



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-4-116-124>
УДК 616.12-008.313.2-06:616.151.5

Спонтанная и стимулированная агрегационная активность тромбоцитов у пациентов с фибрилляцией предсердий и тромботическими осложнениями

Е.С. Ситкова, М.А. Драгунова, О.Н. Огуркова,
А.В. Сморгон, Т.В. Московских, Р.Е. Баталов, Т.Е. Суслова

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

Аннотация

Цель исследования: изучить спонтанную и стимулированную аденозиндифосфатом (АДФ), адреналином и коллагеном агрегационную способность тромбоцитов, систему CD40-лиганд CD40 у пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП) с перенесенными ранее тромбозом/тромботическими осложнениями (ТЭО) и вновь диагностированными тромбозами.

Материал и методы. В исследование включались пациенты с «неклапанной» ФП с ТЭО в анамнезе и выявленными тромбозами на фоне получаемой регулярно терапии антикоагулянтами в период 01.2020–01.2023 гг.: 13 пациентов с анамнестическими указаниями на перенесенные ТЭО (группа 1), 18 – с первично диагностированными тромбозом / спонтанным эхоконтрастированием предсердий высокой степени (группа 2). Группой сравнения были здоровые добровольцы ($n = 31$) (группа 3). Проводилось изучение спонтанной агрегации тромбоцитов и стимулированной индукторами (диагностические наборы с растворами АДФ, адреналина и коллагена), определение уровня маркеров CD40, растворимого лиганда CD40 (CD40L).

Результаты. Степень спонтанной агрегации тромбоцитов по кривой светопропускания была значимо выше у пациентов группы 2 в сравнении со здоровыми добровольцами с трендом образования агрегатов большего размера у пациентов с ТЭО. При индукции агрегации коллагеном скорость образования агрегатов была значительно ниже в группах 1 и 2 в сравнении со здоровыми добровольцами. При использовании АДФ отмечено сопоставимое снижение степени и скорости, а при использовании адреналина – только скорости агрегации тромбоцитов, оцениваемой по кривой светопропускания, в группах 1 и 2. Концентрация растворимого CD40L значимо преобладала у пациентов с тромботическими осложнениями и ТЭО в анамнезе над таковой у здоровых добровольцев.

Выводы. Спонтанная агрегационная активность тромбоцитов и концентрация растворимого CD40L повышена как у пациентов с перенесенными ТЭО, так и у пациентов с вновь диагностированными тромбозами на фоне ФП и постоянной монотерапии антикоагулянтами.

Ключевые слова:	агрегация тромбоцитов, тромбоз/тромботические осложнения, фибрилляция предсердий, система CD40-CD40L, антикоагулянты.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено при поддержке Научно-исследовательского института кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук.
Соответствие принципам этики:	участники исследования до включения подписали информированное согласие. Проведение исследования было одобрено комитетом по биомедицинской этике при Научно-исследовательском институте кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (протокол № 210 от 18.02.2021 г.).
Для цитирования:	Ситкова Е.С., Драгунова М.А., Огуркова О.Н., Сморгон А.В., Московских Т.В., Баталов Р.Е., Суслова Т.Е. Спонтанная и стимулированная агрегационная активность тромбоцитов у пациентов с фибрилляцией предсердий и тромботическими осложнениями. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(4):116–124. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-4-116-124 .

Spontaneous and stimulated platelet aggregation activity in patients with atrial fibrillation and thrombotic complications

Ekaterina S. Sitkova, Marina A. Dragunova, Oksana N. Ogurkova,
Andrey V. Smorgon, Tatiyana V. Moskovskikh, Roman E. Batalov,
Tatiyana E. Suslova

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia
111 a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

Abstract

Aim: To study spontaneous and stimulated by adenosine diphosphate (ADP), adrenaline and collagen platelet aggregation activity, CD40-CD40 ligand system in patients with atrial fibrillation (AF) with previous thromboembolic complications (TEC) and newly diagnosed thrombosis.

Material and Methods. The study included patients with «non-valvular» AF and anamnesis of TEC and newly identified thrombosis on anticoagulants in the period 01.2020-01.2023: 13 patients had anamnesis of TEC (group 1), in 18 patients were initially diagnosed thrombosis/spontaneous atrial echocontrast of high grade (group 2). The comparison group was the healthy individuals ($n = 31$) (group 3). The spontaneous aggregation ability of platelets and stimulated with solutions of ADP, adrenaline and collagen, the level of CD40 markers, soluble CD40 ligand (CD40L) were studied.

Results. The spontaneous platelet aggregation activity was significantly higher in patients of group 2 compared with healthy individuals with a formation trend of larger aggregates in patients with TEC. When aggregation was induced by collagen, the rate of aggregate formation was significantly lower in the 1st and 2nd groups compared with healthy individuals. When using ADP, a comparable decrease in the degree and speed was noted, and when using adrenaline, only the rate of platelet aggregation was observed in groups 1 and 2. The concentration of soluble CD40L was significantly higher in patients with a history of TEC and newly thrombosis.

Conclusion. Spontaneous platelet aggregation activity and the concentration of soluble CD40L are increased both in patients with past of TEC and in patients with newly diagnosed thrombosis due to AF and anticoagulant monotherapy.

Keywords:	platelet aggregation, thromboembolic complications, atrial fibrillation, CD40-CD40L, anticoagulants.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the study was performed with the support of the Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia.
Adherence to ethical standards:	informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the Ethics Committee of Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (protocol No. 210 from 18.02.2021).
For citation:	Sitkova E.S., Dragunova M.A., Ogurkova O.N., Smorgon A.V., Moskovskikh T.V., Batalov R.E., Suslova T.E. Spontaneous and stimulated platelet aggregation activity in patients with atrial fibrillation and thrombotic complications. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(4):116–124. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-4-116-124 .

