

## **Методы исследования функциональной активности тромбоцитов (обзор литературы)**

Филиппова О.И.<sup>1</sup>, Колосков А.В.<sup>1,2</sup>, Столица А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «Городская больница № 26», Санкт-Петербург, Россия  
196247, Россия, Санкт-Петербург, ул. Костюшко д. 2, т. (812) 415-18-72  
*milidoctor@mail.ru*

<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова»  
Федеральный специализированный перинатальный центр  
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова д. 2, т. (812) 702-18-72  
*alexstolica@yandex.ru*

**Резюме.** Тромбоциты представляют собой безъядерные клетки крови, участвующие в различных процессах: регенерация поврежденных тканей, развитие воспалительных, иммунных и аллергических реакций. Однако их основная функция - обеспечение первичного гемостаза, важной защитной реакции, предотвращающей большую кровопотерю при повреждении сосудов. Существующие на сегодняшний день методы исследования позволяют изучить практически каждый этап участия тромбоцитов в процессе образования тромба. В диагностике нарушений тромбоцитарного звена гемостаза существенную помощь может оказать анализ состояния тромбоцитарных рецепторов, осуществляемый с помощью проточной цитометрии и электронной микроскопии. Оценка функционального состояния тромбоцитов является значимым методом исследования при подборе антиагрегантной терапии. В обзоре представлена характеристика наиболее часто используемых методов оценки функциональной активности тромбоцитов.

**Ключевые слова:** тромбоциты, рецепторы, гемостаз, агрегация

## Testing of platelet function (review)

Philippova O.I.<sup>1</sup>, Koloskov A.V.<sup>1,2</sup>, Stolitsa A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>City Hospital № 26, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Almazov Federal heart, blood and endocrinology centre

Federal specialized perinatal center, St. Petersburg, Russia

**Abstract.** Platelets a nuclear-free blood cells involved in the various process: regeneration of damaged tissues, the development of inflammatory, immune and allergic responses. However, their main function – providing primary hemostasis, an important protective response that prevents blood loss vascular lesions. Currently methods allow research each step in the process of participation of platelet clot formation. Diagnosis of platelet disorders requires platelet function testing, studies often aided by the quantitative analysis of receptors by flow cytometry and electron microscopy. Platelet function testing offers the potential to tailor antiplatelet therapy for individual patients. This review paper summarizes the key characteristics of platelet function tests available.

**Keywords:** platelets, receptors, hemostasis, aggregation

Тромбоциты представляют собой высоко специализированные безъядерные клетки крови, участвующие во многих процессах, протекающих в организме: в регенерации поврежденных тканей, развитии воспалительных, иммунных и аллергических реакций. Изучена их роль в метастазировании опухолей [1]. Однако их главная функция - обеспечение первичного гемостаза, важной защитной реакции, предотвращающей большую кровопотерю при повреждении сосудов. Тромбоцитарный гемостаз осуществляется посредством адгезии, набухания и образования отростков тромбоцитов, их агрегации и секреции, ретракции сгустка, спазма мелких сосудов и образования белого тромбоцитарного тромба в сосудах микроциркуляции. Участие тромбоцитов в гемостазе

определяется также ангиотрофической функцией и прокоагулянтными свойствами (в процессе активации отрицательно заряженные фосфолипиды перемещаются на внешнюю мембрану тромбоцитов и вовлекаются в каскад свертывания плазменных факторов).

Существующие на сегодняшний день методы исследования позволяют изучить почти каждый этап участия тромбоцитов в процессе тромбообразования. Исследование функциональной активности тромбоцитов актуально для определения причин различных видов кровоточивости и тромбозов, осуществления подбора специфических методов профилактики и лечения, предупреждения послеоперационных кровотечений и тромбоэмболий; решения проблем привычного невынашивания беременности при антифосфолипидном синдроме, тромбофилиях, коагулопатиях; контроля эффективности и безопасности терапии антиагрегатными препаратами. Развернутое исследование агрегационных функций тромбоцитов проводится для оценки сохранности тромбоцитов при выполнении плазм- и цитафереза, гемосорбции, использовании аппаратов искусственного кровообращения и гемодиализа, при хранении тромбоцитных трансфузионных сред [1-4].

