсалициловой кислоты на агрегационную активность тромбоцитов у пациентов с хроническими миелопролиферативными опухолями.

Задачи исследования:

1. Определить оптимальную концентрацию АСК, ингибирующую агрегацию тромбоцитов *in vitro*;
2. Оценить показатели аналитической и биологической вариации результатов агрегационного теста с инкубацией АСК *in vitro*;
3. Исследовать особенности влияния АСК на агрегацию тромбоцитов у пациентов с ХМО с мутацией в гене JAK2;
4. Разработать способ диагностики чувствительности тромбоцитов к АСК на основе комплексной импеданс-люминесцентной агрегометрии.

Научная новизна

Впервые проведена оценка биологической вариации и выявлены гендерные отличия параметров импедансной агрегометрии. Впервые в тесте с селективным ингибитором янускиназы-2 показана роль данного фермента тромбоцитов в регуляции агрегации посредством посттрансляционных сигнальных механизмов. Выявлены более высокие показатели агрегации тромбоцитов у пациентов с ЭТ в сравнении с аналогичными параметрами у пациентов с ИП. Впервые проведено исследование зависимости эффекта АСК *in vitro* от используемого антикоагулянта для взятия венозной крови.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены данные, свидетельствующие об участии янускиназы-2 в посттрансляционных механизмах регуляции агрегационной функции тромбоцитов. Проведена оценка аналитических параметров теста импедансной агрегометрии с учетом их биологической вариации. Разработан новый способ предиктивной оценки индивидуальной чувствительности тромбоцитов пациента к АСК, основанный на комплексном импеданс-люминесцентном методе регистрации агрегации и высвобождения содержимого тромбоцитарных гранул после *in vitro* инкубации проб крови с АСК.

Положения, выносимые на защиту

1. Межиндивидуальная вариация параметров импедансного метода измерения агрегации тромбоцитов значительно превышает внутрииндивидуальную, что определяет целесообразность их интерпретации в сравнении с предыдущими значениями.
2. Янускиназа-2 тромбоцитов вовлечена в механизмы регуляции агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с хроническими миелопролиферативными опухолями.
3. Комбинация импедансного и люминесцентного способа измерения активности тромбоцитов отражает их чувствительность к АСК.

Методология и методы исследования

Для реализации поставленной цели был проведен анализ литературы, выполнены экспериментальные исследования *in vitro*, использованы методы статистической обработки данных и кластерный анализ. В качестве материала использовались образцы периферической крови пациентов и здоровых добровольцев. Для оценки агрегационной функции тромбоцитов и определения чувствительности к АСК использовали метод импедансной агрегометрии в цельной крови, результат агрегации оценивали по значению максимальной величины амплитуды сдвига импеданса (в Ом \times) до и после инкубации пробы цельной крови с раствором АСК, а также метод комплексной импеданс-люминесцентной агрегометрии, основанный на определении секреции гранул тромбоцитов с помощью люциферин-

люциферазной реакции с АТФ. Измерения осуществлялись на агрегометре Chrono-Log 700 (Chrono-Log Corp., США).

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в постановке цели и задач, решаемых в диссертационной работе, самостоятельно осуществлял поиск литературных источников, осуществлял подготовку и проведение экспериментов по оценке эффекта АСК у пациентов, исследованию воспроизводимости методики определения чувствительности к антиагрегантной терапии, анализу и статистической обработке полученных данных. Автор лично принимал участие в подготовке статей по материалам проведенных экспериментов.

Внедрение результатов исследования в практику

Получен патент на изобретение № 2538219 «Способ определения резистентности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте» (Ольховский И.А., Столяр М.А.).

Результаты исследования внедрены в практику работы клинико-диагностической лаборатории КГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства» (акт внедрения от 26.12.2017 г.) и лаборатории Красноярского филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (акт внедрения от 27.12.2017 г.).

Достоверность результатов исследования

Степень достоверности результатов исследования обеспечивается детальным анализом имеющихся литературных данных, адекватными методами исследования, в соответствии с поставленными задачами, достаточными объемам выборок пациентов и здоровых добровольцев. Результаты были проанализированы с использованием корректных методов статистической обработки данных.

Апробация работы

Основные теоретические и практические положения диссертации представлены в докладах на 50-й юбилейной Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (г. Новосибирск, 13–19 апреля 2012 г.), VIII Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 155-летию со дня рождения К.Э. Циолковского (г. Красноярск, 19-24 апреля, 2012 г.), XVI Международной научной школе-конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (г. Абакан, ноябрь 2012 г.), Краевой научно-практической конференции «Актуальные вопросы клинической лабораторной диагностики» (г. Красноярск, 29-30 ноября, 2012 г.), IX Всероссийской научно-технической конференции с международным участием, посвященной 385-летию со дня основания г. Красноярска (г. Красноярск, 15-25 апреля 2013 г.), 51-ой юбилейной Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (г. Новосибирск, апрель 2013 г.), Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвященной 85-летию профессора Е.Н. Дормидонтова (г. Ярославль, апрель 2013 г.), Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2013» (г. Москва, апрель 2013 г.), 77-й итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 90-летию со дня рождения профессора П. Г. Макарова и 90-летию со дня рождения доцента Б.М. Зельмановича (г. Красноярск, апрель 2013 г.), XVIII форуме «Национальные дни лабораторной медицины России» (г. Москва, 1-3 октября 2013 г.), Енисейских гематологических чтениях (г. Красноярск, 29-30 ноября 2013 г.), на 6-й Международной конференции по Миелопролиферативным опухолям «6th International Conference on Myeloproliferative Neoplasms» (г. Эшторил, Португалия, 2014 г.), II Российском конгрессе гематологов (г. Москва, 12-14 октября 2016 г.).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 39 научных работ, из них: 8 статей в изданиях, включенных в перечень ВАК, 30 публикаций в сборниках и материалах конференций. Получен 1 патент на изобретение.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 95 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц, иллюстрирована 8 рисунками и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, включающий 138 научных источника (13 - на русском языке и 125 - на иностранном языке).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование вошли лица, которые были обследованы и проходили лечение на базе профильных отделений Городской клинической больницы скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича, Краевой клинической больницы и амбулаторно-поликлинических учреждений г. Красноярска. Для анализа агрегационной активности тромбоцитов, чувствительности тромбоцитов к АСК были сформированы следующие группы: 1) 64 мужчины и 84 женщины с истинной полицитемией и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией V617F в гене JAK2 и в гене CALR, средний возраст $56,0 \pm 17,3$ года; 4) 64 добровольца обоего пола, не имеющих сердечно-сосудистых и миелопролиферативных заболеваний в анамнезе (34 мужчины и 34 женщины, средний возраст $26,9 \pm 11,5$ года), вошедшие в группу контроля.

Все пациенты с ХМО получали терапию АСК продолжительностью от трех месяцев до 10 лет.

Лицам, включенным в исследование, проводили анализ агрегационной активности тромбоцитов методом импеданса в цельной крови при индукции АДФ в конечной концентрации 5 мМ и арахидоновой кислотой в конечной концентрации 0,5 мМ, а также методом люминесценции с использованием в качестве индуктора коллагена в конечной концентрации 2 мг/мл на агрегометре CHRONOLOG 700.

Для определения минимальной, ингибирующей ЦОГ-1, концентрации АСК, оценка агрегации проводилась в пробах крови до и после предварительной 15 мин инкубации цельной крови с АСК в конечных концентрациях 0,03 мМ, 0,04 мМ, 0,07 мМ, 0,1 мМ.