Введение

Фибрилляция предсердий (ФП) является прогностически неблагоприятной аритмией и сопряжена с повышением риска развития тромбоэмболических осложнений (ТЭО). В более чем 90% случаев их источником является левое предсердие (ЛП) и его ушко [1]. В ряде исследований показано, что тромбообразование у пациентов с ФП может происходить и в правом предсердии, глубоких венах (1,3%), приводя к развитию тромбоэмболии легочных артерий в 0,8% случаев [2].

Важно, что в патогенезе развития тромбозов у данной категории пациентов значение имеют не только гемодинамические сдвиги, предрасполагающие к прогрессирующей дилатации предсердий и тромбообразованию и приводящие к стазу крови. Большая роль помимо этого отводится эндотелиальной дисфункции и изменениям гемостаза. При этом в механизмах реализации процесса тромбообразования значение имеют не только звенья коагуляционного гемостаза, но и собственно тромбоцитарное звено. Было показано, что у пациентов с ФП наблюдается повышенный уровень маркеров коагуляции и

фибринолиза (фибриноген, D-димер, фактор VIIIc, тканевой активатор плазминогена, тромбин-антитромбиновый комплекс, фрагменты протромбина 1+2), показателей эндотелиальной дисфункции и повреждения (фактор фон Виллебранда, тромбомодулин) и активации тромбоцитов (аденозиндифосфат (АДФ)–индуцированная агрегация, бета-тромбоглобулин, фактор тромбоцитов 4, гликокалицин (фрагмент GPIIb), P-селектин) по сравнению с лицами с синусовым ритмом [3, 4]. Важная роль отведена повышению уровня фактора фон Виллебранда у пациентов с ФП, играющего ключевую роль в адгезии и агрегации тромбоцитов. При этом доказано, что концентрация фактора фон Виллебранда, селектина и тромбомодулина не изменяется на фоне терапии варфарином [5].

Изучение звеньев системы гемостаза у пациентов с анамнезом ТЭО и развивающимися тромбозами с целью коррекции лечения и реализации контролируемого подхода к терапии не является распространенным, при этом оценка риска рецидивов затруднительна. Вместе с тем вклад отдельных компонентов системы гемостаза в развитие ТЭО является неоспоримым, что делает анализ агрегационной способности тромбоцитов одним из важных этапов в формировании представления о группе риска пациента.

Цель исследования: изучить спонтанную и стимулированную АДФ, адреналином и коллагеном агрегационную активность тромбоцитов, систему CD40-лиганд CD40 у пациентов с ФП на фоне терапии антикоагулянтами с перенесенными ранее ТЭО и вновь диагностированными тромбозами.

Материал и методы

Проводимое клиническое исследование является одноцентровым проспективным нерандомизированным наблюдательным и реализовано на базе Научно-исследовательского института кардиологии г. Томска. В исследование включались пациенты с «неклапанной» ФП с ТЭО в анамнезе и / или выявленными тромбозами на фоне получаемой регулярно терапии антикоагулянтами в возрасте старше 18 лет после подписания информированного согласия. Не включались пациенты с противопоказаниями к приему антикоагулянтов / нерегулярной терапией, с хронической сердечной недостаточностью со снижением фракции выброса левого желудочка менее 40% и значительной дилатацией полостей сердца; клапанной патологией сердца; беременные или женщины детородного возраста, планирующие беременность на время проведения исследования, а также недееспособные пациенты по психоневрологическим состояниям.

Скринированию подвергались все пациенты, проходившие стационарное лечение в отделении нарушения ритма сердца по нозологии ФП в период 01.2020–01.2023 гг. ($n = 2820$). В исследование был включен 31 пациент, из которых у 13 имелись анамнестические указания на перенесенные ТЭО (группа 1), а у 18 больных за период госпитализации первично диагностированы тромбоз / спонтанное эхоконтрастирование предсердий 2–3-й степени (группа 2). Все пациенты находились на постоянной терапии антикоагулянтами в рекомендованной дозе. Приверженность пациентов к лечению оценивалась путем интервьюирования и анализа МНО при приеме варфарина. Группой сравнения были здоровые добровольцы ($n = 31$) без указаний на тромбозы в анамнезе и терапию антикоагулянтами, сердечно-сосудистую патологию и коморбидные состояния, сопряженные с синдромом гиперкоагуляции (группа 3).

Клинико-лабораторные и инструментальные методы исследования.

1. Определение агрегационной способности тромбоцитов. Пробирки с периферической кровью центрифугировали при 1400 об/мин в течение 7 мин. Агрегационную активность тромбоцитов исследовали с помощью метода Г. Борна в модификации З.А. Габбасова на двухканальном лазерном анализаторе 220 LA «НПФ Биола» с компьютерной обработкой по программе AGGR. Для индукции агрегации использовались диагностические наборы фирмы «Технология-стандарт» (Россия) с растворами АДФ (в концентрации 1,25; 2,5; 5 и 10 мкг/мл), адреналина (в концентрации 2,5; 5 и 10 мкг/мл) и коллагена. Запись кривых агрегации осуществлялась в течение 5 мин, добавление индукторов агрегации проводилось через 10 с от начала записи кривой. Оценивалась степень агрегации по кривой светопропускания – максимальный прирост светопропускания (СП) после добавления индуктора агрегации (в %). Степень агрегации по кривой среднего размера агрегатов – максимальное значение среднего размера агрегатов (CPA) после добавления индуктора (в условных единицах). Скорость агрегации – максимальный наклон кривой СП (%/мин) и кривой CPA (ед./мин). Показатели спонтанной агрегации регистрировались на 2-й мин записи.

