

# ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С СЕРДЕЧНО- СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Сироткина О.В.<sup>1,2</sup>, Боганькова Н.А.<sup>1</sup>, Ласковец А.Б.<sup>1</sup>,  
Кухарчик Г.А.<sup>1</sup>, Гайковая Л.Б.<sup>1</sup>, Вавилова Т.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития РФ

<sup>2</sup> Учреждение Российской академии наук Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН

**Резюме.** В работе представлено одновременное исследование функциональной активности тромбоцитов методами стандартной оптической агрегатометрии и проточной цитометрии с оценкой изменения содержания Р-селектина и гликопротеинового рецептора GP IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов при индукции АДФ. Количество рецептора GP IIb-IIIa и экспрессия Р-селектина на поверхности тромбоцитов достоверно увеличиваются при активации 10 мкМ АДФ как в контрольной группе доноров, так и у больных, принимающих только аспирин. У пациентов на фоне клопидогрела при индукции не происходило значимого изменения количества GP IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов, а также не увеличивалось число клеток, экспрессирующих на своей поверхности Р-селектин, то есть не наблюдалась активация тромбоцитов в ответ на АДФ. При анализе параметров, измеренных методом проточной цитометрии, была выявлена их корреляция между собой и с показателями стандартной агрегатометрии. Соединение принципа активации с АДФ, который заложен в стандартной индуцированной агрегации, и проточную цитофлуориметрию с использованием FITC- и PE-меченных антител к рецептору GP IIb-IIIa и Р-селектину позволило нам применить иммунологические методы для анализа тромбоцитарного гемостаза и выявить новые лабораторные критерии для оценки гиперагрегации тромбоцитов и эффективности действия клопидогрела и аспирина.

**Ключевые слова:** экспрессия Р-селектина, GP IIb-IIIa, АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов, проточная цитометрия.

*Sirotkina O.V., Bogan'kova N.A., Laskovets A.B., Kuharchik G.A., Gaykovaya L.B., Vavilova T.V.*

## IMMUNOLOGICAL METHODS FOR EVALUATION OF PLATELET FUNCTIONS IN THE PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES

**Abstract.** The aim of this work was a simultaneous analysis of functional platelet activity using both standard optical aggregometry and flow cytometry, by means of measuring P-selectin and GP IIb-IIIa glycoprotein receptor contents on the surface of ADP-induced platelets. GP IIb-IIIa amounts and P-selectin expression on cell surface are significantly increased on platelets after activation with 10 mcM ADP, both in normal donors and in aspirin-treated patients. In clopidogrel-treated patients, the amounts of expressed P-selectin and GP IIb-IIIa did not change after ADP induction, thus suggesting absence of detectable ADP-induced platelet activation in this group. By means of Spearman criterion, a distinct correlation was found between the P-selectin expression, GP IIb-IIIa contents, and rates of standard ADP-induced aggregation. A combination of standard ADP-induced aggregation/activation of platelets with flow cytometry using FITC or PE-labeled antibodies to P-selectin and GP IIb-IIIa, allowed us to apply immunological approaches to analysis of platelet hemostasis, to propose novel laboratory criteria for evaluation of platelet hyperaggregation, and to detect differential effects of clopidogrel and aspirin. (*Med. Immunol., Vol. 12, N 3, pp 213-218*)

### Адрес для переписки:

Сироткина Ольга Васильевна  
195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47.  
Тел.: (812) 544-34-60.  
Факс: (812) 545-06-32.  
E-mail: olgasirotkina@list.ru

**Keywords:** P-selectin expression, GP IIb-IIIa, ADP-induced platelet aggregation, flow cytometry.

## Введение

Одним из современных иммунологических методов анализа структурных компонентов клеток является проточная цитометрия с использованием антител, меченных различными флуоресцентными красителями. В настоящее время все больше и больше клинико-диагностических лабораторий используют метод проточной цитометрии для определения иммунного статуса пациентов, иммунофенотипирования при онкогематологических заболеваниях и других параметров иммунной системы [1]. Тромбоциты, один из основных компонентов системы гемостаза, одновременно играют важную роль в процессах ангиогенеза и реализации иммунологических реакций. Однако адекватный контроль функциональной активности тромбоцитов является в настоящее время нерешенной проблемой клинической лабораторной диагностики [12].