Лабораторная диагностика нарушений в сосудисто - тромбоцитарного гемостаза начинается с изучения клинического анализа крови. Гемостаз характеризуют показатели: количество тромбоцитов, средний объем тромбоцитов (MPV), ширина распределения тромбоцитов, количественно характеризующая гетерогенность популяции клеток по размерам, т. е. степень анизоцитоза (PDW), средний тромбоцитарный компонент (MPC), коэффициент больших тромбоцитов (P-LCR), тромбоцитокрит (PCT, platelet crit). Отмечается связь размера тромбоцитов с их функциональной активностью. В результате активации тромбоцитов дискоидная форма тромбоцитов меняется на сферическую, появляются псевдоподии, что ведет к увеличению размеров клетки и степени анизоцитоза. В анализах наблюдается одновременно увеличение значений MPV, PDW [5]. Показатель MPC характеризует плотность и гранулярность тромбоцитов. При активации тромбоцитов происходит выброс содержимого гранул и значение MPC уменьшается. Этот показатель является признаком гиперактивности тромбоцитов и может использоваться в качестве предвестника острых ишемических осложнений, в том числе тромбозов [6].

К скрининговым тестам изучения функции тромбоцитов относится определение **времени кровотечения**. Впервые этот метод был описан Дьюке в 1910 году, затем усовершенствован Айви в 1941 году. Метод может расцениваться как самый старинный

способ исследования функции тромбоцитов и заключается в определении времени от момента нанесения стандартной раны на кожу до прекращения вытекания крови. Анализ позволяет заподозрить тромбоцитопатии различного генеза, болезнь Виллебранда и нарушения проагрегантных свойств сосудистой стенки.

У метода есть серьезные недостатки: инвазивный, зависит от опыта специалиста, проводящего исследование. На результат влияют возраст пациента, пол, гематокрит, температура, плотность кожного покрова, выраженность сосудистого рисунка. Отсутствие удлинения времени кровотечения не всегда позволяет исключить патологию гемостаза (при нарушениях средней степени выраженности и менее) [7]. В связи с этими недостатками и появлением более информативных методов, этот тест в клинической практике применяется все реже.

Среди многочисленных методов **определения адгезивности** тромбоцитов наибольшее распространение получил метод определения ретенции на стеклянных шариках (метод Salzman, 1963). Метод основан на подсчете числа тромбоцитов в венозной крови до и после ее пропускания с определенной скоростью через стандартную колонку со стеклянными шариками. Разница отражает степень адгезивности клеток. Для анализа берут свежую цитратную кровь. Исследование проводится в закрытой системе, так как соприкосновение крови с воздухом, особенно в условиях перемешивания, существенно искажает результаты.

Метод Баумгартнера более приближен к условиям *in vivo*. При этом кровь перфузируется через сегмент аорты, эндотелий которой частично поврежден катетером. Характер адгезии и агрегации на поврежденном участке оценивается визуально под световым или электронным микроскопом. Нормальные значения показателя адгезивности тромбоцитов составляют 20—50%. Диагностическое значение имеет резкое снижение (менее 10%), что связано с качественной неполноценностью тромбоцитов, либо с дефицитом в плазме фактора Виллебранда. Повышение адгезии наблюдается при атеросклерозе, склонности к тромбозам [1].

Общее ориентировочное представление об агрегационной способности тромбоцитов можно составить с помощью качественных методов, основанных на визуальном определении тромбоцитарных агрегатов, образующихся **в пробирке** (макроскопический метод) или **на предметном стекле** [8] при смешивании тромбоцитарной плазмы с различными стимуляторами агрегации. Исследование

агрегации на стекле или в пробирке менее чувствительно, чем с использованием агрегометра, однако быстро выполняется и используется для отбора пациентов с грубыми нарушениями тромбоцитарного гемостаза (выраженной тромбоцитопенией или тромбоцитопатией) в группу риска для профилактики, например, интра- и послеоперационных кровотечений. При визуальном методе исследования функции тромбоцитов отмечают момент от начала агрегации и ее интенсивность. Исследования выполняют при постоянном помешивании и поддержании постоянной температуры. В качестве стимуляторов агрегации тромбоцитов используют адреналин, АДФ в разных концентрациях, коллаген, тромбин, ристомицин.