2. Для определения уровня маркеров CD40 (пг/мл), растворимого лиганда CD40 (sCD40L) (нг/мл) использовался метод иммуноферментного анализа с помощью диагностических наборов фирмы «Biomedica GmbH» (Austria), с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

3. Трансторакальная эхокардиография на аппарате EnVisor C HD («Philips», США) в M-, B- и доплер-режимах.

4. Чреспищеводная эхокардиография на аппарате Philips HD15 (Голландия).

Статистическая обработка полученных данных производилась с помощью пакета прикладных программ SPSS. Для проверки нормальности распределения количественных показателей использовался анализ гистограмм и критерий Шапиро – Уилка. Нормально распределенные количественные показатели представлены средним значением и стандартным отклонением, $M \pm SD$, при отсутствии нормального распределения – медианой и межквартильным диапазоном, $Me [LQ-UQ]$. Категориальные показатели представлены абсолютными (n) и относительными (в %) частотами встречаемости. Для сравнения нормально распределенных показателей в трех независимых группах использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), для парных сравнений t -критерий Стьюдента (t -тест Уэлча при неоднородности дисперсий в группах). При распределении показателя, отличного от нормального, для сравнения показателей в трех независимых группах применялся критерий Краскала – Уоллиса, для апостериорных парных сравнений критерий Манна – Уитни. Для учета множественности сравнений использовалась поправка Бонферрони. Для сравнения категориальных показателей в независимых группах использовались χ^2 -критерий Пирсона или точный критерий Фишера. Пороговый уровень значимости при проверке статистических гипотез составлял $p = 0,05$.

Результаты

Среди пациентов с ФП, находящихся на постоянной антикоагулянтной терапии в рекомендованной дозе, в период времени с 01.2020 до 01.2023 гг. тромбоз / спонтанное эхоконтрастирование предсердий 2–3-й степени выявлены в 0,6% случаев ($n = 18$). В структуре тромбоцических осложнений и ТЭО у пациентов с перенесенными ранее событиями тромбоз уха ЛП выявлен в 30,8% ($n = 4$), тромбоз периферических вен – в 15,4% ($n = 2$), эффект спонтанного эхоконтрастирования крови – в 15,4% ($n = 2$), острое нарушение мозгового кровообращения (по кардиоэмболическому типу, согласно выпискам) – в 30,8% ($n = 4$), тромбоз периферических артерий 7,7% ($n = 1$), девайс-ассоциированный тромбоз – в 15,4% ($n = 2$) (на электродах имплантированного электрокардиостимулятора). При этом у 2 пациентов было сочетание 2 типов ТЭО. Сравнительный анализ групп пациентов приведен в таблице 1.

При сопоставлении показателей спонтанной агрегации тромбоцитов статистически значимых различий между группами по CPA не получено, вместе с тем отмечена тенденция к образованию агрегатов большего размера у пациентов с анамнезом ТЭО ($p = 0,06$). При оценке степе-

ни агрегации по кривой СП межгрупповые различия были статистически значимыми ($p = 0,042$), при этом показатель преобладал у пациентов с тромбозами в анамнезе (табл. 2).

При анализе показателей агрегации тромбоцитов, оцениваемых при добавлении индуктора коллагена, статистически значимые различия достигнуты при сравнении скорости образования агрегатов, оцениваемой в минуту, значения которой были значительно меньше в группах пациентов с тромбозами и анамнезом ТЭО в сравнении со здоровыми добровольцами. Различий в степени агрегации по показателям кривой СП и CPA выявлено не было (табл. 3).

Использование малых концентраций АДФ не приводило к значимым между группами различиям в степени и скорости агрегации тромбоцитов. Использование концентрации 10, 5 и 2,5 мкг/мл приводило к снижению скорости агрегации, оцениваемой по кривой СП, при этом подавление скорости было сопоставимым в группах с тромбозами и анамнезом ТЭО при сравнении со здоровыми добровольцами. При добавлении АДФ в концентрации 5 мкг/мл помимо скорости агрегации отмечено подавление степени агрегации при анализе кривой СП в группе пациентов с тромбозами (табл. 4–6).

Таблица 1. Клиническая характеристика групп больных

Table 1. Clinical characteristic of patient groups

Параметры Parameters	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3
Количество пациентов, n Number of patients, n	13	18	31
Возраст, лет, Me [IQR] Age, years, Me [IQR]	68 [56–76]*	70 [63–74]**	31 [25–41]
Мужчины, n (%) Men, n (%)	8 (61,5)	9 (50)	15 (48,4)
ИМТ, кг/м ² , $M \pm SD$ BMI, kg/m ² , $M \pm SD$	27,4 \pm 3,4	28,0 \pm 6,4	24,2 \pm 4,81
ГБ, n (%) Hypertension, n (%)	12 (92,3)	17 (94,4)	–
ИБС, n (%) CHD, n (%)	8 (61,5)	12 (66,7)	–
СД, n (%) DM, n (%)	1 (7,7)	4 (22,2)	–
CHA2DS2-VASc, $M \pm SD$ CHA2DS2-VASc, $M \pm SD$	4,3 \pm 1,6	4,2 \pm 1,5	–
HASBLED, Me [IQR]	2,0 [1–3]	1,5 [1–2]	–
ЭКС/АИКД/КРТД, n (%) Pacemaker/ACD/CRTD, n (%)	5 (38,5)	2 (11,1)	–
Длительность ФП, лет, Me [IQR] Duration of AF, ages, Me [IQR]	12 [5–15,5]	4,0 [1,5–9,0]	–
Антиаритмическая терапия, n (%) Antiarrhythmic therapy, n (%)	8 (61,5)	13 (72,2)	–
Антикоагулянтная терапия, n (%): Anticoagulant therapy, n (%)	31 (100)		
Апиксабан, n (%) Arixaban, n (%)	12 (38,7)		
Дабигатран, n (%) Dabigatran, n (%)	7 (22,6)		
Ривароксабан, n (%) Rivaroxaban, n (%)	8 (25,8)		
Варфарин, n (%) Warfarin, n (%)	4 (12,9)		
МНО, Me [IQR] INR, Me [IQR]	2,6 [2,4–3,2]		
ФВ ЛЖ (%), Me [IQR] EF LV (%), Me [IQR]	63 [43,5–67,5]	61 [37,5–67]	–
Диаметр левого предсердия, мм, $M \pm SD$ Left atrial size, mm, $M \pm SD$	44,5 \pm 5,1	47,4 \pm 4,8	–