Предложенный Борном в 60-х годах прошлого века оптический метод оценки индуцированной агрегации тромбоцитов по степени светопропускания остается до настоящего времени основным инструментом, который позволяет оценить активность тромбоцитов *in vitro*. Преимуществами этого метода является его доступность и «гибкость» исполнения. Но существуют недостатки, которые заставляют искать новые подходы: отсутствие стандартизации условий пробоподготовки, четких критериев по концентрации индукторов, контрольного материала, сложности интерпретации конечного результата, низкая чувствительность и воспроизводимость. Режим пробоподготовки существенно влияет на результаты анализа (условия забора крови и центрифугирование образцов активируют тромбоциты и искажают результат). Особенно следует отметить, что стандартная агрегатометрия подходит для выявления недостаточности функциональной активности тромбоцитов, но не может в полной мере отразить степень их гиперактивности. Все модификации метода, а именно импедансная агрегатометрия, лазерное светорассеяние, также имеют свои отрицательные характеристики. В связи с этим надежды многих исследователей связаны с применением проточной цитометрии для характеристики тромбоцитов как клеточных структур. Цитометрический анализ с использованием различных флуоресцентных красителей и специфичных антител позволит оценить образование микровезикул, тромбоцитарных и тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов, экспрессирование рецепторов на поверхности тромбоцитов и их активацию, то есть те показатели, которые напрямую связаны с гиперагрегацией тромбоцитов [7, 16]. Актуальным остается поиск лабораторных критериев оценки эффективности

действия антиагрегантных препаратов, в том числе аспирина и клопидогрела [14].

Таким образом, анализ современного состояния исследований в данной области показывает необходимость проведения комплексного анализа функционального состояния тромбоцитов с использованием современных молекулярных технологий, что и было предпринято в данной работе.

Целью данного исследования является формирование новых лабораторных подходов к оценке функциональной активности тромбоцитов и эффективности антиагрегантной терапии.

Соответственно, нами были поставлены следующие задачи: одновременное исследование функциональной активности тромбоцитов методами стандартной оптической агрегатометрии и проточной цитометрии с оценкой изменения содержания Р-селектина и гликопротеинового рецептора GP IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов при индукции АДФ.

## Материалы и методы

В исследование были включены 33 добровольца, подписавшие информированное согласие. Из них были сформированы 3 исследуемые группы. В группу А вошли 7 пациентов (средний возраст  $64 \pm 3$  года), перенесших инфаркт миокарда не менее 6 месяцев назад, находившихся на стабильной антиагрегантной терапии клопидогрелом (75 мг/день) и аспирином (100 мг/день) не менее 14 дней в стационаре на момент включения в исследование принимающих аспирин (100 мг/день). Вторую группу К+А составили 9 больных с диагнозом острый инфаркт миокарда (средний возраст  $48,5 \pm 3$  года), находившихся в момент исследования в стационаре на стабильной антиагрегантной терапии клопидогрелом (75 мг/день) и аспирином (100 мг/день) не менее 7 дней. В контрольную группу Д вошли 17 доноров (средний возраст  $34 \pm 2$  года) без сердечно-сосудистых или тромбоэмболических эпизодов в анамнезе, не применяющих каких-либо антиагрегантных препаратов.

Для исследования тромбоцитарной агрегации, определения количества GP IIb-IIIa и экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов венозную кровь собирали в вакуумные пробирки, содержащие 3,8% цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Богатая тромбоцитами плазма (БТП) получалась путем центрифугирования при 1500 об./мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Путем центрифугирования БТП при 3000 об./мин в течение 15 мин получали обедненную тромбоцитами плазму (ОТП), которую использовали для разведения БТП до

300 тыс. клеток/мкл, если это было необходимо, и калибровки агрегометра на уровень  $T = 100\%$ .

АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов исследовалась фотометрическим методом на агрегометре SOLAR (Беларусь) при концентрации индуктора 2,5 мкМ, 5 мкМ и 10 мкМ (АДФ производства «Sigma-Aldrich», USA). Результат оценивали по изменению степени светопропускания ( $T$ , %) в точке максимума, а также по скорости агрегации ( $V$ , %/мин) через 30 секунд после добавления АДФ.

Содержание GP IIb-IIIa и P-селектина на поверхности тромбоцитов определялись методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченых моноклональных антител CD61-FITC и CD62P-PE соответственно на проточном цитометре CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, US). Цитометрическое исследование проводили в цельной венозной крови, разведенной в 50 раз однократным фосфатным буфером (1 x PBS). Для окрашивания флуоресцентно мечеными антителами 40 мкл разведенной крови инкубировали с 5 мкл CD61-FITC или CD62P-PE в течение 15 минут при комнатной температуре. Для активации тромбоцитов одновременно с антителами добавляли 10 мМ АДФ. В качестве отрицательного контроля использовали антитела к мышинному иммуноглобулину, меченые FITC и PE. Реакцию останавливали добавлением 455 мкл 1 x PBS, и образцы анализировали на проточном цитометре. Количество GP IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов до и после индукции 10 мкМ АДФ оценивали как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), экспрессию P-селектина на поверхности тромбоцитов оценивали как процент клеток, меченых CD62P-PE до и после индукции 10 мкМ АДФ. Рассчитанный параметр  $\Delta GP IIb-IIIa$  показывает увеличение в % количества GP IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов после индукции АДФ по отношению к количеству GP IIb-IIIa в отсутствие индуктора,  $\Delta P$ -селектин показывает, во сколько раз увеличилось число клеток, экспрессирующих P-селектин при добавлении АДФ.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Statistica 6.0. Числовые показатели исследуемых параметров

представлены как средние значения со стандартной ошибкой среднего значения. Для сравнения средних значений в различных группах использовали непараметрические методы – U-тест Манна–Уитни, тест Крускал–Уиллиса, парный тест Вилкоксона, корреляции оценивались по Спирману.

## Результаты

При анализе АДФ-индуцированной агрегации не было выявлено различий между контрольной группой практически здоровых лиц и пациентами, перенесшими инфаркт миокарда не менее 6 месяцев назад и принимающими в качестве антиагрегантной терапии только аспирин. В данных группах Д и А наблюдались высокие значения как степени, так и скорости агрегации при всех концентрациях индуктора. Напротив, у больных, принимающих клопидогрел в комбинации с аспирином в момент исследования, отмечалось статистически достоверное снижение показателей АДФ-индуцированной агрегации (табл. 1) как по сравнению с донорами, так и пациентами, принимающими только аспирин.

Анализ функциональной активности тромбоцитов с использованием проточной цитометрии показал, что количество рецептора GP IIb-IIIa и экспрессия P-селектина на поверхности тромбоцитов достоверно увеличиваются при активации 10 мкМ АДФ как в контрольной группе доноров, так и у больных, принимающих только аспирин (табл. 2). У пациентов из группы К+А при индукции АДФ не происходило значимого изменения количества GP IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов, а также не увеличивалось число клеток, экспрессирующих на своей поверхности P-селектин, то есть не наблюдалась активация тромбоцитов в ответ на АДФ. При этом количество GP IIb-IIIa до и после добавления АДФ и экспрессирование P-селектина после добавления АДФ было достоверно меньше в группе лиц, принимающих клопидогрел, чем в группах Д и А.

Следует отметить, что число тромбоцитов, экспрессирующих P-селектин в отсутствие АДФ, было несколько больше в группе К+А, чем у доноров ( $p = 0,08$ ).