**Электронная микроскопия** внесла весомый вклад в изучение и понимание биологии тромбоцитов, и в настоящее время используется в диагностике некоторых функциональных расстройств тромбоцитов. Трансмиссивная электронная микроскопия может обеспечить увеличение до  $10^5$  и разрешение 0,2 нм. Образцы для исследования требуют специальной обработки, в том числе фиксации. Этот метод позволяет изучать ультраструктуру тромбоцитов. К патологии тромбоцитов, выявляемых с помощью электронной микроскопии, относятся нарушения  $\alpha$ -гранул, например, синдром серых тромбоцитов; дефекты  $\delta$ -гранул, такие как болезнь недостаточного пула хранения, синдром Германски - Пудлака, синдром Чедиака - Хигаси; патология цитоскелета тромбоцитов, в том числе МУН9 связанная тромбоцитопения, и аномалии тромбоцитарной мембраны, как синдром Бернара - Сулье [9].

Электронная микроскопия позволяет выявить маркеры активации тромбоцитов, изучать процессы адгезии, агрегации, секреции и ретракции. Признаками активации клеток, выявляемыми под электронным микроскопом, являются изменение формы тромбоцитов, появление цитоплазматических отростков (псевдоподий). В распластанных тромбоцитах наблюдается сдвиг гранул к центру, в срезах пластинок - центрально сгруппированные гранулы, окруженные микротрубочками. Активация тромбоцитов приводит к интенсивному выбросу  $\alpha$ -гранул. Для определения функциональной активности изучают соотношение различных форм тромбоцитов, количество органелл, характер и число образующихся отростков. Форма псевдоподий может быть показателем фазы агрегации тромбоцитов. Об обратимой агрегации свидетельствуют короткие, округлые отростки, исчезающие через некоторое время. Для оценки спонтанной агрегации определяют число активированных тромбоцитов (с выбуханиями и отростками) и число

агрегатов. Также спонтанная агрегация изучается по убыли из крови тромбоцитов после оседания тромбоцитарных сгустков. В норме в агрегаты включается не более 10—15% тромбоцитов. В случае предрасположенности к тромбозам, тромбоэмболиях и синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания эти показатели нарастают. Электронно - микроскопический метод оценки изменения формы тромбоцитов, как показатель их внутрисосудистой активации является трудоемким в исполнении, не позволяет проводить кинетических исследований [9,10].

**Ретракция кровяного сгустка** — тест, характеризующий способность тромбоцитов стягивать волокна фибрина в сгустке, в результате объем сгустка уменьшается и из него отжимается сыворотка. Результаты зависят от количества тромбоцитов, их метаболизма, состояния гликопротеиновых рецепторов Пб/Ша, тромбина, повышены при тромбофилических ситуациях. Анализ позволяет мониторировать лечение блокаторами гликопротеиновых рецепторов, терапию антитромбином. Описаны прямые [11] и непрямые [12] методы оценки ретракции сгустка крови. Прямые методы основаны на применении специальных устройств, позволяющих измерить величину ретрактильных сил, развивающихся в сгустке при его сокращении. Одним из них является устройство анализа гемостаза (HAS - Hemostasis Analysis System), который измеряет кроме величины ретрактильных сил, эластичность кровяного сгустка и время образования тромбина [10].

В клинической практике наибольшее распространение получили непрямые методы. Непрямые методы заключаются в измерении объема сыворотки, выделяемой из сгустка крови при его ретракции, или в оценке степени уменьшения объема сгустка разведенной плазмы со стандартным содержанием тромбоцитов в процессе его спонтанного сжатия. При исследовании цельной крови на показатели ретракции влияют гематокрит и содержание эритроцитов: при анемии выделяется больше сыворотки, при полиглобулиях — меньше. Однако ретракция в большей степени зависит от количества тромбоцитов и их функционального состояния, а также от количества фибриногена. При глубокой тромбоцитопении сгустки не подвергаются ретракции, она нарушена и при ряде тромбоцитопатий (тромбастения Гланцмана, тяжелая уремическая тромбоцитопатия и др.), снижена при значительной гиперфибриногемии. Непрямые методы длительны, недостаточно чувствительны, выявляют только грубые нарушения [12].