Окончание табл. 1
End of table 1

Параметры Parameters	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3
ММ ЛЖ, г, $M \pm SD$ LVM, g, $M \pm SD$	189,2 \pm 58,3	191,2 \pm 46,0	–
КДИ, мл/м ² , Me [IQR] EDI, ml/m ² , Me [IQR]	51 [46,6–66]	52,5 [44,1–66,7]	–
КСИ, мл/м ² , Me [IQR] ESI, ml/m ² , Me [IQR]	19,8 [15,3–32,6]	22,4 [15,7–35,9]	–

Примечание: ИМТ – индекс массы тела, СД – сахарный диабет, ГБ – гипертоническая болезнь, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ЭКС – электрокардиостимулятор, АИКД – автоматический кардиовертер-дефибриллятор, КРТД – кардиоресинхронизирующая терапия с функцией дефибриллятора, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, ММ ЛЖ – масса миокарда левого желудочка, КДИ – конечный диастолический индекс, КСИ – конечный систолический индекс, МНО – международное нормализованное отношение, * $p_{1-3} < 0,001$; ** $p_{2-3} < 0,001$.

Note: BMI – body mass index, DM – diabetes mellitus, CHD – coronary heart disease, ACD – automatic cardioverter defibrillator, CRTD – cardiac resynchronization therapy with defibrillation, AF – atrial fibrillation, EF LV – ejection fraction of left ventricle, LVM – left ventricular mass, EDI – end diastolic index; ESI – end systolic index, INR – international normalized ratio, * $p_{1-3} < 0,001$; ** $p_{2-3} < 0,001$.

Таблица 2. Параметры спонтанной агрегации тромбоцитов в сравниваемых группах пациентов

Table 2. Parameters of spontaneous platelet aggregation in the compared groups

Показатели Parameters	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	p
CPA, ед., Me [IQR] AAS, unit Me [IQR]	1,09 [0,96–1,16]	1,01 [0,74–1,08]	1,05 [0,90–1,14]	0,060
СП, %, Me [IQR] LT, % Me [IQR]	0,82 [0,23–1,02]	0,91 [0,55–1,41]	0,73 [0,48–1,26]	0,042 $p_{1-3} = 0,324$ $p_{1-2} = 0,061$ $p_{2-3} = 0,037$

Примечание: CPA – средний размер агрегатов, СП – светопропускание, p – значимость различий в исследуемых группах: p_{1-3} – между группами 1 и 3; p_{1-2} – между группами 1 и 2; p_{2-3} – между группами 2 и 3.

Note: AAS – average aggregate size; LT – light transmittance; p – significance of differences in the study groups: p_{1-3} – between groups 1 and 3; p_{1-2} – between groups 1 and 2; p_{2-3} – between groups 2 and 3.

Таблица 3. Параметры коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов в сравниваемых группах пациентов

Table 3. Parameters of collagen-induced platelet aggregation in compared groups

Показатели Parameters	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	p
CPA, ед., $M \pm SD$ AAS, unit $M \pm SD$	12,1 \pm 2,27	11,2 \pm 3,52	13,1 \pm 3,29	0,200
СП, %, Me [IQR] LT, % Me [IQR]	73,6 [69,8–75,4]	73,2 [69,9–74,8]	71,2 [68,3–75,1]	0,886
CPA, ед/мин, $M \pm SD$ AAS, unit/min $M \pm SD$	33,3 \pm 13,03	29,2 \pm 16,4	40,6 \pm 12,3	0,027 $p_{1-3} = 0,353$ $p_{1-2} = 0,702$ $p_{2-3} = 0,037$
СП, %/мин $M \pm SD$ LT, %/min $M \pm SD$	71,7 \pm 19,7	69,9 \pm 25,8	82,6 \pm 18,2	0,131

Примечание: см. табл. 2.

Note: see table 2.

Таблица 4. Параметры индуцированной агрегации тромбоцитов при использовании АДФ в концентрации 10 мкг/мл в сравниваемых группах пациентов

Table 4. Parameters of induced platelet aggregation when using ADP at a concentration of 10 μ g/ml in compared groups

Показатели Parameters	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	p
CPA, ед., Me [IQR] AAS, unit Me [IQR]	15,6 [11,4–17,3]	12,9 [12,5–19,9]	16,4 [12,6–18,8]	0,682
СП, %, Me [IQR] LT, % Me [IQR]	68,0 [60,0–70,8]	68,8 [48,4–71,1]	70,9 [65,7–74,1]	0,147
CPA, ед/мин, Me [IQR] AAS, unit/min Me [IQR]	51,3 [35,7–58,4]	36,4 [33,0–66,6]	53,8 [40,4–64,7]	0,329
СП, %/мин Me [IQR] LT, %/min Me [IQR]	76,7 [58,3–82,7]	73,4 [52,9–82,5]	96,4 [71,4–102,5]	0,023 $p_{1-3} = 0,033$ $p_{1-2} = 0,836$ $p_{2-3} = 0,018$

Примечание: см. табл. 2.