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ АДФ-ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ ( $T$ , %) В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

Группы	2,5 мкМ АДФ		5 мкМ АДФ		10 мкМ АДФ	
	$T$ , %	$V$ , %/мин	$T$ , %	$V$ , %/мин	$T$ , %	$V$ , %/мин
Д	52,1±5,4	36,3±4,0	69,5±5,6	43,3±4,1	76,2±3,6	42,5±3,4
А	54,6±6,6	30,2±5,2	70,7±3,2	36,2±2,5	75,6±3,0	33,4±4,4
К+А	17,4±4,4*	16,1±2,2*	29,0±4,9**	21,3±3,0**	нет измерений	

Примечание. \* –  $p = 0,0002$  для  $T$  и  $p = 0,002$  для  $V$  между К+А и Д;  $p = 0,0003$  для  $T$  и  $p = 0,02$  для  $V$  между К+А и А.

\*\* –  $p = 0,0003$  для  $T$  и  $p = 0,002$  для  $V$  между К+А и Д;  $p = 0,0002$  для  $T$  и  $p = 0,005$  для  $V$  между К+А и А.

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО GP IIb-IIIa И ЭКСПРЕССИЯ P-СЕЛЕКТИНА НА ПОВЕРХНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ДО И ПОСЛЕ АКТИВАЦИИ 10 МКМ АДФ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

Параметры		Д	А	К+А
GP IIb-IIIa (MFI)	АДФ (-)	18,5±0,9	17,7±3,0	14,0±1,4*
	АДФ (+)	21,0±1,2 <sup>^</sup>	22,6±4,1 <sup>^^^</sup>	15,2±1,7 <sup>**</sup>
P-селектин (% клеток)	АДФ (-)	2,9±0,9	3,9±1,0	5,1±1,5
	АДФ (+)	30,5±3,1 <sup>^^</sup>	17,2±4,7 <sup>^^^</sup>	5,6±1,3 <sup>***</sup>

**Примечание.** Различия между 3-я группами: \* –  $p = 0,048$ ; \*\* –  $p = 0,03$ ; \*\*\* –  $p = 0,0005$ . Различия между АДФ (+) и АДФ (-): <sup>^</sup> $p = 0,015$ ; <sup>^^</sup> $p = 0,0003$ ; <sup>^^^</sup> $p = 0,04$ ; <sup>^^^</sup> $p = 0,02$ .

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ, ИЗМЕРЕННЫМИ НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРЕ И ОПТИЧЕСКОМ АГРЕГОМЕТРЕ, В ОБЩЕЙ ГРУППЕ ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ (n = 33)

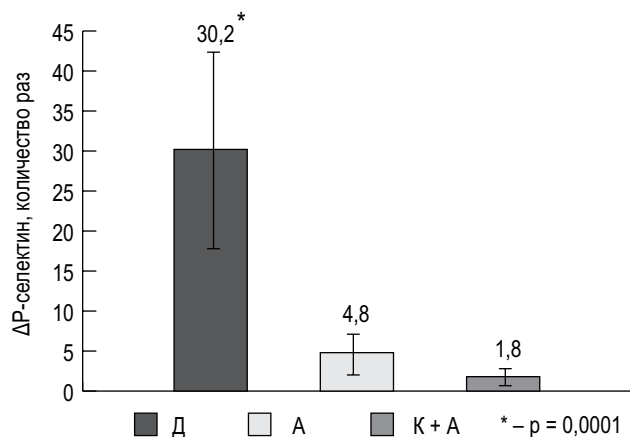
Параметры		GP IIb-IIIa АДФ (+)	$\Delta$ GP IIb-IIIa	P-селектин АДФ (+)	$\Delta$ P-селектин
T, %	2,5 мкМ АДФ	R = 0,57 $p = 0,0005$	R = 0,34 $p = 0,05$	R = 0,69 $p = 0,000009$	R = 0,46 $p = 0,008$
	5 мкМ АДФ	R = 0,39 $p = 0,03$	R = 0,83* $p = 0,006$	R = 0,63 $p = 0,0001$	R = 0,58 $p = 0,0006$
V, %/мин	2,5 мкМ АДФ	R = 0,29 $p = 0,1$	Нет корреляций	R = 0,41 $p = 0,02$	R = 0,45 $p = 0,01$
	5 мкМ АДФ	R = 0,42 $p = 0,02$	Нет корреляций	R = 0,64 $p = 0,00008$	R = 0,59 $p = 0,0005$