Для исследования функции тромбоцитов разработаны ряд анализаторов.

**Анализатор PFA-100** (Siemens, Германия) моделирует тромбоцитарный гемостаз *in vitro*. Каждый картридж анализатора содержит в себе специальный канал, моделирующий сосуд. Он имеет отверстие, которое имитирует повреждение стенки сосуда. На стенках канала в районе повреждения нанесены агрегирующие агенты, которые являются причиной запуска свертывания. В цельной крови, проходящей по такому каналу, происходит адгезия, активация, секреция и агрегация тромбоцитов, ведущей к закупорке поврежденного сосуда. Для оценки функциональной активности тромбоцитов определяется время окончания кровотока («время закупорки отверстия»). Картридж коллаген/эпинефрин используется для скрининга первичного гемостаза, картридж коллаген/АДФ - для контроля антиагрегантной терапии аспирином [13].

При исследовании надо учитывать влияние на результат количества тромбоцитов, гематокрита, приема лекарств, особенности диеты. Тест чувствителен к дефектам тромбоцитарных рецепторов и гранул, нарушениям секреции, дефектам фактора Виллебранда [14]. По данным авторов исследования, тест более чувствителен, чем определение времени кровотечения [15], особенно к фактору Виллебранда. Метод прост в использовании, позволяет изучить функцию тромбоцитов в течение нескольких минут у постели больного. В связи с этим рекомендуется к использованию в качестве скринингового метода диагностики [16].

Однако метод недостаточно чувствителен к дефектам средней степени выраженности и может дать отрицательный результат у пациентов с болезнью недостаточного накопления, нарушениями первичной секреции, с синдромом Германски-Пудлака, болезнью Виллебранда I типа средней тяжести, синдромом Квебека. При исследовании может быть получен ложноположительный результат у пациентов с нормальной функцией тромбоцитов [17].

Определить количество тромбоцитов и их функциональную активность в экстренной ситуации возможно с помощью **анализатора Plateletworks** (Helena Biosciences, США). Степень агрегации оценивают путем подсчета количества тромбоцитов в цельной крови до и после добавления индуктора агрегации. АДФ или коллаген добавляют в образец крови с антикоагулянтом в условии постоянного перемешивания. В результате активации клетки агрегируют, их количество в цельной крови уменьшается. Результат сравнивают с контрольным образцом. Тест прикроватный, прост в использовании, результат получают через 5 минут. Надо учитывать

необходимость точной калибровки анализатора перед исследованием, для получения точных результатов анализ должен быть выполнен в течение 10 минут после взятия крови. Результаты коррелируют с данными агрегометрии. Метод также используют для контроля эффективности лечения антиагрегантными препаратами [18].

Изучение адгезивных и агрегационных свойств тромбоцитов в цельной крови выполняют и на анализаторах, принцип работы которых основан на имитации движущейся крови под воздействием силы напряжения. К ним относится анализатор **ИМРАСТ** (Diamed, Швейцария), имеющий встроенный микроскоп. Это полностью автоматизированное исследование. 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. Анализ прост в исполнении, требует малый объем анализируемого образца крови, результат получают через 6 минут. Адгезия тромбоцитов к пластиковой поверхности зависит от фактора Виллебранда, фибриногена, гликопротеиновых рецепторов GP Ib, GP IIb/IIIa и активации тромбоцитов. Не адгезируется к полистероновой поверхности тромбоциты у пациентов с тромбоастенией Глацмана или с афибриногемией [19]. Последние данные свидетельствуют о надежности использования этого оборудования для выявления тромбоцитарных дефектов, однако его использование широко не распространено [10].