Для определения чувствительности исследуемых лиц к АСК проводили предварительную инкубацию проб цельной крови с АСК в конечной концентрации 0,1 мМ и регистрировали параметры агрегации после добавления индуктора. За основу определения резистентности тромбоцитов к АСК в цельной крови был взят метод, защищенный патентом № 2379684 Иванов В.И., Дорофейков В.В. и др. Коэффициент ингибирования агрегации в процентах (КИА) рассчитывался по формуле:

$$\text{КИА} = \frac{A_n - A_k}{A_n} \times 100\%, \text{ где}$$

A_n и A_k - амплитуды агрегации до и после инкубирования с АСК соответственно.

Для определения влияния различных антикоагулянтов на агрегацию тромбоцитов и эффект АСК *in vitro* венозную кровь у 25 пациентов с ХМО отбирали параллельно в вакутейнеры с цитратом натрия 3,2% и гепарином (BD Vacutainer®), а у 21 пациента в вакутейнеры с цитратом натрия 3,2% и S-Monovette® с рекомбинантным гирудином (г-гирудин, Sarstedt AG & Co), 16 здоровых добровольцев составили группу контроля.

Для исследования биологической вариации использовалась цельная кровь, полученная от 23 здоровых доноров. Внутрииндивидуальная вариация вычислялась по результатам анализа агрегации в двух повторных измерениях пробы крови, полученной с интервалом 2 недели у каждого из здоровых добровольцев. Аналитическая вариация теста вычислялась по результатам анализа агрегации в 10 повторных измерениях пробы крови в течение трёх часов после взятия. Межиндивидуальная вариация вычислялась по результатам анализа агрегации у 68 здоровых добровольцев. Индекс индивидуальности рассчитывался по формуле: $(CV_a^2 + CV_i^2)^{1/2} / CV_g$, где CV_a – коэффициент аналитической вариации, CV_i – коэффициент внутрииндивидуальной вариации, CV_g – коэффициент межиндивидуальной

вариации. Критическая разница результатов (RCV) вычислялась по формуле: $2^{1/2} * 1,96 * (CV_a^2 + CV_I^2)^{1/2}$.

Анализ параметров гемограммы (количество лейкоцитов, тромбоцитов, эритроцитов, гематокрит и гемоглобин) проводили на анализаторе SYSMEX-XT 2000i (Япония) в соответствии с инструкцией производителя. Для анализа кровь набирали из локтевой вены в вакутейнер, содержащий ЭДТА. Анализ проводили в течение 4-5 часов после взятия крови.

Результаты обрабатывали с использованием программы Statistica 10.0. Значимость отличий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, описательная статистика представлена в виде значений медианы (Me) и верхнего и нижнего квартилей (C₂₅-C₇₅). Наличие корреляционной связи оценивали с применением ранговой корреляции Спирмена. Различия оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$. Значимость отличий относительных показателей оценивали с помощью критерия хи-квадрат (χ^2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор оптимальной концентраций АСК для анализа индивидуальной чувствительности

Для анализа влияния инкубации проб с АСК на величину и динамику изменения параметров агрегатограммы было сформировано 2 группы – 15 и 11 здоровых добровольцев, пробы цельной крови которых были исследованы при индукции арахидоновой кислотой и АДФ соответственно. Оценка агрегации проводилась в пробах до и после предварительной 15 мин инкубации цельной крови с АСК в концентрациях 0,03 мМ, 0,04 мМ, 0,07 мМ, 0,1 мМ.

В результате проведенных исследований выявлено, что характер кривых амплитуды, скорости и площади агрегации имеет тенденцию к монотонному уменьшению при увеличении концентрации АСК, если использовать в качестве индуктора арахидоновую кислоту. При АДФ-индуцированной агрегации вышеуказанные параметры снижались лишь у части обследованных и при этом чувствительность к ингибирующему эффекту АСК была менее выраженной по сравнению с индукцией арахидоновой кислотой. Таким образом, использование в качестве индуктора агрегации АДФ позволяет выявить выраженную гетерогенность чувствительности к ЦОГ-независимому действию АСК среди здоровых лиц по основным параметрам: величине амплитуды, скорости и площади агрегации. Активность ЦОГ-1 полностью ингибировалась концентрацией АСК 0,1 мМ (при индукции арахидоновой кислотой отсутствует агрегация при использовании концентрации 0,1 мМ у всех здоровых добровольцев), поэтому использование данной концентрации АСК позволяет оценить вклад ЦОГ-независимых механизмов в формирование чувствительности к АСК при индукции АДФ.

Метод импеданс-люминесцентной агрегометрии в определении чувствительности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте

Одной из важнейших проблем, возникающих при попытке каким-либо образом оценить степень ингибирования функции тромбоцитов после воздействия фармакологических агентов состоит в том, что ни один из существующих лабораторных тестов не включает в себя оценку всей многогранности функции тромбоцитов [Бугаенко В.В., 2009]. При этом *in vitro* диагностика эффективности АСК не оценивает механизмы снижения функции тромбоцитов, которые могут обуславливаться дефектами такого важного структурно-функционального компонента тромбоцитов как гранулы [Воробьев А.И., 1985]. Нарушенное функционирование этих специфических органелл тромбоцитов является патогенетической основой ряда заболеваний, при которых прием АСК противопоказан.

В предложенном способе исследования функциональной активности тромбоцитов у каждого пациента проводили в одной пробе - после предварительной инкубации крови с

АСК. Инкубацию проводят в течение 15 минут при температуре 37°C. При этом в опытную пробу цельной крови добавляли раствор АСК в конечной концентрации 0,1 мМ.

Обработку агрегатограмм производили по общепринятым характерным точкам кривых агрегации с определением максимальной амплитуды нарастания импеданса в омах к 5-й минуте от момента внесения в измерительную ячейку индуктора - коллагена и с определением интенсивности люминесценции при высвобождении АТФ из гранул тромбоцитов в нмолях. Выявление исходно низких показателей высвобождения гранул может свидетельствовать о патологии тромбоцитов и противопоказании к назначению АСК. Наряду с рутинными параметрами оценки агрегатограммы рассчитывался индекс резистентности (ИР). Данный параметр представляет собой сумму баллов, характеризующих степень чувствительности пациента в импедансном тесте и люминесцентном тесте по максимальным амплитудам агрегации и высвобождения гранул, и рассчитывается по формуле:

$$\text{ИР} = \text{Б}_н + \text{Б}_л, (1)$$

где $\text{Б}_н$ и $\text{Б}_л$ – степень чувствительности к АСК в баллах в импедансном и люминесцентном тесте соответственно. Этот параметр характеризует итоговую степень индивидуальной чувствительности к АСК, и включает в себя совокупную оценку ингибирующего действия АСК на процесс накопления АТФ, интенсивности высвобождения гранул, динамику мембранного потенциала тромбоцитов и агрегационно-адгезивную способность. ИР позволяет определить индивидуальную чувствительность пациента к АСК в абсолютных единицах шкалы, что может служить критерием для выявления лиц как с повышенной, так и с пониженной реакцией на препарат. Это позволит назначать терапию АСК, обоснованную своевременной предиктивной лабораторной оценкой и избежать нежелательных последствий неадекватного лечения. Степень резистентности определяют в соответствии с предложенной шкалой (таблица 1).