**Примечание.** \* – корреляция только в группе К+А.

При анализе параметров функциональной активности тромбоцитов, измеренных методом проточной цитометрии, было выявлено их соотношение между собой и с показателями стандартной агрегатометрии. В общей группе, включающей всех обследованных лиц, наблюдалась положительная и достоверная корреляция между количеством GP IIb-IIIa и экспрессией P-селектина после индукции АДФ –  $R = 0,71$  ( $p = 0,000003$ ) и между  $\Delta$ GP IIb-IIIa и  $\Delta$ P-селектин –  $R = 0,4$  ( $p = 0,02$ ). Корреляции

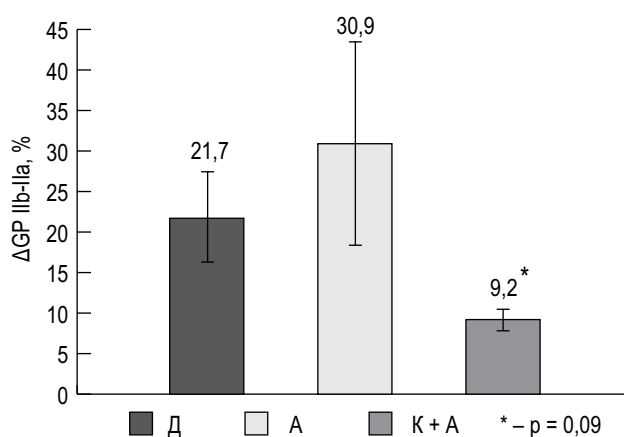
между показателями активности тромбоцитов, измеренными на проточном цитометре и агрегометре, представлены в таблице 3.

Мы проанализировали, насколько параметры функциональной активности тромбоцитов, измеренные на проточном цитометре, могут отражать эффективность антиагрегантной терапии клопидогрелом. Если T и V АДФ-индуцированной агрегации на фоне приема клопидогрела снижается в среднем в 2,5 раза по сравнению с донорами, не принимающими антиагрегантные



**Рисунок 1.** Степень изменения экспрессии P-селектина на поверхности тромбоцитов при активации АДФ в исследуемых группах

**Примечание.** Д – доноры, А – пациенты, принимающие аспирин, К+А – пациенты, принимающие клопидогрел и аспирин.



**Рисунок 2.** Степень изменения количества рецептора GP IIb-IIIa на мембране тромбоцитов при активации АДФ в исследуемых группах

**Примечание.** Д – доноры, А – пациенты, принимающие аспирин, К+А – пациенты, принимающие клопидогрел и аспирин.

препараты (табл. 1), то  $\Delta P$ -селектин уменьшается более чем в 16 раз (рис. 1), достоверно и наглядно отражая полное подавление тромбоцитарной активации на фоне лекарственного препарата.  $\Delta GP$  IIb-IIIa также существенно снижено в группе К+А по сравнению с группами Д и А, но различия не достигают статистически значимых величин (рис. 2), возможно, вследствие широкого варьирования данного параметра: от 0 до 62% в группе Д, от 0 до 91% в группе А и от 0 до 32% в группе К+А.

$\Delta P$ -селектин также уменьшено на фоне стабильной терапии аспирином по сравнению с контрольной группой (рис. 1), в то время как показатели АДФ-индуцированной агрегации не способны отразить эффективность действия аспирина у данной категории пациентов (табл. 1).