Тромбоэластографическое исследование основано на измерении физических свойств образования кровяного сгустка. **С помощью тромбоэластографа** производят графическую регистрацию динамики образования тромба и его лизиса. Для этого исследуемый образец крови наливают в кювету прибора. В кровь опускают стержень, подвешенный на стальной струне. Кювета ритмично поворачивается вокруг стержня на определенный угол. Пока кровь жидкая, стержень неподвижен, и регистрирующее устройство записывает прямую линию. С началом образования сгустка (выпадения нитей фибрина) стержень начинает вращаться вокруг оси вместе с кюветой. Регистрирующее устройство фиксирует отклонения зубцов от прямой линии. Чем больше выпадает фибрина, тем сильнее вращается стержень тромбоэластографа, и больше отклоняются зубцы. При полном свертывании отклонения максимальные, и зубцы становятся одинаковыми. По мере растворения сгустка (фибринолиза) зубцы отклоняются в меньшей



степени. При полном фибринолизе на регистрирующей ленте вновь появляется прямая линия. По характеру кривой и используя расчетные показатели можно определить состояние гипо-, гипер- и нормокоагуляции, а также активации фибринолиза. Тромбоэластография применяется для распознавания предтромботических состояний [20], изучения состояния гемостаза в процессе хирургических операций [21], в акушерской практике [22], определения эффективности трансфузионной терапии [23].

Современные модификации тромбоэластографии предполагают использование различных реагентов и компьютерной обработки данных. Анализ возможен в различных образцах: цельная и цитратная кровь, богатая и бедная тромбоцитами плазма. Усовершенствованная методика позволяет изучить ответ тромбоцитов на стимуляцию арахидоновой кислотой и АДФ. Оценка производится по встраиванию тромбоцитов в тромбоцитарно - фибриновый сгусток. Функциональные изменения тромбоцитов отражают показатель динамики увеличения прочности сгустка от начала его образования и максимальная амплитуда [24]. Максимальная амплитуда характеризует соединения фибрина и тромбоцитов посредством GPIIb/IIIa рецепторов и отображает максимальную прочность сгустка. Значение зависит от количества фибриногена, тромбоцитов и функциональной способности последних. Для этого определяют максимальную прочность сгустка, индуцированную тромбином, фибрином и при стимуляции арахидоновой кислотой. По данным Tantry и соавт, показатели агрегации, определенные с помощью тромбоэластографа коррелируют с данными оптической агрегометрии [25]. Однако по данным Bowbrick и соавт. тромбоэластография для идентификации функциональных нарушений тромбоцитов менее чувствительна и информативна, по сравнению с агрегометрией и проточной цитометрией [26]. Данные об информативности использования тромбоэластографии в мониторинге терапии антиагрегантами противоречивы. По данным одних авторов, метод позволяет контролировать лечение [24], по данным других, тромбоэластография не выявляет клинически значимого отличия в функции тромбоцитов после приема лекарств [27].

Более распространенным методом оценки функции тромбоцитов в течение многих лет остается фотометрический. При проведении фотометрического исследования происходит графическая или потенциометрическая регистрация процесса. На сегодняшний день световая трансмиссивная **агрегометрия** является наиболее изученной. Оптическая агрегометрия осуществляется с использованием светового трансмиссивного

агрегометра, по существу фотометра, состоящего из источника света, держателя кюветы, обогревателя для обеспечения постоянной ( $37^{\circ}\text{C}$ ) температуры образца и фотоэлемента для измерения светового пучка после его прохождения через суспензию тромбоцитов. Для обеспечения постоянного помешивания в кювету с суспензией тромбоцитов помещается мешалка. Световой сигнал трансформируется в электрический и передается самописцу или компьютеру [2].

