



Лабораторные методы оценки функциональной активности тромбоцитов и их клиническое значение

Тромбоциты – это небольшие по размеру безъядерные структуры, образующиеся из мегакариоцитов костного мозга. Функциональная роль тромбоцитов в организме человека очень разнообразна. Так, тромбоциты участвуют в защите организма-хозяина от вирусов и бактерий, транспорте веществ, регуляции сосудистого тонуса, росте, метастазировании и уничтожении раковых клеток, в ангиогенезе и ремоделировании сосудов и др. Основной же функцией тромбоцитов является участие в свертывании крови (гемостазе) – процессе, предотвращающем кровопотерю при повреждении кровеносного сосуда.

Актуальность нарушений гемостаза обусловлена не столько их широкой распространенностью, сколько потенциально высокой опасностью для жизни человека. В настоящее время насчитывается около 200 дефектов системы гемостаза, при этом у 50 млн человек в мире они имеют первичный характер (2/3 случаев – изменения со стороны тромбоцитарного звена).

История открытия и изучения тромбоцитов

Первые сведения о тромбоцитах в научной литературе появились более 150 лет назад. Порой высказывались достаточно курьезные предположения относительно того, что тромбоциты образуются из лейкоцитов, при распаде лимфоцитов, в результате синтеза бактериями, как производные фибрина, а также представляют собой артефакт, наблюдаемый *in vitro* (табл. 1).

В процессе многолетних исследований функций тромбоцитов было показано, что они играют существенную роль в таких важных для организма процессах, как первичный гемостаз, регуляция сосудистого тонуса, воспаление, реализуют защитное влияние и др. (рис. 1).



Рис.1. Основные функции тромбоцитов в организме человека

Согласно современным представлениям тромбоциты образуются в результате мегакариопоэза, происходящего в костном мозге. В процессе созревания мегакариоцит проходит 3 стадии: мегакариобласт, промегакариоцит и мегакариоцит. Количество соотношение этих клеток выражается как 10:15:75 (в процентах от всей популяции). Процесс дифференцировки мегакариоцитарных элементов продолжается 25 ч (рис. 2).

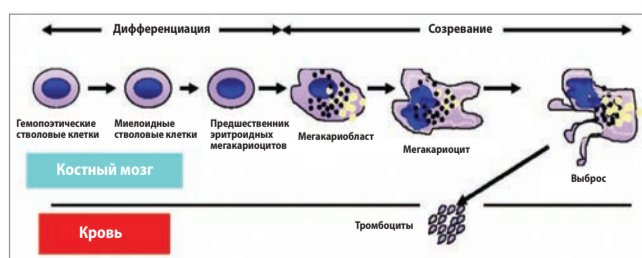


Рис. 2. Жизненный цикл тромбоцитов

В крови здоровых людей большинство циркулирующих тромбоцитов имеют характерную дисковидную

форму, диаметр 2–4 мкм, толщину до 1,0 мкм и средний объем 6–9 мкм³.

При этом 2/3 тромбоцитов циркулируют в крови, около 1/3 находится в селезенке. Средняя продолжительность жизни тромбоцитов составляет 10 сут. Количество тромбоцитов в норме – 180–350x10⁹/л.

Поверхностная мембрана тромбоцита имеет сложную структуру. Ее наружный слой – гликокаликс, богатый гликопротеинами. В пространствах многослойной мембраны расположены микротрубочки, формирующие цитоскелет тромбоцита. Кроме плотной микротубулярной системы цитоскелет тромбоцитов образуют нити актина, спектрина и других протеинов, связанные с мембраной и пронизывающие тромбоцит во всех направлениях. В цитоплазме тромбоцитов расположены митохондрии, гликоген, лизосомы, пероксисомы и гранулы, содержащие различные вещества.

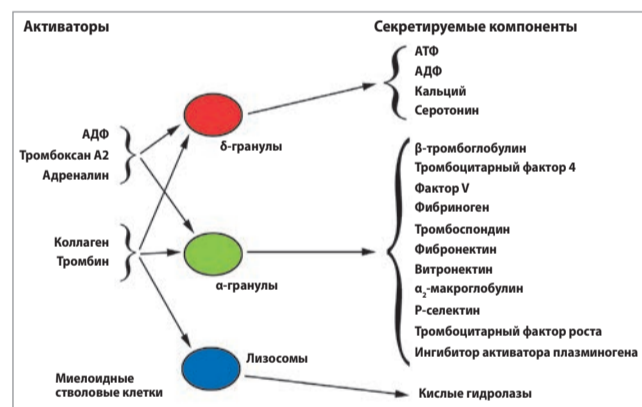


Рис. 3. Три вида гранул хранения в тромбоцитах (α-гранулы, δ-гранулы и лизосомы)

В тромбоцитах выделяют 3 вида органелл хранения: α-гранулы, плотные гранулы (δ-гранулы) и лизосомы (γ-гранулы). В α-гранулах содержится около 30 различных белков, большинство из которых были синтезированы еще в мегакариоцитах. В плотных гранулах (δ-гранулы) накапливаются субстанции, вызывающие сосудистые реакции и агрегацию тромбоцитов. Лизосомы (γ-гранулы) включают гидролазы – пероксидазу, тромбоцитарную гепариназу, галактозидазу, эндогликозидазу, кислую фосфатазу и др. (рис. 3).