Note: see table 2.

Таблица 5. Параметры индуцированной агрегации тромбоцитов при использовании АДФ в концентрации 5 мкг/мл в сравниваемых группах пациентов**Table 5.** Parameters of induced platelet aggregation when using ADP at a concentration of 5 µg/ml in compared groups

Показатели Parameters	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	<i>p</i>
CPA, ед., $M \pm SD$ AAS, unit, $M \pm SD$	14,2±4,5	14,2±4,2	14,4±4,8	0,987
СП, %, $Me [IQR]$ LT, %, $Me [IQR]$	66,2 [55,6–70,3]	64,1 [49,9–66,8]	67,8 [63,7–73,4]	0,029 $p_{1-3} = 0,680$ $p_{1-2} = 0,745$ $p_{2-3} = 0,027$
CPA, ед./мин, $M \pm SD$ AAS, unit/min, $M \pm SD$	41,9 ± 21,1	39,7 ± 20,4	47,8 ± 18,8	0,536
СП, %/мин, $M \pm SD$ LT, %/min, $M \pm SD$	64,6 ± 15,4	58,7 ± 11,3	78,9 ± 14,2	0,02 $p_{1-3} = 0,040$ $p_{1-2} = 0,675$ $p_{2-3} = 0,003$

Примечание: см. табл. 2.

Note: see table. 2.

Таблица 6. Параметры индуцированной агрегации тромбоцитов при использовании АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл в сравниваемых группах пациентов**Table 6.** Parameters of induced platelet aggregation when using ADP at a concentration of 2.5 µg/ml in compared groups

Показатели Parameters	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	<i>p</i>
CPA, ед., $M \pm SD$ AAS, unit, $M \pm SD$	14,3 ± 5,3	15,3 ± 5,2	15,9 ± 5,4	0,778
СП, %, $Me [IQR]$ LT, %, $Me [IQR]$	56,4 [44,4–65,9]	61,8 [47,7–66,6]	67,2 [59,1–69,8]	0,092
CPA, ед./мин, $M \pm SD$ AAS, unit/min, $M \pm SD$	41,4 ± 20,4	40,8 ± 21,6	53,5 ± 21,9	0,252
СП, %/мин, $Me [IQR]$ LT, %/min, $Me [IQR]$	63,7 [41,5–72,0]	60,0 [53,1–62,1]	71,4 [64,6–83,7]	0,012 $p_{1-3} = 0,041$ $p_{1-2} = 0,542$ $p_{2-3} = 0,006$

Примечание: см. табл. 2.

Note: see table. 2.

Анализ стимулированной адреналином агрегации тромбоцитов при использовании в малых концентрациях 2,5 мкг/мл не привел к изменениям показателей в сравниваемых группах. Вместе с тем добавление адреналина в концентрации 5 и 10 мкг/мл приводило к снижению скорости агрегации, оцениваемой по кривой СП в минуту. Убедительный уровень значимости различий достигнут при сравнении данного показателя в группе с тромбозами и здоровыми добровольцами.

Скорость агрегации в группе с анамнезом ТЭО и тромботических осложнений снизилась в меньшей степени, но достигла статистически значимого уровня различий при использовании адреналина в концентрации 5 мкг/мл ($p = 0,049$). Различий между группами с анамнезом ТЭО и вновь выявленными тромбозами по степени и скорости агрегации тромбоцитов при анализе стимулированной адреналином агрегации не выявлено (табл. 7–8).

Таблица 7. Параметры индуцированной агрегации тромбоцитов при использовании адреналина в концентрации 10 мкг/мл в сравниваемых группах пациентов**Table 7.** Parameters of induced platelet aggregation when using adrenaline at a concentration of 10 µg/ml in the compared groups

Показатели Parameters	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	<i>p</i>
CPA, ед., $M \pm SD$ AAS, unit, $M \pm SD$	10,5 ± 3,1	9,7 ± 3,7	12,4 ± 3,8	0,133
СП, %, $Me [IQR]$ LT, %, $Me [IQR]$	62,0 [27,8–66,0]	58,9 [38,1–62,9]	63,2 [53,5–68,7]	0,227
CPA, ед./мин, $Me [IQR]$ AAS, unit/min, $Me [IQR]$	12,5 [9,5–22,4]	8,3 [3,9–14,3]	25,3 [7,7–36,7]	0,085
СП, %/мин, $Me [IQR]$ LT, %/min, $Me [IQR]$	32,9 [15,6–39,4]	27,7 [21,5–35,9]	35,7 [33,1–50,5]	0,012 $p_{1-3} = 0,189$ $p_{1-2} = 0,482$ $p_{2-3} = 0,013$

Примечание: см. табл. 2.

Note: see table. 2.

Таблица 8. Параметры индуцированной агрегации тромбоцитов при использовании адреналина в концентрации 5 мкг/мл в сравниваемых группах пациентов

Table 8. Parameters of induced platelet aggregation when using adrenaline at a concentration of 5 µg/ml in the compared groups

Показатели Parameters	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	p
CPA, ед., $M \pm SD$ AAS, unit, $M \pm SD$	10,8 ± 4,0	9,4 ± 3,4	11,1 ± 3,8	0,495
СП, %, $Me [IQR]$ LT, %, $Me [IQR]$	39,0 [28,0–66,6]	52,0 [24,4–62,7]	59,7 [57,6–70,2]	0,106
CPA, ед./мин, $Me [IQR]$ AAS, unit/min, $Me [IQR]$	11,1 [7,4–17,1]	6,4 [4,4–10,3]	11,9 [7,9–23,7]	0,051
СП, %/мин, $M \pm SD$ LT, %/min, $M \pm SD$	27,5 ± 13,4	24,8 ± 10,8	41,1 ± 13,7	0,004 $p_{1-3} = 0,049$ $p_{1-2} = 0,898$ $p_{2-3} = 0,009$

Примечания: см табл. 2

Note: see table. 2.