Оптические агрегометры регистрируют агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме по изменению оптической плотности. Это позволяет исследовать не только агрегацию, но и изменение формы тромбоцитов. Максимальная оптическая плотность (минимальная светопропускаемость) наблюдается, когда тромбоциты находятся в состоянии покоя и однородно распределены в плазме. При добавлении индуктора агрегации тромбоциты активизируются, изменяется дисковидная форма клеток на сферическую с шипами, что сопровождается увеличением оптической плотности (или уменьшением пропускания света). За этим следует быстрое увеличение пропускания света, что свидетельствует о текущей агрегации тромбоцитов и формировании тромбоцитарных сгустков различного размера. Кривая агрегации либо достигает плато светопропускания (указывает на необратимую агрегацию), либо начинает возвращаться к базовым значениям (обратимая агрегация) в зависимости от функционального состояния тромбоцитов и используемых агонистов агрегации. При использовании слабых агонистов в больших концентрациях кривая агрегации имеет двухфазный характер. Первичная волна отражает начальную волну агрегации в ответ на введение стимуляторов, затем следует краткое уплощение и вторичная волна агрегации, которая, как правило, необратима. Вторичная волна характеризует внутренний путь активации тромбоцитов путем секреции компонентов гранул. Появление двухволновой или необратимой агрегации при стимуляции АДФ или адреналином в малых концентрациях указывает на повышение чувствительности тромбоцитов к этим индукторам. Одноволновая неполная (а часто и обратимая) агрегация при стимуляции АДФ или адреналином в концентрациях  $5-10 \times 10^6$  моль/л наблюдается при нарушении секреторной реакции тромбоцитов. Основные параметры, характеризующие агрегацию: степень агрегации - максимальный процент светопропускания плазмы; скорость агрегации - увеличение светопропускания за 1 минуту; время агрегации - время достижения максимальной агрегации; длительность lag фазы (латентного периода).

Для индукции агрегации тромбоцитов *in vitro* наиболее часто используют АДФ, адреналин, коллаген, арахидоновую кислоту и ристомицин. Индукторы агрегации пластинок крови дифференцируются на сильные и слабые. Сильные (например, коллаген) непосредственно вызывают агрегацию клеток и секрецию гранул. Слабые индукторы (адреналин и АДФ) запускают агрегацию без воздействия на секрецию. Влияние сильных агонистов в малых концентрациях на агрегацию тромбоцитов может быть сходным с воздействием слабых индукторов, но слабые индукторы агрегации никогда не ведут себя как сильные, даже если они используются при очень высоких концентрациях.

Ристоцетин не является истинным агонистом агрегации тромбоцитов, так как он вызывает агглютинацию тромбоцитов, который генерирует формирование тромбоцитарных сгустков без активации тромбоцитов. Он используется для выявления нарушений взаимодействий тромбоцитарных гликопротеинов Ib и фактора Виллебранда, и, соответственно, диагностики синдрома Бернара – Сулье и некоторых форм болезни Виллебранда.

Коллаген позволяет выявить недостаточность секреции тромбоцитов, в низких концентрациях может применяться для изучения эффективности терапии аспирином и антагонистами P2Y<sub>12</sub> рецепторов. Адреналин используют для определения гиперреактивности тромбоцитов, в малых дозах для мониторинга лечения аспирином и антагонистами P2Y<sub>12</sub> рецепторов, диагностирования болезни пула накопления, синдрома Квебека. Использование широкой панели агонистов агрегации позволяет диагностировать многие функциональные нарушения тромбоцитов [27-29].

Существенным недостатком этого метода является трудность регистрации активации тромбоцитов по пропусканию в плазме, поскольку доля активационного сигнала составляет несколько процентов от общего сигнала. Использование обогащенной тромбоцитами плазмы для изучения функциональных особенностей тромбоцитов сопряжено со всеми недостатками, свойственными методам исследования функциональной активности пластинок после отделения других форменных элементов крови: длительность пробоподготовки, воздействие на тромбоциты ускорений при центрифугировании, потеря при этом наиболее активной фракции пластинок, а также эритроцитов и лейкоцитов, существенно влияющих на активность пластинок. Исследование трудоемкое, не может быть выполнено у постели больного. Лимитирующим фактором является количество тромбоцитов. Рекомендуемое количество

тромбоцитов для исследования методом оптической агрегометрии составляет  $200-300 \times 10^9$ . Оптические агрегометры способны обнаруживать только крупные тромбоцитарные сгустки, состоящие более из 100 клеток [30].

В отличие от оптических агрегометров **лазерные анализаторы** способны выявлять тромбоцитарные агрегаты, состоящие из двух или трех клеток. Обнаружение тромбоцитарных агрегатов и их размеров с помощью лазерной агрегометрии основано на оценке степени рассеивания светового пучка или на анализе флуктуаций оптической плотности, зависящие от величины тромбоцитарных агрегатов.