Участие тромбоцитов в гемостазе требует активного взаимодействия с другими клетками, плазменными белками и небелковыми веществами. Роль посредника между тромбоцитом и различными факторами внешней среды, в том числе компонентами процесса гемостаза, играют рецепторы тромбоцитов. На мембране тромбоцитов человека выявлено около 30 участков рецепторного связывания биологически активных соединений разнообразной химической природы.

Тромбоциты играют ведущую роль в запуске процесса образования тромба. Активация тромбоцитов в циркулирующей крови приводит к изменению их формы из дисковидной в сферообразную (активированные клетки с повышенной способностью к адгезии, образованию агрегатов и секреции биологически активных соединений, которые непосредственно участвуют или влияют на гемостаз). Исследование способности тромбоцитов к активации, их структурных и функциональных изменений является важной задачей. Понимание механизмов, лежащих в их основе, расширяет возможности профилактики и коррекции нарушений в системе гемостаза, не только отягчающих течение заболевания, но нередко определяющих его исход.

Активация тромбоцитов обычно начинается в результате воздействия на плазматическую мембрану многообразных внешних стимулов и представляет собой процесс быстрого перехода из интактного в активированное состояние. Таким стимулирующим эффектом обладают нуклеотиды (АДФ), амины (адреналин, серотонин и др.), белки (тромбин, коллаген), арахидоновая кислота и ее производные (тромбоксан А2, простагландины), липиды (фактор

Таблица 1. История открытия и изучения тромбоцитов

1842 г.	Французский врач-терапевт Albert Donne описал т.н. глобулярные массы в крови. Первоначально эти форменные элементы предлагали называть амебозитами, элементарными частицами или телами, гематобластами, плазмоцитами, тромбопластидами, пластинками, третьими корпускулами.
1842 г.	Британский врач George Gulliver впервые опубликовал рисунок тромбоцита, но не связал эти частицы с фибрином.
1842 г.	William Addison из Великобритании в своей публикации отметил, что наблюдал «большое количество чрезвычайно мелких частиц или гранул различного размера, крупнейшая из которых по крайней мере в восемь или десять раз меньше, чем бесцветные тельца».
1865 г.	Врач-анатом из Германии Max Schultze впервые опубликовал точные и убедительные описания тромбоцитов в журнале Archiv für mikroskopische Anatomie. Это была часть исследования, посвященного главным образом изучению лейкоцитов. Он описал «шарики», которые гораздо меньше, чем эритроциты, и способны образовывать скопления, а также участвовать в синтезе волокнистого материала. Он признал их нормальным компонентом крови и с энтузиазмом рекомендовал продолжить изучение «тем, кто занимается углубленным исследованием крови человека».
1877 г.	Испытания французского врача Georges Hayem позволили установить, что тромбоциты являются отдельными клеточными частицами и задействованы в процессе свертывания. Ученый высказал предположение об образовании тромбоцитов из эритроцитов.
1880 г.	В.П. Образцов озвучил гипотезу относительно образования кровяных пластинок из гигантских клеток костного мозга.
1882 г.	Итальянский врач-патолог Giulio Bizzozzero осуществил всеобъемлющее исследование и опубликовал монографию Plattchen, в которой описал «шарики», обнаруживаемые при помощи микроскопа в циркулирующей крови живых животных и в интактной крови человека. В серии экспериментов он показал, что эти «шарики» являются компонентами крови, первыми участвующими в восстановлении поврежденных стенок кровеносных сосудов в естественных условиях, и дал им название «кровяные пластинки».
1901 г.	М. Dekhuysen впервые был предложен термин «тромбоциты».
1906 г.	G. Wright показал, что тромбоциты происходят из мегакариоцитов костного мозга. В дальнейшем было обнаружено присутствие мегакариоцитов в легких, селезенке и печени.
1915 г.	E. Frank предположил, что в основе тромбоцитопении лежит нарушение созревания мегакариоцитов под влиянием какого-то фактора, предположительно синтезирующегося в селезенке.
1916 г.	P. Kaznelson допустил, что при тромбоцитопенической пурпуре имеет место усиленное разрушение тромбоцитов в селезенке.
1946 г.	W. Dameshich и E. Miller установили, что количество мегакариоцитов при тромбоцитопенической пурпуре не уменьшено, а даже увеличено. Они предположили, что нарушается отщепление тромбоцитов от мегакариоцитов.