## Обсуждение

Высокая агрегационная способность тромбоцитов является строгим фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [13]. Как уже отмечалось, «золотым стандартом» для анализа активности тромбоцитов выступает оптический метод, однако, детектируя недостаточность тромбоцитарной функции, данный способ не отражает степени гиперагрегации [12]. Способы лабораторного контроля ответа тромбоцитов на антиагрегантную терапию исключительно важны и для оценки индивидуальной чувствительности к клопидогрелу и аспирину. Частота аспирина- и клопидогрел-резистентности варьируется в очень широком диапазоне от 5 до 60% [3,9]. Кроме того, определение резистентности к клопидогрелу и аспирину до настоящего момента вызывает дискуссию. Под аспирина-резистентностью, как правило, понимают феномен, включающий в себя, во-первых, невозможность защитить больного от тромбоцитарных осложнений, во-вторых, неспособность увеличить время кровотечения, снизить продукцию ТХА<sub>2</sub> и вызвать предсказуемый эффект в одном или более лабораторных исследованиях *in vitro* [6, 17]. Наиболее адекватным определением клопидогрел-резистентности можно считать неспособность препарата блокировать целевой АДФ-рецептор тромбоцитов P2Y<sub>12</sub> и эффективно подавлять агрегацию тромбоцитов [10].

В качестве лабораторных тестов эффективности антиагрегантной терапии в настоящее время используют оптический метод, импедансную агрегатометрию, PFA-100 анализ (в большей степени для оценки эффективности аспирина), VerifyNow (для аспирина и клопидогрела), VASP (определение вазодилататор-стимулированного фосфопротеина для оценки действия клопидогрела) [14]. Имеются лишь отдельные публика-

ции об использовании метода проточной цитометрии для определения содержания рецепторов GP IIb-IIIa и P-селектина как маркеров активации тромбоцитов и факторов индивидуальной чувствительности к клопидогрелу и аспирину [3, 5, 16]. По сравнению с другими способами оценки функциональной активности тромбоцитов, в том числе на фоне антиагрегантов, проточная цитометрия, возможно, наиболее адекватно отражает ситуацию *in vivo*, так как в основе заложена высокоспецифичная реакция антиген-антитело.

Мы анализировали содержание гликопротеинового рецептора GP IIb-IIIa и экспрессирование P-селектина на поверхности неактивных тромбоцитов и клеток, активированных инкубацией с 10 мкм АДФ. До 80% рецепторов GP IIb-IIIa равномерно распределены на мембране тромбоцитов, остальные 20% находятся на мембране открытой канальцевой системы [2]. У исследованных нами доноров количество GP IIb-IIIa после индукции АДФ возрастало в среднем на 20%, что соотносится с экспонированием рецепторов открытой канальцевой системы наружу в ходе цитоскелетной перестройки клетки в результате активации. У больных, принимающих только аспирин, количество GP IIb-IIIa возрастало на 30%, а у пациентов, принимающих клопидогрел в комбинации с аспирином, изменение количества рецептора GP IIb-IIIa на фоне АДФ составило менее 10%, что можно расценивать как успешное подавление механизмов АДФ-индуцированной активации селективным блокатом АДФ-рецептора P2Y<sub>12</sub> – клопидогрелом. Показатель  $\Delta GP$  IIb-IIIa коррелирует с параметрами стандартной АДФ-индуцированной агрегации, и так же как степень и скорость агрегации, снижен на фоне клопидогрела вдвое по сравнению с контрольной группой. Аналогичное 50% ингибирование активации GP IIb-IIIa на фоне блокатора АДФ-рецептора P2Y<sub>12</sub> было показано в работе Braun и соавторов [4]. Однако наиболее информативным и наглядным в отношении оценки функциональной активности тромбоцитов, в том числе на фоне антиагрегантных препаратов, оказалось экспрессирование P-селектина на поверхности тромбоцитов. P-селектин – основной компонент, участвующий во взаимодействии тромбоцитов с лейкоцитами и ответственный за образование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов, экспрессируется только активированными тромбоцитами, его высокий уровень наблюдался у пациентов, резистентных к антиагрегантной терапии аспирином [8, 15]. В нашей работе количество клеток, экспрессирующих P-селектин в отсутствие активации *in vitro*, составило в исследуемых группах 3-5%, это

подтверждает положение, что неактивированные тромбоциты не экспрессируют Р-селектин на своей поверхности. При активации число клеток, связывающихся с антителами к Р-селектину, увеличивается у доноров до 30%, а на фоне приема аспирина — до 17%. В то время как у пациентов, принимающих клопидогрел, число тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, остается практически неизменным — чуть больше 5%, то есть не происходит их активации. Таким образом, параметр ΔР-селектин адекватно отражает активность тромбоцитов и может выступать маркером их гиперфункции. Определение такого маркера «высокой реактивности тромбоцитов на фоне антиагрегантной терапии» является крайне необходимым, так как может в конечном итоге прогнозировать клинические исходы у пациентов [11].