При межгрупповом статистическом анализе системы CD40-лиганд CD40 значимых различий не выявлено. Вместе с тем концентрация растворимого CD40 лиганда значимо преобладала у пациентов с тромботическими осложнениями и ТЭО в анамнезе над таковой у здоровых добровольцев (0,025; $p_{1-3} = 0,020$; $p_{1-2} = 0,912$; $p_{2-3} = 0,018$) (рис. 1).

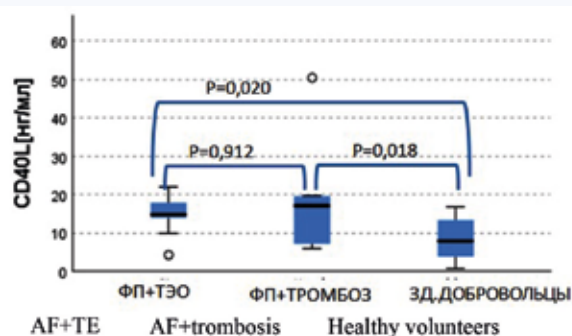


Рис. 1. Сравнение концентраций растворимого CD 40 лиганда в зависимости от наличия у пациентов с фибрилляцией предсердий тромбозомболических осложнений в анамнезе, новых тромботических осложнений или отсутствия патологии (здоровые добровольцы)

Примечание: ФП – фибрилляция предсердий, ТЭО – тромбозомболическими осложнениями.
Fig. 1. Comparison of soluble CD 40 ligand concentrations depending on the presence of a history of thromboembolism in patients with AF, new thrombotic complications, or the absence of pathology (healthy volunteers)
Note: AF – atrial fibrillation, TEC – thromboembolic complications.

В ходе корреляционного анализа ни в общей выборке больных, ни в каждой группе по отдельности не было выявлено связи показателей спонтанной и стимулированной агрегации и концентрации CD40 и лиганда CD40.

Обсуждение

Наиболее грозным осложнением ФП является тромбоэмболический синдром, развивающийся приблизительно в 8–15% случаев [6]. В исследовании M. Makowski и соавт. достижение синусового ритма само по себе приводило к снижению реактивности тромбоцитов [7]. И, наоборот, развитие пароксизма ФП в другом исследовании явилось самостоятельным пусковым механизмом гиперкоагуляции, что подтверждалось различиями в реактивности тромбоцитов у пациентов с устойчивым синусовым ритмом после кардиоверсии и наличием рецидивов ФП [8].

Спонтанная агрегация тромбоцитов является одним из независимых прогностических факторов риска разви-

тия тромбозов и тромбоэмболий различных локализаций и имеет особое значение. Циркуляция в кровотоке избытка агрегатов тромбоцитов приводит к целому ряду изменений, прежде всего в мелких сосудах. Механизмы активации тромбоцитов зависят от многочисленных факторов: воздействий сил сдвига, изменения состава плазмы, экспрессии ряда поверхностных рецепторов, увеличения или снижения спонтанной агрегации, циркулирующих биологически активных веществ, лекарственной терапии [9], которые влияют на соотношение внеклеточных сигналов, активирующих и ингибирующих активность клеток.

В нашем исследовании отмечено повышение спонтанного агрегационного потенциала у пациентов в обеих группах с ФП по сравнению со здоровыми добровольцами, при этом наибольшее увеличение функционального ответа наблюдается у пациентов с выявленными тромбозами за период обследования.

АДФ-индуцированная активация тромбоцитов доказано влияет на исход ишемического инсульта, связанного с ФП [10]. Исследование АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов с убывающей концентрацией индуктора позволяет оценить основные этапы агрегации тромбоцитов, характеризующих их чувствительность и активность: фазу индуцированной агрегации, фазу высвобождения и фазу дезагрегации. Физиологический индуктор агрегации АДФ, взаимодействуя с рецепторами, приводит к изменению формы тромбоцита, агрегации, образованию тромбоксана A₂, изменению прокоагулянтной активности, адгезии к фибриногену и формированию тромба в условиях напряжения сдвига, потенцированию активации тромбоцитов при участии агонистов фактора фон Виллебранда и тромбоксана A₂. Наиболее выраженное снижение агрегации в ответ на действие индуктора агрегации АДФ продемонстрировано в обеих группах пациентов с ФП как с ТЭО в анамнезе, так и с действующими тромбозами. Полученные нами результаты могут свидетельствовать о повышенной чувствительности тромбоцитов к АДФ, что приводит к инициации выброса содержимого альфа гранул *in vivo* и снижению агрегации в ответ на действие экзогенного АДФ.

Одним из механизмов активации агрегационной активности тромбоцитов при ФП является катехоламиновое влияние на адгезию и агрегацию клеток. Подавляющее большинство больных в нашем исследовании получают препараты, имеющие бета-адреноблокирующий эффект, либо с целью контроля ритма (соталол, амиодарон), либо с целью контроля частоты сердечных сокращений (бло-

каторы кальциевых каналов, бета-адреноблокаторы). Реализация бета-адреноблокирующего эффекта происходит через устранение катехоламинового повреждения эндотелия с увеличением содержания оксида азота [11], а также через устранение непосредственных влияний катехоламинов на рецепторы тромбоцитов с реализацией антиагрегантного эффекта [12]. Данные суждения могут объяснить подавление агрегационной активности тромбоцитов при индукции адреналином в нашем исследовании.