Таблица 1. Шкала для определения степени резистентности тромбоцитов к АСК

Значение амплитуды, Ом	балл	Значение интенсивности высвобождения гранул, нмоль	балл
≤ 6	0	$\leq 0,5$	0
7–9	1	0,5–1,0	1
10–12	2	1,0–1,5	2
> 12	3	$> 1,5$	3

В таблице представлены результаты обследования 24 клинически здоровых людей. По предлагаемому способу определяли величину ИР после приема АСК (тест *in vivo*), и после проведения теста инкубации с АСК (тест *in vitro*). В пробах 16 пациентов значение этого показателя было ниже 4. У семи человек по результатам тестирования ИР был равен или более 4 (таблица 2).

Поскольку у здоровых лиц, не принимавших АСК, значения ИР исходно без проведения инкубации с АСК были равны или более 4, то данный уровень значений ИР был принят как критерий резистентности. После того, как пациентами была принята разовая доза АСК в количестве 125 мг/сут, на следующий день вновь определяли показатели агрегации в пробе свежей крови без предварительных инкубаций. У шести пациентов, выявленных по результатам предварительного тестирования, с инкубацией *in vitro* ИР вновь был более 4, как и до приема препарата. Это подтверждает, что предлагаемое техническое решение позволяет выявлять пациентов с резистентностью к антиагрегантному действию АСК. Напротив, среди лиц, имеющих показатель ИР менее 4, разовый прием 125 мг АСК вызывал существенное ингибирование показателей агрегации, что свидетельствует об их чувствительности к данному препарату.

Таблица 2. Результаты исследования степени резистентности к АСК

№ п/п	В тесте IN VITRO					В тесте IN VIVO	Прогноз
	Амплитуда, Ом	Высвобождение гранул, нмоль	Б _и	Б _л	ИР	ИР	
1	2	0,3	0	0	0		чувствительный
2	4	0,66	0	1	1		чувствительный
3	4	0,64	0	1	1		чувствительный
4	5	0,71	0	1	1		чувствительный
5	5	0,75	0	1	1	2	чувствительный
6	6	0,82	0	1	1	1	чувствительный
7	6	0,92	0	1	1		чувствительный
8	7	0,34	1	0	1		чувствительный
9	8	0,85	1	1	2		чувствительный
10	9	0,69	1	1	2		чувствительный
11	6	1,08	0	2	2		чувствительный
12	10	0,92	1	1	2	1	чувствительный
13	10	0,75	1	1	2	1	чувствительный
14	9	1,3	1	2	3	2	чувствительный
15	7	1,35	1	2	3		чувствительный
16	6	1,7	0	3	3	1	чувствительный
17	16	0,58	3	1	4	6	резистентный
18	14	0,96	3	1	4	5	резистентный
19	15	1,35	3	2	5	6	резистентный
21	13	0,73	3	1	4	6	резистентный
22	16	2,24	3	3	6	6	резистентный
23	15	2,13	3	3	6	6	резистентный
24	17	2,31	3	3	6	6	резистентный

С помощью разработанного метода было обследовано 9 пациентов с ХМО, результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты исследования чувствительности тромбоцитов к АСК у пациентов с ХМО

№ п/п	Диагноз	В тесте IN VITRO					Прогноз
		Амплитуда, Ом	Высвобождение гранул, нмоль	Б _и	Б _л	ИР	
1	ИП	24	1,2	3	2	5	резистентный
2	ИП	12	0,57	3	1	4	резистентный
3	ИП	11	2,02	2	3	5	резистентный
4	ЭТ	16	0,64	3	1	4	резистентный
5	ПМФ	18	0,51	3	1	4	резистентный
6	ЭТ	8	0,15	1	0	1	чувствительный
7	ИП	13	0,24	3	0	3	чувствительный
8	ЭТ	11	0,72	2	1	3	чувствительный
9	ИП	11	0,43	2	0	2	чувствительный

У 5 (56%) пациентов была выявлена резистентность к действию АСК. Из них у двух пациентов с ЭТ и ПМФ наблюдались инсульт и инфаркт миокарда соответственно, а у пациента №3 с ИП наблюдался сосудистый тромбоз в возрасте 65 лет. У трех из пяти резистентных пациентов наблюдается артериальная гипертония. Таким образом, полученные результаты в группе пациентов с ХМО согласуются с клиническими характеристиками и комплексный импеданс-люминесцентный метод определения чувствительности тромбоцитов к АСК может быть использован в качестве дополнительного теста, определяющего прогноз эффективности терапии АСК.

Влияние выбора ингибитора свертывания крови на агрегацию тромбоцитов и эффект АСК *in vitro*

Оценка влияния отдельных антикоагулянтов на агрегацию показала, что на фоне и гепарина и гирудина наблюдается значительно более выраженный агрегационный ответ на АДФ по сравнению с пробами крови, взятыми в вакутейнеры с цитратом как у пациентов с ХМО, так и в группе добровольцев (таблица 4, 5). Это согласуется с результатами ряда исследований у пациентов с другими заболеваниями [Kaiser A.F., 2012; Wallén N.H., 1997]. Однако, ни один из использованных антикоагулянтов не оказывал существенного влияния на проявление эффекта АСК в сравниваемых группах.

Таблица 4. Агрегация тромбоцитов, исследованная методом импеданса в пробах цельной крови у обследованных пациентов и группы контроля при использовании цитрата натрия и гепарина

параметры	Контроль			ХМО с соматическими мутациями (JAK2, CALR)		
	цитрат	гепарин	Δ	цитрат	гепарин	Δ
До инкубации проб с АСК						
Амплитуда (Ом)	6,5 (4,0-10,0)	15,0 (10,5-16,5)	6,0 (4,5-9,5)	12,0 (3,5-15,0)	23,0 (17,0-30,0)*	12,5 (4,0-20,5)
Частота случаев дезагрегации (%)	0	0		4	0	
После инкубации проб с АСК						
Амплитуда (Ом)	6,0 (4,0-7,0)	14,5 (11,0-19,0)	11,0 (7,0-12,0)	3,0 (0,5-16,0)	24,0 (13,0-29,5)*	12,5 (10,0-22,5)
Частота случаев дезагрегации (%)	0	0		4	0	

Примечание: * отличия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

Вместе с тем, обращает на себя внимание тот факт, что добавление АСК к пробам с гепарином часто вызывает «парадоксальное» увеличение амплитуды агрегации по сравнению с действием АСК в образцах цитратной крови, что нашло отражение в средних значениях амплитуды агрегации на фоне АСК, представленных в таблице 4. Данный

феномен не был ранее описан в литературе, хотя существуют указания на то, что ингибиторы ЦОГ-1 не способны блокировать агрегацию в гепаринизированной крови [Wallén N.H., 1997].

Таблица 5. Агрегация тромбоцитов, исследованная методом импеданса в цельной крови у обследованных пациентов и группы контроля при использовании цитрата натрия и гирудина

антикоагулянт	Контроль			ХМО с соматическими мутациями (JAK2, CALR)		
	цитрат	гирудин	Δ	цитрат	гирудин	Δ
До инкубации проб с АСК						
Амплитуда (Ом)	6,5 (4,0-10,0)	12 (10,0-15,0)	6,0 (3,0-9,0)	7,0 (2,0-9,0)	23,0 (15,0-29,0)*	17,0 (8,0-20,0)*
Частота случаев дезагрегации (%)	0	0		0	28,6	
После инкубации проб с АСК						
Амплитуда (Ом)	6,0 (4,0-7,0)	9,0 (8,0-11,0)	4,0 (3,0-5,0)	8,0 (0-11,0)	24,0 (17,5-35,0)*	18,0 (11,0-22,0)*
Частота случаев дезагрегации (%)	0			9,5	23,8	

Примечание: * отличия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

Отдельный интерес представляет оценка феномена дезагрегационной составляющей при использовании АДФ в пробах крови обследованных пациентов. Было установлено, что при использовании в качестве антикоагулянта гирудина случаи дезагрегации выявляется в 3,5 раза чаще, чем при использовании цитрата (таблица 5). Механизмы дезагрегационного эффекта АДФ у пациентов с ХМО требуют дополнительного исследования. Мы предполагаем, что выраженность АДФ-дезагрегации при инкубации проб с АСК может являться не менее информативным показателем чувствительности к АСК, чем амплитуда максимальной агрегации.