активации тромбоцитов) и другие соединения. Большинство из них действуют как лиганды, специфически связываясь с поверхностно ориентированными белковыми структурами плазматической мембраны. В основе отдельных этапов активации лежат такие процессы, как структурно-функциональная перестройка мембраны, мобилизация и движение ионов, гидролиз фосфоинозитидов, высвобождение и окисление арахидоновой кислоты, фосфорилирование белков, повышение энергетического метаболизма, сокращение белков цитоскелета, изменение метаболизма циклических нуклеотидов. Именно благодаря способности тромбоцитов к активации реализуется их функциональное предназначение в организме.

Методы исследования функций тромбоцитов

В настоящее время в мировой практике широко используются следующие методы исследования функций тромбоцитов (табл. 2).

Время кровотечения

Время кровотечения (ВК) впервые было описано Дьюке в 1910 г. и относится к старейшим методам исследования первичного звена гемостаза. Данный тест до начала 1990-х гг. рассматривался как наиболее перспективный для изучения функции тромбоцитов.

ВК — это время от момента нанесения стандартной раны на кожу до момента прекращения вытекания крови.

ВК характеризует функциональную активность тромбоцитов и их взаимодействие с сосудистой стенкой. Этот скрининговый метод позволяет заподозрить тромбоцитопатии различного генеза, болезнь Виллебранда и нарушение проагрегантных свойств сосудистой стенки.

Недостатки оценки ВК:

- метод плохо стандартизуется;
- результаты теста позволяют лишь предположить наличие тех или иных нарушений;
- низкая чувствительность (отсутствие удлинения времени кровотечения не всегда позволяет исключить нарушения функции тромбоцитов или сосудистого звена гемостаза);
- низкая специфичность, не позволяющая однозначно интерпретировать результаты метода;
- не соответствует современным санитарно-эпидемиологическим требованиям;
- ВК может быть не связано с системой гемостаза и зависит от индивидуальных параметров (возраст, пол, гематокрит, толщина и температура кожи).

По этим причинам Британский комитет по стандартам в гематологии (British Committee for Standards in Haematology) не рекомендует использовать данный тест для исследования функциональной активности тромбоцитов.

Световая трансмиссионная агрегометрия

На смену методу определения ВК пришла методика под названием «агрегометрия», которая позволяет оценивать агрегационную способность тромбоцитов *in vitro*. В основе метода лежит возможность под действием специальных индукторов экспрессировать на своей поверхности специфические рецепторы, приводящие к образованию клеточных агрегатов.

Классическая световая трансмиссионная агрегометрия (LTA — light-transmission aggregometry), предложенная Густавом фон Борном в 1962 г., по-прежнему рассматривается многими исследователями как золотой стандарт для анализа функции тромбоцитов.

На рынке медицинской техники представлено большое количество различных агрегометров, однако вследствие использования разных протоколов и индукторов агрегации есть трудности в согласовании получаемых результатов. Стандартизованного параметра, по которому можно было бы однозначно судить о гиперактивности тромбоцитов и степени ее изменения на фоне приема антиагрегантных препаратов, в настоящее время не существует.

Принцип метода LTA состоит в том, что в обогащенную тромбоцитами плазму добавляют индуктор агрегации. Если происходит агрегация тромбоцитов, степень прохождения света через плазму возрастает, т.к. образуются тромбоцитарные агрегаты.

Индукторы агрегации условно можно разделить на 2 группы:

1. Слабые индукторы (АДФ в низких концентрациях, адреналин, вазопрессин, серотонин).
2. Сильные индукторы (коллаген, тромбин, высокие дозы АДФ, тромбоксан А2, фактор активации тромбоцитов).

Тромбоцитарный ответ условно разделяют на 3 типа.

1. Обратимый ответ, включающий первые три стадии активации. Он реализуется при действии слабых агонистов. В этом случае полная активация не обеспечивается, тромбоцитарный агрегат распадается, тромбоциты могут вернуться в свое первоначальное дисковидное состояние.
2. Необратимая агрегация тромбоцитов наблюдается при действии сильных агонистов, при этом происходит выброс содержимого α -гранул и плотных гранул.
3. Реакция дезагрегации, индуцируемая антагонистами.

Пример типичных агрегационных кривых, полученных с помощью разных индукторов агрегации, приведен на рисунке 4.