В данном исследовании мы соединили принцип активации с АДФ, который заложен в стандартной индуцированной агрегации, и проточную цитофлуориметрию с использованием FITC- и PE-меченных антител к рецептору GP IIb-IIIa и Р-селектину. Данный подход оправдал себя и позволил предложить новые лабораторные критерии для оценки гиперагрегации тромбоцитов и эффективности действия клопидогрела и аспирина.

## Заключение

Иммунологические методы могут быть использованы для анализа тромбоцитарного гемостаза и эффективности действия антиагрегантной терапии.

## Благодарности

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ № 08-04-00377-а) и Программой РАН «Фундаментальные науки — медицине».

## Список литературы

1. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. — Челябинск, 2008. — 195 с.
2. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз. — СПб.: Издательство СПб ГМУ, 2000. — 227 с.
3. Barsky A.A., Arora R.R. Clopidogrel resistance: myth or reality? // J. Cardiovasc. Pharmacol. Therapeut. — 2006. — Vol. 11, N 1. — P. 47-53.
4. Braun O.O., Amisten S., Wihlborg A.-K., Hunting K., Nillson D., Erlinge D. Residual platelet ADP reactivity after clopidogrel treatment is dependent on activation of both the unblocked P2Y1 and the P2Y12 receptor and is correlated with protein expression of P2Y12 // Purinergic Signalling. — 2007. — Vol. 3. — P. 195-201.
5. Braun O.O., Johnell M., Varenhorst C., James S., Brandt J.T., Jakubowski J.A., Winters K.J., Wallentin L., Erlinge D., Siegbahn A. Greater reduction of platelet activation markers and platelet-monocyte aggregates by prasugrel compared to clopidogrel in stable coronary artery disease // Thromb. Haemost. — 2008. — Vol. 100, N 4. — P. 626-633.
6. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection // J. Thromb. Haemost. — 2007. — Vol. 5, N 1. — P. 230-237.
7. Enjeti A.K., Lincz L.F., Seldon M. Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology // Semin Thromb Hemost. — 2007. — Vol. 33. — N 8. — P. 771-779.
8. Ferguson A., Dokainish H., Lakkis N. Aspirin and clopidogrel response variability // Tex. Heart. Inst. J. — 2008. — Vol. 35, N 3. — P. 313-320.
9. Fitzgerald D.J., Maree A. Aspirin and clopidogrel resistance // Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program. — 2007. — P. 114-120.
10. Gurbel P.A., Tantry U.S. Clopidogrel resistance? // Thromb. Research. — 2007. — Vol. 120. — P. 311-321.
11. Hayward C.P.M. Advances in understanding «high on-treatment platelet reactivity» // Thromb. Haemost. — 2009. — Vol. 102. — P. 799-800.
12. ISLH 2008, Sydney, Coagulation / Haemostasis Workshop.
13. Koenig W. Haemostatic risk factors for cardiovascular diseases // Eur. Heart. J. — 1998. — Vol. 19. — C. 39-43.
14. Oestreich J., Smyth S., Campbell C. Platelet function analysis: at the edge of meaning // Thromb. Haemost. — 2009. — Vol. 101. — P. 217-219.
15. Shantsila E., Lip G.Y.H. The role of monocytes in thrombotic disorders // Thromb. Haemost. — 2009. — Vol. 102. — P. 916-924.
16. Storey R., Judge H., Heptinstall S. Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y12 receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin // Thromb. Haemost. — 2002. — Vol. 88, N 3. — P. 488-494.
17. Szczeklik A., Musial J., Undas A., Sanak M. Aspirin resistance // J. Thromb. Haemost. — 2005. — Vol. 3. — P. 1655-1662.

поступила в редакцию 22.12.2009  
отправлена на доработку 11.01.2010  
принята к печати 12.01.2010