Таким образом, использование гирудина в качестве антикоагулянта позволяет оценивать влияние АСК как на агрегационную, так и на дезагрегационную составляющие тромбоцитарных функций, что может быть рекомендовано с целью тестирования индивидуальной чувствительности к АСК.

Оценка биологической вариации импедансной агрегометрии тромбоцитов

Для оценки межиндивидуальной вариации (CV_G) параметров агрегометрии, а также для расчёта референсных интервалов в настоящее исследование включены данные обследования 89 клинически здоровых добровольцев (55 женщин и 34 мужчины в возрасте от 18 до 55 лет) (таблица 6).

Таблица 6. Характеристика обследованных групп, Ме (С₂₅-С₇₅)

Параметры	Группа для оценки межиндивидуальной вариации	Группа для оценки внутрииндивидуальной вариации
Мужчины / женщины, n	34 / 55	3 / 19
Возраст, лет	21 (20-31,5)	28 (23-37)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	218 (177-253)	199 (192-248)
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	4,7 (4,3-5,02)	4,3 (4,13-4,46)

При анализе параметров агрегатограммы выявлены статистически значимые различия между мужчинами и женщинами в исследуемой группе здоровых лиц (таблица 7). Показано, что у женщин достоверно увеличены амплитуда, скорость и площадь под кривой агрегации и укорочена лаг-фаза агрегации до и после инкубации пробы с АСК, в сравнении с аналогичными показателями у мужчин.

Таблица 7. Параметры агрегации и эффект АСК у мужчин и женщин

Параметр		Пол		p-уровень
		Мужчины	Женщины	
Возраст		19,5 (18,0-23,0)	21,5 (21,0-35,0)	0,7
Без АСК	Амплитуда, Ом	8,0 (6,0-10,0)	10,0 (9,0-12,0)	<0,001
	Скорость, Ом/мин	5,0 (4,0-7,0)	9,0 (7,0-10,0)	<0,001
	Лаг-фаза, сек	38,0 (32,0-52,0)	29,0 (22,0-33,0)	<0,001
	Площадь, Ом/мин ²	29,4 (21,0-40,5)	45,5 (36,7-50,4)	<0,001
На фоне АСК	Амплитуда, Ом	4,5 (1,0-8,0)	10,0 (7,0-12,0)	<0,001
	Скорость, Ом/мин	3,0 (2,0-5,0)	8,0 (5,0-10,0)	<0,001
	Лаг-фаза, сек	39,0 (27,0-77,0)	30,5 (24,0-36,0)	<0,001
	Площадь, Ом/мин ²	16,3 (4,8-34,6)	42,3 (29,5-51,1)	<0,001
Эффект АСК in vitro, %		33,3 (18,2-66,7)	16,7 (8,7-28,6)	<0,001

Одной из наиболее вероятных причин могло бы явиться влияние на интенсивность агрегации тромбоцитов со стороны повышенного количества эритроцитов и сниженного гематокрита ($p < 0,05$) у женщин. Вместе с тем, в целом по всей выборке, не обнаружено значимой корреляции между количеством эритроцитов, гематокритом и показателями агрегатограммы до или после инкубации с АСК. Эти данные позволяют предположить наличие независимого влияния гормонального фона на показатели импедансной агрегометрии и эффекта АСК in vitro.

Из результатов оценки внутрииндивидуальной вариации параметров агрегометрии, представленных на рисунке 1, следует, что амплитуда агрегации большинства здоровых лиц изменяется во времени, и лишь в 32% случаев результат полностью совпадал с предыдущим измерением.

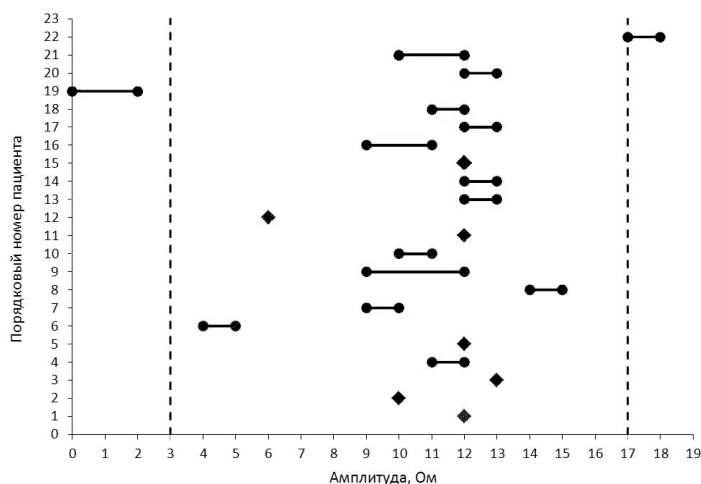


Рисунок 1 – Внутрииндивидуальная вариация амплитуды агрегации у 22 здоровых добровольцев. Ромбами отмечены совпадающие значения амплитуды, пунктиром обозначен референсный интервал.

Значение эффекта АСК, измеренного в тесте *in vitro* (рисунок 2), у 25% здоровых лиц не изменилось через 2 недели, однако у 15% обследованных отмечалась достаточно широкая внутрииндивидуальная вариация этого параметра (изменение превышало коэффициент аналитической вариации (CV_a)), что свидетельствует о наличии неучтенных факторов, влияющих на результат измерения чувствительности к АСК в данном тесте.

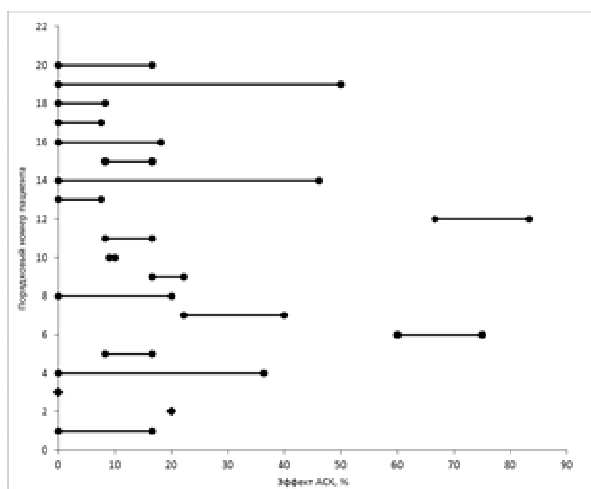


Рисунок 2 – Внутрииндивидуальная вариация эффекта АСК у 20 здоровых доноров. Ромбами отмечены совпадающие значения эффекта АСК.

В результате исследования аналитических характеристик теста импедансной агрегометрии были получены данные, представленные в таблице 8.