Проведение анализа на агрегометрах. Следует учитывать, что у агрегометров разный принцип работы, поэтому получаемые агрегатограммы отличаются,

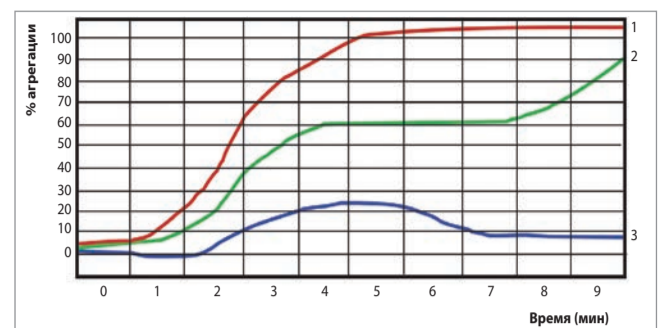


Рис. 4. Примеры агрегационных кривых:
1 – 10 мкМ АДФ: нормальный ответ, агрегация >60%;
2 – 5 мкМ АДФ: нормальный ответ, типичная бифазная кривая;
3 – 10 мкМ АДФ: патология, агрегация <60%.

а число определяемых параметров агрегации неодинаково.

Интерпретация. Агрегация тромбоцитов — двухступенчатый процесс. Первичная волна агрегации — склеивание тромбоцитов в присутствии внешних агонистов, таких как АДФ, адреналин или ристоцетин.

Вторичная агрегация происходит после стимуляции тромбоцитов веществами, содержащимися в их органеллах (рис. 5).



Рис. 5. Двухфазная волна агрегации

Необходимо отметить, что одни агонисты стимулируют первичную волну агрегации, другие — вторичную. Кроме того, различные концентрации агониста могут давать первичную и вторичную волны агрегации. Например, высокие концентрации АДФ (10 мкг/мл в конечной концентрации) индуцируют одну широкую волну агрегации. Низкие концентрации АДФ вызывают двухфазную агрегацию (т.е. первичную и вторичную волну агрегации), а очень низкие концентрации АДФ (1,5 мкг/мл в конечной концентрации) вызывают первичную волну с последующей дезагрегацией. Двухфазный ответ на АДФ не будет наблюдаться у пациентов с нарушенными функциями тромбоцитов. У пациентов с тромбастенией Гланцмана не наблюдается агрегации независимо от концентрации АДФ. У пациентов с тяжелой болезнью Виллебранда агрегация с ристоцетином отсутствует. Коррекцию нарушенной агрегации ристоцетином можно наблюдать при добавлении нормальной, обогащенной тромбоцитами плазмы. Патологическая агрегация с ристоцетином наблюдается у пациентов с синдромом Бернара-Сулье, идиопатической тромбоцитопенической пурпурой, дефектами тромбоцитов (рис. 6).

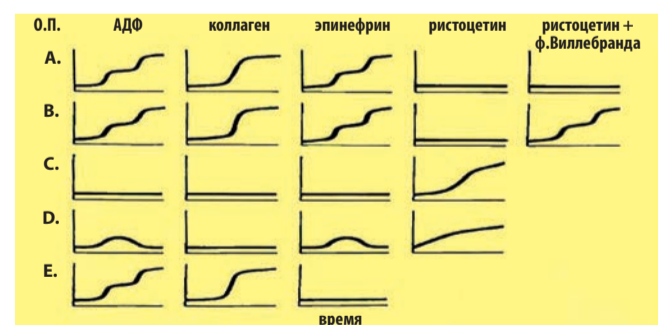


Рис. 6. Агрегатограммы тромбоцитов при различных заболеваниях:
А — болезнь Бернара-Сулье; В — болезнь Виллебранда;
С — тромбастения Гланцмана; D — болезни недостаточности пула хранения; E — синдром серых тромбоцитов

Недостатками данного вида агрегометрии являются необходимость лабораторного оборудования и специально обученного медицинского персонала, трудоемкость и длительность исследования, высокая стоимость, что ограничивает рутинное его использование в клинической практике.

Продолжение следует.