Параметры агрегации при использовании лазерной агрегометрии, основанной на анализе флуктуаций оптической плотности, определяются по кривой светопропускания и среднего размера агрегатов. Это позволяет исследовать и агрегацию, и изменение формы тромбоцитов. Степень агрегации определяется как максимальное значение среднего размера агрегатов после добавления индуктора. Скорость агрегации определяется как максимальный наклон кривой среднего размера [31].

Агрегацию с помощью аппарата РА-100 (Япония) наряду с оптической агрегометрией изучают с использованием методики счета частиц, основанной на светорассеивании. Этот метод основан на том, что интенсивность рассеивания света, испускаемого частицами, увеличивается пропорционально размеру их диаметра.

Метод отличается высокой чувствительностью, что делает его пригодным для исследования спонтанной агрегации, агрегации под действием низких концентраций индукторов. Лазерный анализатор агрегации тромбоцитов позволяет изучать функцию тромбоцитов снижении их количества до  $40\,000 \times 10^9$  (58) [32].

**Импедансные технологии** позволяют изучать агрегационные свойства тромбоцитов в цельной крови. Это сокращает время проведения исследования и снижает вероятность артефактов из-за отсутствия необходимости пробоподготовки. Для анализа необходимо сравнительно меньше цельной крови (~10мл, для оптической агрегометрии - ~40мл), что позволяет использовать его в педиатрической практике. Принцип работы импедансных агрегометров основан на измерении и регистрации изменения сопротивления (импеданса) и других электрических параметров при прохождении микротоков в специальном электродном блоке при его погружении в различные образцы — цельную кровь, плазму, обогащенную тромбоцитами, разведенную кровь, или взвесь отмытых тромбоцитов. Увеличение сопротивления прямо пропорционально массе

тромбоцитов, осажденных на электродный блок. Процесс изменения сопротивления позволяет количественно оценить кинетику процесса агрегации. Первоначальный контакт электродов с исследуемым образцом приводит к образованию на них монослоя тромбоцитов. Затем при добавлении агонистов происходит постепенная агрегация тромбоцитов на электродах, которая и приводит к характерным изменениям электрических свойств системы. Для изучения агрегации тромбоцитов импедансными агрегометрами используют те же индукторы агрегации, но в других концентрациях. В качестве антикоагулянта вместо цитрата рекомендуют использовать гирудин или его аналоги. В отличие от цитрата, гирудин не влияет на содержание кальция. Антикоагулянтное действие гирудина связано с непосредственной нейтрализацией тромбина. Интерпретация результатов импедансной агрегометрии аналогична с оптической. Анализ функции тромбоцитов данной методикой у пациентов с тромбоцитопенией возможно при количестве  $50-100 \times 10^9$ . Недостатком метода является зависимость результата от гематокрита, невозможность исследования гемолизированного образца крови [33].

**Люминесцентные агрегометры** представляют собой модификации оптических агрегометров, которые одновременно с оценкой агрегации тромбоцитов позволяют выявить дефекты накопления и секреции. Исследование секреции позволяет количественно оценить вторичную агрегацию и может быть использовано для изучения активации или ингибирования тромбоцитов. Метод основан на количественном определении биолюминесценции АТФ. АДФ, секретлируемая из гранул тромбоцитов, в течение нескольких минут превращается в АТФ. Концентрация высвобождаемого из тромбоцитарных гранул АДФ определяется с помощью специфического люминесцентного реагента люциферин - люциферазы. АТФ взаимодействует с люциферазой и образует неустойчивое соединение, способное к люминесценции. Степень излучения пропорциональна количеству образующихся соединений [34].

**Проточная цитометрия** является современной технологией быстрого оптического измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов. Методика 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 (аутофлуоресценция) или внесённых в

образец перед проведением исследования. Методом проточно - цитофлуориметрического анализа можно изучать функцию тромбоцитов во взвеси отмытых тромбоцитов, в плазме, богатой тромбоцитами и цельной крови. Проточная цитометрия цельной крови дает возможность изучать функциональные особенности тромбоцитов в естественных условиях учетом взаимодействий с другими клетками крови. Используя этот метод диагностики определяют степень активации тромбоцитов, являющуюся показателем склонности к тромбозам, что в свою очередь играет важную роль в оценке патогенеза многих заболеваний. Определение гиперактивности тромбоцитов методом проточной цитометрии проводят у пациентов с нестабильной стенокардией, острым инфарктом миокарда, транзиторной ишемической атакой, преэклампсией, плацентарной недостаточности, сахарным диабетом, серповидно-клеточной анемией, болезнью периферических сосудов, инсультом. Данный метод позволяет выявить группу пациентов, кому показана антиагрегантная терапия, подобрать эффективное лекарственное средство [35,36,37,38].