В среднем, внутрииндивидуальная вариация амплитуды агрегации составила 5,8%, а на фоне инкубации с АСК она увеличилась в 4 раза (таблица 8). В целом, коэффициент внутрииндивидуальной вариации для всех параметров после инкубации с АСК был выше, чем до инкубации, что может быть связано как с увеличением аналитической ошибки теста *in vitro*, так и с индивидуальными особенностями реакции тромбоцитов на АСК.

Индекс индивидуальности (ИИ) для всех параметров импедансной агрегометрии оказался ниже 0,6, что свидетельствует о высокой индивидуальной вариабельности показателей и ограничивает применение референсных интервалов [Fraser C.G., 2013 г.]. Таким образом, измерение агрегации в большей степени будет полезно для мониторинга состояния функциональной активности тромбоцитов в сравнении с данными предыдущих измерений. Тест импедансной агрегометрии является высокоиндивидуальным, поэтому

сравнение полученного результата агрегации пациента с предыдущим значением может заменить классический референсный интервал в случае, если планируется мониторинг за состоянием пациента при назначении антиагрегантной терапии.

Таблица 8. Аналитические характеристики теста импедансной агрегометрии в цельной крови

Параметр	Амплитуда, Ом		Скорость, Ом/мин		Лаг-фаза, сек		Площадь, Ом/мин ²		
	до АСК	после АСК	до АСК	после АСК	до АСК	после АСК	до АСК	после АСК	
коэффициент аналитической вариации (CV_a), %	8,1	13,9	6,5	17,4	5,4	13,9	7,0	13,2	
коэффициент межиндивидуальной вариации (CV_G), %	Ж	23,1	37,8	27,9	35,5	30,6	43,0	25,4	39,6
	М	37,0	78,5	38,0	60,1	36,2	60,9	39,8	83,8
коэффициент внутрииндивидуальной вариации (CV_I), %		5,8	11,2	15,3	20,7	11,9	24,3	9,1	16,1
индекс индивидуальности		0,3	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,4
RCV, %		26,9	48,2	44,9	73,0	35,3	75,6	30,8	56,2

Дисперсионный анализ показал, что пол оказывает статистически значимое влияние на межиндивидуальную дисперсию показателей агрегации как до инкубации с АСК ($F=19,4$, $p<0,001$), так и после ($F=28,0$, $p<0,001$); в группе мужчин показатель дисперсии был больше, чем в группе женщин.

Из таблицы 8 видно, что CV_I для всех показателей агрегометрии был значительно меньше, чем CV_G . Лабораторные тесты, для которых соблюдается данное условие, характеризуются понятием «высокоиндивидуальные», которое можно оценить количественно с помощью «индекса индивидуальности» (ИИ). В соответствии с данными таблицы 8, ИИ для всех параметров импедансной агрегометрии оказался ниже 0,6, что свидетельствует о высокой индивидуальной вариабельности показателей и теоретически ограничивает применение референсных интервалов в импедансной агрегометрии. Следует отметить, что в доступных базах данных отсутствует универсальные пределы значения CV_I для агрегометрии, а необходимость вычисления этого критерия в каждой лаборатории влечет за собой неточности, связанные с разным уровнем контроля за референсными индивидуумами (контроль за питанием, физической нагрузкой, приемом лекарств и т.д.), что может оказывать значительное влияние на величину CV_I и, вследствие этого, могут возникать различия в других расчетных критериях.

Особенности влияния АСК на функциональную активность тромбоцитов у больных ХМО

Характеристика обследованных пациентов представлена в таблице 9. Для пациентов с ЭТ наблюдалось увеличение количества тромбоцитов по сравнению с другими группами, а у пациентов с ИП был значительно увеличен уровень гематокрита и эритроцитов, что является характерной патогенетической особенностью данного заболевания.

Таблица 9. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Параметры	ИП	ЭТ
Число больных	52	51
Мужчины, %	46	31
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	6,8 (5,4-7,7)	4,98 (4,71-5,35)**
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	509 (348-795)*	775 (598-1128)
Гематокрит, %	54,4 (47,0-58,4)	42,2 (39,1-44,3)**

Примечание: * - достоверность отличия показателей по сравнению с группой пациентов с ЭТ ($p < 0,05$), ** - достоверность отличия показателей по сравнению с группой пациентов с ИП ($p < 0,05$)

Таблица 10. Показатели АДФ-индуцированной импедансной агрегометрии у пациентов с ХМО (Me ($C_{25}-C_{75}$))

№	Группа	Амплитуда, Ом	Скорость, Ом/мин	Лаг-фаза, сек	Площадь, Ом ² /мин
1	Контроль	9,5 (7,0-11,3)	7 (5,0-9,0)	32,0 (26,0-42,0)	39,2 (29,8-48,6)
2	Эссенциальная тромбоцитемия	16,0 (12,0-21,0)	18,0 (12,0-24,0)	10,0 (6,0-14,0)	75,8 (52,6-104,2)
3	Истинная полицитемия	9,0 (4,0-14,0)	9,5 (4,0-14,0)	21,0 (14,0-39,0)	41,0 (14,3-67,0)
	p 2-3	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	p 1-2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	p 1-3	0,6	0,3	<0,02	0,9

Амплитуда агрегации у пациентов с ЭТ была почти в 2 раза выше, чем у пациентов других групп (таблица 10). Увеличенные показатели агрегации могут также обуславливаться повышенным количеством циркулирующих тромбоцитов и их более интенсивной продукцией. Среди здоровых лиц зависимости числа тромбоцитов и амплитуды их агрегационной кривой не было обнаружено ($r_s=0,08-0,16$), однако у пациентов с ХМО корреляционная связь этих параметров была хоть и не высокой, но статистически значимой. При этом коэффициент корреляции был существенно меньше у мужчин ($r_s=0,38 \pm 0,13$; $p < 0,05$), чем у женщин ($r_s=0,59 \pm 0,10$; $p < 0,05$) с мутацией JAK2. Очевидно, только фактом наличия тромбоцитоза нельзя объяснить наблюдаемые гиперагрегационные сдвиги, поскольку влияние мутации на агрегационные параметры во многом связано с качественными изменениями тромбоцитов, а параметр абсолютного уровня тромбоцитов не является строгим показателем к назначению антиагрегантов данной категории больных [Michelson A.D., 2013].

Результаты определения степени чувствительности тромбоцитов к действию АСК *in vitro* представлены в таблице 11. При проведении теста предварительной инкубации проб крови с АСК *in vitro* нивелируется влияние возможных индивидуальных фармакокинетических особенностей: всасывания, распределения и метаболизма препарата, и мы можем сделать заключение о наличии аспиринорезистентности, обусловленной непосредственно тромбоцитарными функциями в условиях интактного клеточного окружения цельной крови. Видно, что в ответ на добавление к пробам крови АСК здоровых

лиц наблюдается выраженное снижение показателей амплитуды, скорости и площади агрегатограммы ($p < 0,001$) на 30, 28 и 31 % соответственно, что соответствует типичной АСК-обусловленной гипоагрегации.

Эффект АСК *in vitro* был более выражен у пациентов с ИП, чем у пациентов с ЭТ и у лиц контрольной группы (таблица 11).