Таблица 2. Методы исследования функции тромбоцитов		
Методы исследования функции тромбоцитов	Принцип метода	Применение метода
Время кровотечения	Время между началом и остановкой кровотечения	Скрининговый тест для диагностики <i>in vivo</i>
Световая трансмиссионная агрегометрия	Оптический метод с использованием различных индукторов агрегации	Скрининговый тест для оценки риска кровотечения, диагностика дефектов гликопротеинов тромбоцитов. Мониторинг ответа тромбоцитов на антиагрегантные агенты
Анализатор Multiplate®	Импедансная агрегометрия	Оценка ответа тромбоцитов на аспирин и клопидогрель
Анализатор VerifyNow	Метод, основанный на оптической детекции агглютинации тромбоцитов	Мониторинг ответа тромбоцитов на антиагрегантные агенты
Анализаторы ROTEM®/TEG® 5000	Измерение физических свойств (в т. ч. прочности) сгустка	Глобальная оценка гемостаза. Диагностика и лечение нарушений функции тромбоцитов
Анализаторы PFA-100/INNOVANCE PFA-200	Оценка <i>in vitro</i> прохождения цельной крови в специальном картридже	Риск кровотечения, тромбоцитарный риск, действие лекарственных препаратов
Анализатор IMPACT	Принцип работы основан на имитации движущейся крови под воздействием силы напряжения	Скрининг первичной патологии гемостаза
Метод Plateletworks®	Измерение количества тромбоцитов цельной крови до и после добавления индуктора активации	Мониторинг ответа тромбоцитов на антиагрегантные агенты
Проточная цитометрия	Флуоресценция меченых тромбоцитов в потоке жидкости	Исследование функции тромбоцитов с использованием CD41/61, CD42, CD62P и др.
Метод ELISA	Ферментсвязывающий иммуносорбентный анализ	Измерение β -тромбоглобулина, тромбоцитарного фактора 4, растворимого Р-селектина, тромбоксанов и др.



А.А. Мельник, к.б.н., г. Киев

Лабораторные методы оценки функциональной активности тромбоцитов и их клиническое значение

Продолжение. Начало в № 3.

Анализатор Multiplate®

Multiplate® – полуавтоматический мультиканальный анализатор функции тромбоцитов в цельной крови, уникальная разработка специалистов компании Verum Diagnostica GmbH (Германия) для контроля антитромбоцитарной терапии и предоперационного скрининга тромбоцитарной функции. Позволяет быстро, точно и просто выявить тромбоцитарные нарушения и оценить эффективность действия основных антиагрегантов (аспирин, клопидогрель, тиклопидин, прасугрель и антагонистов гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa). Анализатор был представлен на рынке Европы в 2005 г. и на сегодняшний день является наиболее востребованным агрегометром своего класса. В странах СНГ данный прибор был презентован в 2011 году и сразу же стал популярен среди специалистов различного профиля.

Измерение проводится в цельной крови т.н. импедансным методом, то есть в условиях, максимально приближенных к физиологическим. В отличие от оптического импедансного метода не чувствителен к цветовым показателям образца, позволяет изучать иктеричные и липемичные образцы.

Исследование проводится в одноразовых диспосистемах, имеющих специальное покрытие, предотвращающее спонтанную активацию тромбоцитов. В диспосистеме уже встроены две пары измерительных электродов и мешалка с тефлоновым покрытием. Благодаря наличию двух пар электродов каждый тест в образце проводится в дубли для повышения точности исследования. Агрегационная кривая и ее основные параметры рассчитываются автоматически.

Изменение сопротивления выражается в условных единицах, названных агрегационными – AU (aggregation unit). Повышение импеданса, возникающее в результате прикрепления тромбоцитов к сенсорам, выражается в виде условных агрегационных единиц (AU), соотношенных ко времени (min). Рассчитываются три параметра. Одним из основных является площадь под агрегационной кривой (area under curve – AUC). На этот показатель оказывают влияние высота кривой и степень ее наклона. Скорость агрегации – максимальный наклон кривой, степень агрегации – высота агрегационной кривой. На агрегатограмме регистрируются два графика (из двух независимых сенсоров тест-ячейки). Программа обрабатывает параметры и выдает среднее значение, регистрируемое с каждого сенсора. Величина AUC (площадь под кривой агрегации) является произведением двух переменных – AU x min (по оси

ординат (y) – агрегация, по оси абсцисс (x) – время агрегации, представленное в минутах). Переменная AUC может быть представлена в виде единиц (1 Unit = 1 U). Пересчет осуществляется следующим образом:

$$AUC \rightarrow 1 U = 10 AU \times \text{min.}$$

Исчерпывающую информацию, необходимую специалисту для назначения адекватной терапии, предоставляют ряд тестов (табл. 3).

Преимущества анализатора Multiplate®:

- новый стандарт выявления резистентности к антитромбоцитарным препаратам, возможность мониторинга и контроля терапии;
- высокая прогностическая значимость результатов (это упрощает выбор препарата для пациентов, перенесших инфаркт и интраваскулярные вмешательства, и средства для предотвращения кровотечений во время и после хирургических манипуляций);
- возможность работы непосредственно в оперативном блоке или у постели больного.

Анализатор VerifyNow®

Принцип работы анализатора VerifyNow® (Accumetrics, USA) основан на методе оптической трансмиссионной агрегометрии и определении величины прохождения света в зависимости от агрегации тромбоцитов.

Система измеряет скорость и степень изменения прохождения света в образцах цельной крови. В образцах, где агрегация тромбоцитов ингибирована, наблюдается низкая степень прохождения света, а образцы с нормально функционирующими тромбоцитами имеют высокую степень прохождения света.