Тромбоциты являются метаболически активными клетками, продуцирующими большое количество различных провоспалительных и протромбогенных медиаторов. Система CD40/CD40L связана как с протромботическими, так и с провоспалительными эффектами. Мембраносвязанная форма CD40L высоко экспрессируется в основном активированными тромбоцитами, поэтому растворимую форму лиганда CD40 рассматривают как маркер активации тромбоцитов и патологических процессов, связанных именно с повышением активности системы тромбообразования. В нашем исследовании отмечено повышение концентрации растворимого CD40 лиганда у пациентов с тромботическими осложнениями и ТЭО в анамнезе.

Возможности антикоагулянтов в реализации профилактики ТЭО продемонстрированы многократно. Вместе с тем в сравнении с плацебо и антиагреганты продемонстрировали эффективность в профилактике ТЭО [13]. Метаанализ шести основных рандомизированных исследований показал убедительные возможности аспирина в снижении риска инсульта в сравнении с плацебо (на 22%) как в первичной, так и во вторичной профилактике с вариабельностью дозы от 50 до 1200 мг/день [14]. Возможности комбинированной антитромбоцитарной терапии в снижении риска сосудистых событий в исследовании NASPEAF превосходили таковые при монотерапии антикоагулянтами [15]. Важно, что приведенные исследования были направлены на анализ риска возникновения конечной точки (инсульт), и не учитывали частоту разви-

тия тромбозов как таковых, что фактически не отражает полную картину фармакологических эффектов антитромбоцитарной терапии.

Полученные нами результаты полного исследования агрегации тромбоцитов позволяют подвести следующий итог: во-первых, у пациентов в группе с имеющимися тромбозами и группе с анамнезом ТЭО выявляются изменения показателей в виде увеличения спонтанной агрегации; во-вторых, отмечается снижение стимулированной агрегации, АДФ и адреналином агрегации у пациентов с ФП в обеих группах; в третьих, у пациентов с тромботическими осложнениями и ТЭО в анамнезе отмечено увеличение биомаркера тромбообразования – растворимого CD40L. Важно, что оцениваемые параметры не поддаются в полной мере коррекции антикоагулянтами, что сохраняет потенциально высокий риск протромбогенного статуса пациентов, в частности, в группах лиц с высоким баллом по шкале ТЭО. Согласно полученным результатам, очевидно, что разработка перечня дополнительных маркеров, которыми должны служить и показатели агрегационной способности тромбоцитов, позволит повысить надежность стратификации риска тромботических осложнений и ТЭО у пациентов с ФП и персонализировано подойти к выбору терапии, а в отдельных случаях рассмотреть комбинацию антикоагулянтной и антиагрегантной терапии.

Заключение

Спонтанная агрегационная способность тромбоцитов увеличена как у пациентов с перенесенными ТЭО, так и у пациентов с вновь диагностированными тромбозами на фоне «неклапанной» ФП. Различий в степени агрегации тромбоцитов между группами с ранее перенесенными ТЭО и вновь выявленными тромбозами не выявлено, при этом показатели стимулированной агрегации тромбоцитов у пациентов с перенесенными ТЭО и диагностированными тромбозами на фоне «неклапанной» ФП значимо ниже таковых в группе контроля.

Литература / References

- January C.T., Wann S., Alpert J.S., Calkins H., Cigarroa J.E., Cleveland J.C.Jr. et al. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for management of patients with atrial fibrillation: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2014;130(23):2071–2104. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000040.
- Соколова А.А., Кудрявцева А.А., Костокова Н.В., Заикина М.П., Гебекова З.А., Напалков Д.А. и др. Риск венозных тромбоэмболических осложнений у больных мерцательной аритмией: систематический обзор и метаанализ. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2022;18(3):236–241. Sokolova A.A., Kudriavtseva A.A., Kostokova N.V., Zaikina M.P., Gebekova Z.A., Napalkov D.A. et al. Risk of Venous Thromboembolic Complications in Patients with Atrial Fibrillation: a Systematic Review and Meta-analysis. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2022;18(3):236–241. (In Russ., in Eng.). DOI: 10.20996/1819-6446-2022-06-02.
- Feng D., D'Agostino R.B., Silberschatz H., Lipinska I., Massaro J., Levy D. et al. Hemostatic state and atrial fibrillation (The Framingham Offspring Study). *Am. J. Cardiol*. 2001;87(2):168–171. DOI: 10.1016/S0002-9149(00)01310-2.
- Lip G.Y. The prothrombotic state in atrial fibrillation: new insights, more questions, and clear answers needed. *Am. Heart J*. 2000;140:348–350. DOI: 10.1067/mhj.2000.108521.
- Li-Saw-Hee F.L., Blann A.D., Lip G.Y. Effects of fixed low-dose warfarin, aspirin-warfarin combination therapy, and dose-adjusted warfarin on thrombogenesis in chronic atrial fibrillation. *Stroke*. 2000;31(4):828–833. DOI: 10.1161/01.str.31.4.828.
- Lloyd-Jones D., Adams R.J., Brown T.M., Carnethon M., Dai S., De Simone G. et al. Heart disease and stroke statistics – 2010 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2010;121(7):e46–e215. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192667.
- Makowski M., Smorag I., Makowska J., Bissinger A., Grycewicz T., Paśnik J. et al. Platelet reactivity and mean platelet volume as risk markers of thrombogenesis in atrial fibrillation. *Int. J. Cardiol*. 2017;235:1–5. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.03.023.
- Akar J.G., Jeske W., Wilber D.J. Acute onset human atrial fibrillation is associated with local cardiac platelet activation and endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2008;51(18):1790–1793. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.11.083.
- Огуркова О.Н., Суслова Т.Е., Баталов Р.Е. Исследование спонтанной и стимулированной агрегации тромбоцитов у пациентов с разными типами фибрилляции предсердий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66(1):35–41. Ogurkova O.N., Suslova T.E., Batalov R.E. The study of spontaneous and stimulated platelet aggregation in patients with different types of atrial fibrillation. *Klin. Lab. Diagn*. 2021;66(1):35–41. (In Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2021-66-1-35-41.
- Choi J.H., Cha J.K., Huh J.T. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation might contribute to poor outcomes in atrial fibrillation-related ischemic stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis*. 2014;23(3):e215–e220. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.10.011.
- Minamoto T., Kitakaze M., Sato H., Asanuma H., Funaya H., Koretsune Y. et al. Plasma levels of nitrite/nitrate and platelet cGMP levels are decreased in patients with atrial fibrillation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1997;17(11):3191–3195. DOI: 10.1161/01.atv.17.11.3191.
- Закирова А.Н., Зарудий Ф.С., Гарифуллин Б.Н. Бета-адреноблокаторы и агрегация тромбоцитов. *Карведилол. Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2008;4(2):81–84. Zakirova A.N., Zarudiy F.S., Garifullin B.N. Beta-adrenoblockers and