Таблица 11. Показатели АДФ-индуцированной импедансной агрегометрии у больных с ХМО после предварительной инкубации проб с АСК (Ме (С₂₅-С₇₅))

№	Группа	Амплитуда, Ом	Скорость, Ом/мин	Лаг-фаза, сек	Площадь, Ом ² /мин	Эффект АСК, %
1	Контроль (n=88)	9,0 (5,0-11,0)	6,0 (4,0-9,0)	34,0 (25,0-42,0)	34,6 (19,7-47,4)	20,0 (10,0-43,0)
4	Эссенциальная тромбоцитемия	14,0 (10,0-18,0)	16,0 (12,5-24,0)	11,0 (8,0-14,5)	61,7 (37,7-85,1)	16,6 (8,3-27,3)
5	Истинная полицитемия	6,5 (2,0-11,0)	5,0 (2,0-11,0)	23,0 (18,0-38,0)	25,8 (4,1-50,5)	36,9 (23,1-62,5)
	p 2-3	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05
	p 1-2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,3
	p 1-3	0,6	0,3	<0,02	0,9	0,07
	p 1-3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5

Пациенты с ЭТ имели повышенный ЦОГ-независимый агрегационный ответ по сравнению с другими группами, что говорит об увеличенной активности их тромбоцитов и неспособности АСК её подавлять. Кроме того, и среди здоровых, и среди пациентов с ХМО были случаи, когда полностью отсутствовал эффект АСК *in vitro*, что свидетельствует об аспиринорезистентности, по всей видимости, обусловленной ЦОГ-1-независимым механизмом агрегации тромбоцитов. Можно полагать, что АСК практически всегда ингибирует активность ЦОГ тромбоцитов, но АДФ может индуцировать агрегацию и независимым от ЦОГ-1 путем. Вероятно, у данных лиц ЦОГ-независимые механизмы отличаются высокой активностью и компенсируют ингибирование ЦОГ-1 АСК. В этом случае очевидно, эффективным будет, наряду с АСК, назначение блокаторов АДФ-рецепторов. В то же время, выявлены пациенты с относительно высоким эффектом АСК, что является серьёзным основанием ограничить дозу АСК или заменить его другим дезагрегантом в связи с вероятностью развития геморрагических осложнений.

В литературе имеются несколько противоречивые данные относительно показателей агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с ХМО. В исследовании М. Panova-Noeva с соавт. с использованием импедансного агрегометра Multiplate показано, что агрегация у пациентов с JAK2+, но не с JAK2- ХМО была выше, чем в контрольной группе [Panova-Noeva M., Marchetti M., Russo L. et al., 2013]. В то же время в исследовании с использованием PFA-100 не обнаружено различий по величине агрегации между пациентами с мутацией JAK2 и без мутации [Tsantes A.E., Dimoula A., Vonovas S. et al., 2010]. Подобные противоречия, очевидно, связаны с использованием разных методов определения агрегации и могут быть решены принятием стандартизации и единого(-х) метода(-ов) для анализа функций тромбоцитов при ХМО.

Влияние ингибитора JAK на агрегацию тромбоцитов

Для исследования влияния ингибитора JAK на агрегацию тромбоцитов было сформировано две группы: группа контроля, состоящая из 12 человек и группа пациентов с подозрением на ХМО, состоящая из 41 человека (таблица 12). Из пациентов с подозрением

на ХМО 30 пациентов имели соматические мутации, из них 5 человек имели мутацию в гене CALR, у 1 пациента была выявлена мутация в гене MPL, остальные были с мутацией JAK2V617F.

Таблица 12. Характеристика обследованных групп, Ме (C₂₅-C₇₅)

	Контроль	Пациенты с подозрением на наличие ХМО
Кол-во, n	12	41
Возраст, лет	21 (22-21)	57 (46-68)
Пол мужчины/женщины, n	6/6	14/27
Пациенты с соматическими мутациями, n	0	30
% проб, в которых наблюдался эффект ингибитора JAK	42%	27%

При сравнении показателей агрегации в исследуемых группах, было обнаружено, что ни у одного из пациентов с мутацией в гене CALR не было значительного снижения агрегации ингибитором JAK, в то время как в остальных исследуемых группах наблюдались пробы, агрегация в которых снижалась при добавлении ингибитора более чем на 45% от исходного уровня. Почти у всех шести пациентов с аллельной нагрузкой JAK2 V617F более 50% наблюдается значительное (более 45% от начального уровня) снижение амплитуды агрегации после добавления ингибитора JAK (рисунок 3). Среди пациентов с аллельной нагрузкой менее 50% такой эффект наблюдался только в 27% проб, что более чем в три раза меньше, чем при аллельной нагрузке менее 50% ($\chi^2=3,9$; $p=0,04$).

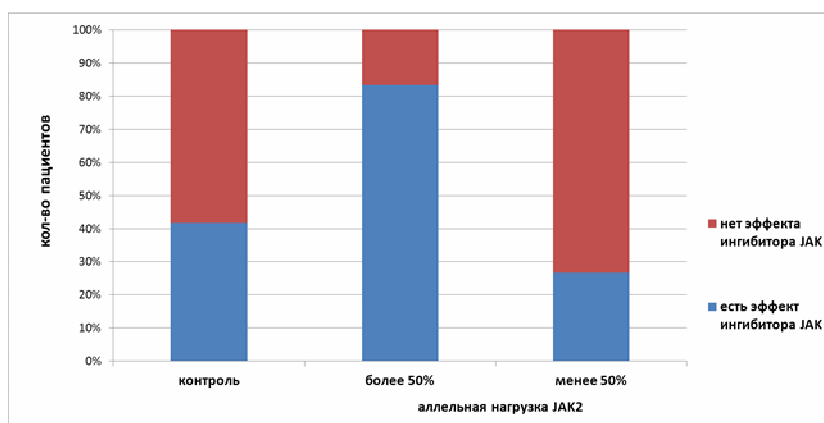


Рисунок 3 – Влияние ингибитора JAK на агрегацию тромбоцитов в исследуемых группах у пациентов с разными уровнями аллельной нагрузки JAK2 V617F

Ингибирование агрегации тромбоцитов после добавления ингибитора JAK свидетельствует об участии сигнального пути JAK в АДФ-индуцированной активации тромбоцитов. Доля этого участия повышается с увеличением количества клональных клеток, несущих соматическую мутацию в гене JAK2, очевидно, вследствие нарушения фосфорилирования и передачи сигнала мутантной формой тирозинкиназы JAK2. Разная степень ингибирования агрегации у пациентов свидетельствует о различии вклада сигнального пути JAK-STAT в активацию тромбоцитов.

Известно, что тромбопоэтин стимулирует мегакариопоэз путем связывания с рецептором MPL на мегакариocyтах, который активирует сигнальный путь JAK-STAT [Kaushansky K., 1995]. Тромбопоэтин также индуцирует фосфорилирование JAK и STAT и

активацию тромбоцитов. Было показано, что тромбин стимулирует фосфорилирование тирозина в JAK2, что доказывает существование сигнального механизма фосфорилирования JAK-STAT в тромбоцитах и играет регуляторную роль в их функции [Drachman J.G., Sabath D.F., Fox N.E. et al., 1997]. Таким образом, участие JAK2 тромбоцитов в регуляции как коллаген- так и в АДФ-индуцированной активации тромбоцитов не вызывает сомнения, что в будущем может служить новой мишенью для дезагрегантных препаратов. На сегодняшний день механизмы, лежащие в основе сигнального пути JAK2-STAT3 в тромбоцитах, остаются неизвестными.