Система VerifyNow® является быстрым, простым и проверенным методом для определения реактивности тромбоцитов на фоне применения антитромбоцитарной терапии (клопидогрель, прасугрель, тикагрелор, тиклопидин, аспирин, абциксимаб, эптифибатид).

Тесты, выполняемые на анализаторе VerifyNow® P2Y12-тест

Ингибиторы P2Y12 – клопидогрель, прасугрель и тикагрелор – блокируют P2Y12-рецепторы тромбоцитов, способствующие их агрегации (табл. 4).

Результат теста выражается в единицах PRU.

Reaction Units – единицы реактивности P2Y12. Показывают уровень АДФ-индуцированной агрегации, характерной для P2Y12-рецепторов тромбоцитов.

Базовый PRU (PRU до лечения) отражает уровень индуцированной агрегации, характерной для PAR-1- и PAR-4-рецепторов.

Процент изменения от исходного уровня агрегации, расчет разницы от результата PRU и базового

Таблица 4. Принцип P2Y12-теста, выполняемого на анализаторе VerifyNow

Цель теста	Оценка антиагрегантного влияния ингибиторов P2Y12 – клопидогреля, прасугреля и тиклопидина
Агонист	АДФ/пептид, активирующий тромбоцитарный рецептор
Единицы измерения	P2Y12 Reaction Units (PRU)
Время инкубации образца	От 10 мин
Время чтения результатов	Через 3 мин
Диапазон	Базовый уровень (без содержания лекарства в крови) 212-398 PRU. Процент клеточной ингибиции зависит от базового уровня агрегации

результата PRU, называют процентом ингибирования.

Пациенты с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов (ВОРТ) имеют больший риск развития ишемического события, включая смерть, инфаркт миокарда и тромбоз стента. В результате многочисленных исследований ВОРТ определена как PRU ≥230.

Риск достижения первичной конечной точки снижается примерно на 50% при PRU ≤208 (рис. 7).



Рис. 7. Взаимосвязь риска основных ишемических событий и показателя PRU

Тест VerifyNow Aspirin

Аспирин – наиболее часто назначаемый в мире антитромбоцитарный препарат – является основой пероральной антиагрегантной терапии и может использоваться в комбинации с ингибиторами P2Y12. Международные исследования показали, что у 25% популяции аспирин не снижает уровень реактивности тромбоцитов, следовательно, сохраняется высокий риск развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

Для оценки антиагрегантного действия аспирина в качестве агониста используется арахидоновая кислота (табл. 5).

Таблица 5. Принцип теста VerifyNow Aspirin

Цель теста	Определение антиагрегантного действия аспирина
Агонист	Арахидоновая кислота
Единицы измерения	Единицы реактивности на аспирин (ARU – Aspirin Reaction Units)
Время инкубации образца	От 30 мин
Время чтения результатов	Через 5 мин
Диапазон	Базовый уровень (без содержания лекарства в крови) 620-672 ARU Пациенты с неадекватным антитромбоцитарным эффектом: ≥550 ARU Пациенты с адекватным антитромбоцитарным эффектом: <550 ARU

Таблица 3. Тесты, используемые в анализаторе Multiplate®

TRAP	TRAP-6-активация рецепторов тромбина на поверхности тромбоцитов. Тромбин – мощный активатор тромбоцитов. Позволяет оценить влияние антагонистов гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa у пациентов, получающих аспирин или клопидогрель (действие тромбина не блокируется этими препаратами)
ASPI	Активация агрегации тромбоцитов арахидоновой кислотой, которая является субстратом для циклооксигеназы (ЦОГ). ЦОГ продуцирует тромбоксан A2 – мощный активатор тромбоцитов
АДФ	АДФ стимулирует активацию тромбоцитов через соответствующие рецепторы. Самым важным является рецептор P2Y12, который блокируется клопидогрелем, прасугрелем и тиклопидином
Высокочувствительный АДФ-тест	Добавление ингибитора простагландина E1 делает этот тест более чувствительным к клопидогрелю и другим препаратам с подобным механизмом действия по сравнению с АДФ-тестом
COL	Коллаген активирует рецепторы тромбоцитов, что сопровождается продукцией арахидоновой кислоты, тромбоксана A2 и активацией тромбоцитов
RISTO	Исследование GpIIb-зависимой агрегации и фактора Виллебранда

Интерпретация результатов. Показатель ARU указывает на количество тромбоксан А2-опосредованной активации и агрегации тромбоцитов. ARU рассчитывается в зависимости от скорости и степени агрегации тромбоцитов. Ожидаемые значения находятся в диапазоне 350-700 ARU. Условная граница терапевтического эффекта аспирина соответствует 550 ARU, т.е. значение ARU <550 у пациента, получающего аспирин, соответствует достигнутому терапевтическому эффекту.