platelet aggregation. Carvedilol. *Rational. Pharmacotherapy in Cardiology*. 2008;4(2):81–84. (In Russ.). DOI: 10.20996/1819-6446-2008-4-2-81-84.

13. Hart R.G., Halperin J.L. Atrial fibrillation and stroke: concepts and controversies. *Stroke*. 2001;32(3):803–808. DOI: 10.1161/01.str.32.3.803.
14. Hart R.G., Benavente O., McBride R., Pearce L.A. Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis.

Информация о вкладе авторов

Ситкова Е.С. – набор клинического материала, ведение и анализ базы данных, написание статьи.

Драгунова М.А. – набор клинического материала, ведение и анализ базы данных.

Огуркова О.Н. – лабораторный анализ материала, ведение базы данных.

Сморгон А.В. – выполнение ультразвуковых методик исследования.

Московских Т.В. – подготовка и редакция статьи по требованиям, документации для журнала.

Баталов Р.Е. – утверждение концепции и дизайна исследования.

Суслова Т.Е. – утверждение статьи и консультирование по лабораторным показателям.

Сведения об авторах

Ситкова Екатерина Сергеевна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, лаборатория высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-0988-3642.

E-mail: chekrzhova@mail.ru.

Драгунова Марина Александровна, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-7264-9904.

E-mail: kirsay@yandex.ru.

Огуркова Оксана Николаевна, канд. мед. наук, научный сотрудник, отделение клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-8397-0296.

E-mail: oon@cardio-tomsk.ru.

Сморгон Андрей Владимирович, младший научный сотрудник, лаборатория функциональной и ультразвуковой диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-6531-7223.

E-mail: sav@cardio-tomsk.ru.

Московских Татьяна Валерьевна, младший научный сотрудник, лаборатория высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-8689-8493.

E-mail: moskovskih_tanya@mail.ru.

Баталов Роман Ефимович, д-р мед. наук, руководитель лаборатории высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-1415-3932.

E-mail: romancer@cardio-tomsk.ru.

Суслова Татьяна Евгеньевна, канд. мед. наук, заведующий отделением клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-9645-6720.

E-mail: tes@cardio-tomsk.ru.

Ситкова Екатерина Сергеевна, e-mail: chekrzhova@mail.ru.

Ann Intern Med 1999;131(7):492–501. DOI: 10.7326/0003-4819-131-7-199910050-00003.

15. Pérez-Gómez F., Alegría E., Berjón J., Iriarte J.A., Zumalde J. et al.; NASPEAF Investigators. Comparative effects of antiplatelet, anticoagulant, or combined therapy in patients with valvular and nonvalvular atrial fibrillation: a randomized multicenter study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004;44(8):1557–1566. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.05.084.

Information on author contributions

Sitkova E.S. – clinical material collection, database maintenance and analysis, article writing.

Dragunova M.A. – clinical material collection, database maintenance and analysis.

Ogurkova O.N. – laboratory material collection, database maintenance and analysis.

Smorgon A.V. – performing ultrasound research techniques.

Moskovskikh T.V. – preparation and editing of articles according to requirements, documentation for the journal.

Batalov R.E. – approval of the study concept and design.

Suslova T.E. – approval of the article and consultation on laboratory parameters.

Information about the authors

Ekaterina S. Sitkova, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Laboratory of High Technology of Diagnostic and Treatment of Heart Arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia. ORCID 0000-0002-0988-3642.

E-mail: chekrzhova@mail.ru.

Marina A. Dragunova, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Laboratory of Diagnostic and Treatment of Heart Arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia. ORCID 0000-0002-7264-9904.

E-mail: kirsay@yandex.ru.

Oksana N. Ogurkova, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Department of Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia. ORCID 0000-0001-8397-0296.

E-mail: oon@cardio-tomsk.ru.

Andrey V. Smorgon, Junior Research Scientist, Laboratory of Functional and Ultrasound Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia. ORCID 0000-0002-6531-7223.

E-mail: sav@cardio-tomsk.ru.

Tatiana V. Moskovskikh, Junior Research Scientist, Laboratory of High Technology of Diagnostic and Treatment of Heart Arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia. ORCID 0000-0002-8689-8493.

E-mail: moskovskih_tanya@mail.ru.

Roman E. Batalov, Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of High Technology of Diagnostic and Treatment of Heart Arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia. ORCID 0000-0003-1415-3932.

E-mail: romancer@cardio-tomsk.ru.

Tatiana E. Suslova, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia. ORCID 0000-0001-9645-6720.

E-mail: tes@cardio-tomsk.ru.

Ekaterina S. Sitkova, e-mail: chekrzhova@mail.ru.

Received October 12, 2023

Поступила 12.10.2023