ВЫВОДЫ

1. Концентрация АСК, которая полностью ингибировала агрегацию тромбоцитов *in vitro* составила 0,1 мМ.
2. Выявленная широкая межиндивидуальная вариация параметров агрегации тромбоцитов свидетельствует о несостоятельности подхода к интерпретации количественных параметров агрегации, основанных на учете популяционных референсных интервалов, а выявленные гендерные различия свидетельствует о необходимости стратификации популяционных норм по данному признаку;
3. Использование систем взятия крови с гирудином позволяет оценивать как агрегационную, так и дезагрегационную фазы агрегатометрии на фоне АСК;
4. У больных эссенциальной тромбоцитемией, независимо от количества тромбоцитов и ингибирования ЦОГ-1, в два раза усилена агрегация тромбоцитов по сравнению с больными истинной полицитемией, группой контроля и больных с инсультами;
5. У пациентов с хроническими миелопролиферативными опухолями активность янускиназы может быть вовлечена в реализацию оперативных механизмов регуляции агрегации тромбоцитов;
6. Предложенный способ диагностики аспиринорезистентности позволяет комплексно оценить индивидуальную чувствительность к АСК, выявляя случаи повышенной реакции на препарат.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики.

1. При использовании метода АДФ-индуцированной импедансной агрегатометрии следует определять референсные интервалы отдельно для мужчин и женщин, а при повторном тестировании функции тромбоцитов более предпочтительным является оценка различий с результатом предыдущего измерения, а не с референсным интервалом;
2. Вследствие различных путей развития аспиринорезистентности – ЦОГ-зависимого и ЦОГ-независимого, чувствительность тромбоцитов пациента к назначаемому АСК необходимо определять при индукции не только с арахидоновой кислотой, но и с АДФ.
3. Для пациентов с эссенциальной тромбоцитемией, вследствие широкой распространенности повышенного ЦОГ-независимого агрегационного ответа тромбоцитов, рекомендуется проведение исследования агрегации тромбоцитов до и в процессе терапии препаратом АСК для выявления индивидуальной чувствительности к АСК.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В качестве перспектив разработки темы можно рассматривать определение пороговой величины агрегации, значения выше и ниже которой будут определяться как наличие резистентности и чувствительности к АСК соответственно. Для понимания патофизиологических механизмов развития гиперагрегации и резистентности к АСК у пациентов с ХМО ключевым является исследование механизмов участия янускиназы-2 в регуляции функции тромбоцитов, что в будущем может стать основой для разработки нового класса дезагрегантов. Кроме того, немаловажная задача - оптимизация технологии оценки

повышенной чувствительности к АСК, которая может вести к серьёзным осложнениям в виде геморрагических проявлений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертационных работ

1. Столяр, М.А. Определение аспиринорезистентности тромбоцитов *in vitro* по данным оптического и импедансометрического методов / М.А. Столяр, И.А. Ольховский // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. - 2012 - Т. 10. - № 5. – С.36-42.
2. Грицан, Г.В. Аспиринорезистентность у больных с острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу / Г.В. Грицан, И.А. Ольховский, М.А. Столяр, Ю.В. Косницкая // Сибирское медицинское обозрение. – 2013. - №4.- С.19-23.
3. Ольховский, И.А. методе определения чувствительности к ацетилсалициловой кислоте в импедансном тесте агрегации тромбоцитов / И.А. Ольховский, М.А. Столяр // Тромбоз, гемостаз и реология – 2013. - №4.- С.51-58.
4. Ольховский, И.А. Особенности агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с мутацией в гене JAK2: гендерные отличия и эффект ацетилсалициловой кислоты / И.А. Ольховский, М.А. Столяр // Гематология и трансфузиология – 2014. - №1 - С. 11-14.
5. Грицан, Г.В. Чувствительность к ацетилсалициловой кислоте в тесте импедансометрической агрегометрии у пациентов при геморрагическом инсульте / Г.В. Грицан, И.А. Ольховский, М.А. Столяр, Ю.В. Косницкая // Сибирское медицинское обозрение – 2013. - №6. – С. 17-21.
6. Столяр, М.А. К вопросу определения границ нормальной реакции тромбоцитов в тесте импедансной агрегометрии / М.А. Столяр, И.А. Ольховский // Клиническая лабораторная диагностика. - 2016. - Т. 61. - № 6. - С. 359-363.
7. Столяр, М.А. К вопросу выбора антикоагулянтов в АДФ-индуцированном импедансном тесте агрегации тромбоцитов у пациентов с хроническими миелопролиферативными опухолями / М.А. Столяр, Д.С. Ивашин, И.А. Ольховский // Клиническая лабораторная диагностика - 2017. - № 3. - С. 156-160.
8. Столяр, М.А. Исследование роли янускиназы-2 (JAK2) в развитии феномена ЦОГ-независимой аспиринорезистентности у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями / М.А. Столяр, И.А. Ольховский, А.С. Горбенко, М.А. Михалёв, Е.В. Васильев // Лабораторная служба. – 2018. – Т.7. - №2. – С. 40-43.

Патент

9. Патент 2538219 Российская Федерация, МПК G01N33/48. Способ определения резистентности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте / Ольховский И.А., Столяр М.А. (РФ); заявители ФГБУ "Гематологический научный центр" МЗ РФ, ФГБУН "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук", ФГБУН "Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения Российской академии наук"; №2013116658/15; заявл. 11.04.2013; опубл. 10.11.2014, Бюл. № 31.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов

10. Столяр, М.А. О критериях аспиринорезистентности в импедансном тесте агрегации тромбоцитов / М.А. Столяр, И.А. Ольховский // Кардиология и ревматология. - 2013. - №1.- С. 8-13.
11. Столяр, М.А. Диагностическое значение определения агрегационной активности тромбоцитов методом импедансометрии / М.А. Столяр, И.А. Ольховский //

«Бюллетень лабораторной службы» Сборник публикаций, издаваемый Красноярской Краевой Ассоциацией МЛД. - 2012.- №15. - С.27-42.

12. Ольховский, И.А. Возможности импедансной агрегометрии в контроле эффективности и безопасности аспиринопрофилактики сосудистых тромбозов / М.А. Столяр, И.А. Ольховский // Справочник заведующего КДЛ - 2014.-№ 4. - С.29-39.

13. Столяр, М.А. Распространенность мутации V617F JAK2 среди пациентов с острыми нарушениями мозгового кровообращения / М.А. Столяр, Г.В. Грицан, А.С. Горбенко, И.А. Ольховский // Журнал БСМП. – 2016. - №6. - С. 33-35.

14. Столяр, М.А. Исследование влияния ацетилсалициловой кислоты на функциональную активность и секрецию гранул тромбоцитов / М.А. Столяр // М75 Молодёжь и наука: сборник материалов VIII Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 155-летию со дня рождения К.Э. Циолковского. [Электронный ресурс] № заказа 7880/отв. ред. О.А. Краев - Красноярск: Сиб.- Красноярск, Сибирский федеральный университет. – 2012.

15. Столяр, М.А. Влияние ацетилсалициловой кислоты на реакцию высвобождения АТФ при индуцированной активации тромбоцитов / М.А. Столяр // Материалы 50-й Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Медицина / Новосибир. гос. ун-т. Новосибирск. - 2012. – С.42-43.

16. Столяр, М.А. Особенности действия ацетилсалициловой кислоты на тромбоциты при инсультах и хронических миелопролиферативных заболеваниях / М.А. Столяр // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2013» / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, К.К. Андреев, М.В. Чистякова. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2013.

17. Столяр, М.А. О значении определения чувствительности к ацетилсалициловой кислоте при ишемических нарушениях мозгового кровообращения на госпитальном этапе / М.А. Столяр // Материалы XVI международной школы-конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий», г. Абакан. – 2012. – С.131-132.