Если после прекращения приема аспирина ARU <550, то это указывает на то, что тромбоциты еще ингибированы аспирином.

Тромбоэластографы ROTEM®/TEG® 5000

В настоящее время наиболее часто применяются два анализатора, использующие принцип ротационной тромбоэластометрии, – ROTEM® (Pentapharm, Германия) и TEG® 5000 (Haemonetics, США). Для выполнения анализа функциональной способности тромбоцитов требуется постановка 3 или 4 тестов (для изучения ответа тромбоцитов на один или два индуктора агрегации соответственно). Первая тромбоэластограмма (тест с каолином) дает информацию о максимальном свертывающем потенциале у пациента (совместная работа сосудистого и тромбоцитарного звеньев гемостаза). Вторая тромбоэластограмма выполняется с использованием крови, к которой добавлен гепарин (добавление гепарина подавляет тромбин – наиболее мощный индуктор агрегации тромбоцитов). К этой пробе непосредственно при постановке тромбоэластограммы добавляется активатор F (аналог рептилазы) – вещество, аналогично тромбину, превращает фибриноген в фибрин, не вызывая при этом агрегации тромбоцитов. При выполнении этой тромбоэластограммы образуется сгусток, состоящий только из фибриновой сети. Разница в максимальной амплитуде между 1-й и 2-й тромбоэластограммами – максимально возможный вклад тромбоцитов в образование сгустка. При постановке 3-й и 4-й тромбоэластограмм к крови с гепарином помимо активатора F добавляется, соответственно, АДФ или арахидоновая кислота. Таким образом, тест дает информацию о тромбоцитарно-фибриновом сгустке, где тромбоциты индуцированы к агрегации только АДФ или только арахидоновой кислотой. При сравнении 3-й и 4-й тромбоэластограмм с 1-й оценивают, насколько индуцирование агрегации через АДФ-рецептор или через цикл трансформации арахидоновой кислоты отличается от максимально возможного. После этого производится оценка степени блокады клопидогрелем АДФ-рецепторов или аспирином – превращения арахидоновой кислоты в тромбоксан А2. Компьютер автоматически рассчитывает процент ингибирования агрегации тромбоцитов.

PFA-100/INNOVANCE PFA-200

PFA-100 Siemens (Германия) – анализатор с системой картриджей, в котором процесс адгезии и агрегации тромбоцитов при повреждении сосудов моделируется *in vitro*. PFA-100 позволяет быстро оценить функцию тромбоцитов в маленьком количестве образца цельной крови с антикоагулянтом.

PFA-100 – это уникальный прибор для количественной оценки гемостатической функции тромбоцитов. Он позволяет наблюдать *in vitro* за процессом закупорки сосуда при моделировании этого

процесса в специальном картридже, оценивать функцию фактора Виллебранда, эффект аспирина и влияние на гемостатическую функцию тромбоцитов других веществ.

Одноразовый картридж PFA-100 состоит из ряда интегрированных частей, включающих капилляр, резервуар для образца и биохимически активную мембрану с центральной апертурой. Цельная кровь с антикоагулянтом аспирируется из резервуара для образца через капилляр и апертуру, что способствует быстрому потоку тромбоцитов. Мембрана покрыта коллагеном, который способствует агрегации тромбоцитов. Связывание тромбоцитов при действии коллагена осуществляется через триггер, индуцирующий физиологическую стимуляцию активности тромбоцитов.

Для диагностики *in vitro* используется несколько тестовых картриджей – PFA коллаген/эпинефрин, содержащий мембрану, покрытую 2 мкг коллагена I типа и 10 мкг эпинефрина битартрата, и PFA коллаген/АДФ, содержащий мембрану, покрытую 2 мкг коллагена I типа и 50 мкг АДФ.

Перед началом работы анализатора PFA-100 мембрану смачивают триггерным раствором. Во время проведения теста тромбоциты прилипают к мембране, покрытой коллагеном. Затем происходит процесс, похожий на агрегометрию: тромбоциты активируются, из их гранул высвобождаются физиологически активные соединения. Высвобождение содержимого гранул сопровождается адгезией тромбоцитов, что в конечном итоге приводит к агрегации и задержке течения крови.

PFA-100 – прибор, который определяет время от начала старта до момента образования тромбоцитарной пробки, закрывающей апертуру, что выражается в виде временного интервала. Closure time (СТ), или время закрытия, отражает функцию тромбоцитов при анализе образца цельной крови.

Ожидаемые значения для анализатора PFA-100 представлены в таблице 6.

Тип картриджа	Среднее (с)	Референтная область (с)
Коллаген/эпинефрин	124	85-165
Коллаген/АДФ	92	71-118

В новой модели INNOVANCE PFA-200 добавлен картридж P2Y.