18. Столяр, М.А. Исследование механизмов действия аспирина на тромбоциты в норме и при патологии / М.А. Столяр // Сборник материалов 77-й итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 90-летию со дня рождения профессора П. Г. Макарова и 90-летию со дня рождения доцента Б. М. Зельмановича. – 2013. - С.895-898.

19. Столяр, М.А. Исследование механизмов антитромботического действия аспирина в норме и при патологии / М.А. Столяр // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2013. – Вып. XXX, № 1 - С.158-159.

20. Столяр, М.А. Половой детерминизм, ЦОГ-независимые механизмы и гиперкоагуляционный эффект аспирина / М.А. Столяр // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник тезисов научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 85-летию профессора Е.Н. Дормидонтова. Ярославль: ООО «Индиго», 2013. 321 с.

21. Грицан, Г.В. Особенности тромбоцитарного гемостаза у больных с острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу / Г.В. Грицан, М.А. Столяр, И.А. Ольховский, Ю.В. Косницкая // Сборник научных трудов краевой научно-практической конференции, посвященной юбилею ГКБСМП им. Н.С. Карповича.- Красноярск, ООО Новые компьютерные технологии.- 2013.- С.95-101.

22. Столяр, М.А. Особенности импедансометрии агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с мутацией в гене JAK-2 / М.А. Столяр, И.А. Ольховский, Е.Е. Ануфриева, Т.Н. Субботина // Клиническая лабораторная диагностика - 2013. - № 9 - С.81.

23. Столяр, М.А. Влияние фактора Виллебранда на антитромбоцитарное действие ацетилсалициловой кислоты / М.А. Столяр, И.А. Ольховский, С.М. Лобанова, В.В. Потылицина // Клиническая лабораторная диагностика - 2013. - № 9 - С.84-85.

24. Шайхутдинова, Р.В. Исследование влияния генетических полиморфизмов тромбоцитарных рецепторов ITGA2 и P2Y12 на показатели оптической и импедансометрической агрегатограммы / Р.В. Шайхутдинова, М.А. Столяр М.А., Т.Н. Субботина, И.А. Ольховский // Клиническая лабораторная диагностика - 2013. - № 9 - С. 85.
25. Столяр, М.А. Гендерные особенности влияния полиморфизмов гена метилентетрагидрофолатредуктазы на результаты импедансометрической оценки агрегации тромбоцитов при аспириновой пробе / М.А. Столяр, Т.Н. Субботина, М.А. Суховольская, Р.В. Шайхутдинова, И.А. Ольховский // Вестник гематологии – 2013. – Том 9, №4 - С. 62-63.
26. Gorbenko, A. Whole blood platelet aggregation in patients with V617F JAK2 and CALR mutations / A. Gorbenko, M. Stolyar, T. Subbotina, I. Olkhovskiy // 19th Congress of the European Hematology Association. – 2014. - Abs. PB1721.
27. Столяр, М.А. Исследование влияния аспирина на агрегацию тромбоцитов при хронических миелопролиферативных заболеваниях / М.А. Столяр, Е.В. Васильев, В.И. Москов, Е.Ю. Виноградова, В.И. Бахтина, Т.Н. Субботина, И.А. Ольховский // Гематология и трансфузиология (Приложения) – 2014. – Т.59. - №1. – С.122.
28. Столяр, М.А. Исследование влияния аспирина на параметры роста фибринового сгустка в тесте Тромбодинамики / М.А. Столяр, И.А. Ольховский // Гематология и трансфузиология (Приложения) – 2014. - Т.59. - №1. – С.122.
29. Ивашин, Д.С. Метод автоматизированной оценки дезагрегационной фазы при анализе кривой агрегатограммы тромбоцитов / Д.С. Ивашин, М.А. Столяр // Клиническая лабораторная диагностика - 2014. - Т.59. - №9. - С. 65-66.
30. Столяр, М.А. Генетические полиморфизмы рецептора P2RY12 не влияют на результаты импедансометрической АДФ-агрегометрии у пациентов с V617F JAK-2-позитивными хроническими миелопролиферативными неоплазмами / М.А. Столяр, Т.Н. Субботина, Р.В. Шайхутдинова, И.А. Ольховский // Клиническая лабораторная диагностика - 2014. - Т.59 - №9. - С. 58.
31. Stolyar, M.A. Sensitivity to acetylsalicylic acid in impedance aggregometry in patients with ischemic and haemorrhagic stroke / M.A. Stolyar, G.V. Gritsan, I.A. Olkhovskiy, J.V. Kosnickaya // ABSTRACT BOOK INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROSCIENCE - Krasnoyarsk State Medical University- 2014.- P.97.
32. Горбенко, А.С. Соматическая мутация в гене янускиназы JAK2 в этиологии церебральных тромбозов / А.С. Горбенко, М.А. Столяр, Т.Н. Субботина, Г.В. Грицан, И.А. Ольховский // Материалы VII Всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии в сердечно-сосудистой хирургии - 2015. - С. 139-140.
33. Ивашин, Д.С. Количественная оценка величины АДФ-деагрегации тромбоцитов в импедансометрическом аспириновом тесте у пациентов с миелопролиферативными заболеваниями / Д.С. Ивашин, М.А. Столяр, И.А. Ольховский // Материалы VII Всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии в сердечно-сосудистой хирургии. - 2015. - С. 175-176.
34. Столяр, М.А. Люминесцентный способ определения чувствительности тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте в цельной крови / М.А. Столяр // Лаборатория - 2015 - №2 - С. 60.
35. Потылицина, В.В. Гирудин - антикоагулянт выбора при взятии крови для импедансометрического теста агрегации тромбоцитов / В.В. Потылицина, С.М. Лобанова, М.А. Столяр, И.А. Ольховский, К.Л. Коткин // Справочник заведующего КДЛ - 2015. - №12. – С. 25-30.
36. Ивашин, Д.С. Количественная оценка АДФ-индуцированной дезагрегации у пациентов с миелопролиферативными опухолями / Д.С. Ивашин, М.А. Столяр // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. - Т.60. - №9. – С. 41.
37. Потылицина, В.В. К вопросу выбора антикоагулянта при исследовании агрегационной активности тромбоцитов / В.В. Потылицина, С.М. Лобанова, К.Л. Коткин, М.А. Столяр // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. - Т.60, №9. – С. 43.

38. Столяр, М.А. Феномен гепарин-индуцированного гиперагрегационного эффекта ацетилсалициловой кислоты / М.А. Столяр, И.А. Ольховский // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. - Т.60. - №9. – С. 43-44.

39. Горбенко, А.С. Сравнительные гематологические показатели и агрегация тромбоцитов у пациентов с мутациями в генах CALR и JAK2 при эссенциальной тромбоцитемии и миелофиброзе / А.С. Горбенко, М.А. Столяр, П.А. Николаева, И.А. Ольховский // Гематология и трансфузиология, 2016. - Т. 61, № S1(1). - С. 41.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат;
АСК – ацетилсалициловая кислота;
АТФ – аденозинтрифосфат;
ИП – истинная полицитемия;
ПМФ – первичный миелофиброз;
ЦОГ-1 – циклооксигеназа 1;
ХМО – хроническая миелопролиферативная опухоль;
ЭТ – эссенциальная тромбоцитемия;
CALR – кальретикулин;
JAK2 – янускиназа-2.