Новые возможности анализатора INNOVANCE PFA-200 перечислены в таблице 7.

Анализатор IMPACT

IMPACT (Image Analysis Monitoring Platelet Adhesion Cone and Plate Technology, DiaMed, Швейцария) – автоматический анализатор для оценки функции тромбоцитов.

Метод основан на имитации движения крови под действием силы напряжения. Анализатор выполняет окрашивание и анализ изображения тромбоцитов, агрегированных на полистероновой поверхности под воздействием силы напряжения. Функция тромбоцитов оценивается по следующим параметрам: площадь, покрытая тромбоцитами, размер каждой частицы. Адгезию тромбоцитов характеризует гистограмма. Метод прост в исполнении, требует малого объема анализируемого образца крови (130 мкл), результат доступен уже через 6 мин.

Степень адгезии тромбоцитов к полистероновой поверхности зависит от влияния фактора Виллебранда, фибриногена, гликопротеиновых рецепторов Ib, IIb/IIIa и активации тромбоцитов. Не адгезируются к полистероновой поверхности тромбоциты у пациентов с тромбастенией Гланцмана или афибриногемией.

Результаты выражаются в процентах от поверхности, покрытой тромбоцитами, и как средний размер прилипающих частиц.

Данная технология используется в диагностике здоровых людей, у новорожденных (доношенных и недоношенных), у пациентов с сахарным диабетом, тромбоцитопенией, болезнью Виллебранда, тромбоцитопенической пурпурой, при тестировании тромбоцитов, которые хранятся в концентрированном виде.

Memog Plateletworks®

Разработан в Helena Laboratories (США) и представляет собой адаптацию агрегометрии тромбоцитов, которая исключительно проста, отличается невысокой стоимостью и быстротой исполнения (результаты доступны приблизительно через 5 мин). Двухступенчатый метод включает использование счетчика клеток (гематологического анализатора) для определения общего количества тромбоцитов в образце цельной крови, повторной оценке количества тромбоцитов по второй пробе, которую подвергают воздействию известного агониста тромбоцитов. Агонист стимулирует те тромбоциты, что являются функциональными, к агрегации в сгустки, они не учитываются в качестве тромбоцитов в рамках исследования второй пробы.

Разница количественного показателя тромбоцитов в первой и второй пробирках представляет собой прямой метод измерения агрегации тромбоцитов и выражается как процент агрегации:

% агрегации = исходное количество тромбоцитов – количество тромбоцитов с агонистом × 100

Диапазон нормальных значений Plateletworks®: 63-87% (агонист коллаген) 80-97% (агонист АДФ).

Проточная цитометрия

Метод проточной цитометрии – современная технология быстрой оптической оценки параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов – заключается в характеристике светорассеяния лазерного луча при прохождении через него клетки в струе жидкости. Степень световой дисперсии позволяет получить представление о размерах и структуре клетки. В ходе анализа учитывается уровень флуоресценции химических соединений, входящих в состав клетки или внесенных в образец перед проведением исследования. Методом проточной цитометрии можно изучать функцию тромбоцитов во взвеси отмытых тромбоцитов, в плазме, богатой тромбоцитами, и цельной крови. Определяют степень активации тромбоцитов, что позволяет оценить склонность к тромбозам. Оценку гиперактивности тромбоцитов методом проточной цитометрии проводят у пациентов с нестабильной стенокардией, острым инфарктом миокарда, преэклампсией, сахарным диабетом, инсультом, при плацентарной недостаточности. Данный метод позволяет выявить кандидатов на получение антиагрегантной терапии, а также упрощает выбор эффективного лекарственного средства. Кроме того, метод проточной цитометрии используется для оценки состояния хранящихся тромбоцитов в банках крови.

Метод ELISA

Метод ELISA используется для определения показателей активации тромбоцитов в плазме, таких как растворимый P-селектин, тромбоцитарный фактор 4, β-тромбомодулин и др.

На сегодняшний день оценка функциональной способности тромбоцитов осуществляется различными методами, имеющими как преимущества, так и определенные недостатки. Установить, какой из них является оптимальным, помогут дальнейшие научные и клинические исследования.

Определение	Картридж COL/EPI, время	Картридж COL/ADP, время	Картридж Innovance PFA P2Y, время
	Выявление врожденной, приобретенной или индуцированной лекарственными дисфункции тромбоцитов	↑	↑
Определение типа болезни Виллебранда (искл. тип 2N)	↑	↑	Не используется
Оценка эффективности терапии DDAVP	Норма	Норма	Не используется
Эффект АСК или АСК-подобные влияния	↑	Норма или умеренно увеличено	Минимальное увеличение
Определение эффекта ингибиторов рецепторов P2Y12	Норма	Норма	↑