Основными признаками активации тромбоцитов, выявляемыми с использованием проточного цитофлуориметра, являются конформационные изменения в интегрине  $\text{Pb} / \text{Pa}$ , выброс белков из  $\alpha$  гранул, образование моноцитарно- тромбоцитарных и лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов, появление микрочастиц тромбоцитов в периферической крови.

Белок - рецептор тромбоцитарной мембраны –  $\text{GPb/Pa}$  присутствует на поверхности интактных тромбоцитов в неактивной форме, то есть неспособной к связыванию высокомолекулярных лигандов. Однако активация тромбоцитов способствует переходу  $\text{GPb/Pa}$  в активную форму, способную связывать фибриноген, с последующим образованием тромбоцитарных агрегатов. Для выявления конформационных изменений в интегрине используется моноклональное антитело PAC-1. PAC-1 является точным показателем активации клеток, так как в отличие от других моноклональных антител он связывается только с участком интегрин  $\text{GP Pb/Pa}$ , подвергшимся изменениям в результате активирования тромбоцита [39].

Наиболее изученным методом выявления активации тромбоцитов является определение экспрессии P-селектина. P-селектин - компонент  $\alpha$ - гранул мембраны покоящихся клеток, который экспрессируется на поверхность клеточной мембраны только после секреции. Поэтому P- селектин специфические антитела связывается только с

дегранулированными тромбоцитами. Однако обнаружено, что в кровотоке циркулируют дегранулированные тромбоциты, потерявшие на своей поверхности Р-селектин, но продолжающие циркулировать и функционировать. В связи с этим Р-селектин не является идеальным маркером определения в кровотоке дегранулированных тромбоцитов.

Р-селектин вызывает начальную адгезию активированных тромбоцитов к лейкоцитам и моноцитам. Лейкоцитарно-тромбоцитарные и моноцитарно-тромбоцитарные комплексы идентифицируются по характеру светорассеивания клеток и связыванию со специфическими моноклональными антителами. Исследование показало, что моноциты в большем количестве связываются с тромбоцитами и период полураспада моноцитарно-тромбоцитарных комплексов, значительно дольше (около 30 минут), чем лейкоцитарно-тромбоцитарных комплексов (около 5 минут). Изучение моноцитарно-тромбоцитарных комплексов является более чувствительным тестом для выявления гиперактивности тромбоцитов, чем определение лейкоцитарно-тромбоцитарных комплексов и экспрессии Р-селектина [40].

По данным Sbrana S. и соавторов, определение активности тромбоцитов методом проточной цитометрии более чувствительный, чем оптическая агрегометрия, с малым разбросом результатов [37].

Изучение изменения функциональной активности тромбоцитов при лечении антиагрегантными препаратами позволяет контролировать эффективность проводимой терапии, выявить резистентность и сниженную реактивность к препарату, подобрать эффективное лекарственное средство и его адекватную дозу. Так для мониторинга эффективности терапии тиенопиридинами методом проточной цитометрии определяют степень фосфорилирования внутриклеточного фосфопротеина, стимулированного вазодилататором [36].

Для оценки эффективности лечения антагонистов к комплексу GP IIb/IIIa определяют степень блокады рецепторов данными лекарственными препаратами. Существуют множество методов, включающие прямые и косвенные методики. Один из прямых методик заключается в использовании метода конкурентного связывания. С этой целью применяют антагонисты GP IIb/IIIa рецепторов, конъюгированные биотином [41] или FITC [42]; блокирующие моноклональные антитела [43]; дизинтегрины [44].

Методом проточной цитометрии изучают выживаемость и функциональную активность перелитых донорских тромбоцитов. Для выявления перелитых тромбоцитов

используют стрептавидин - 670 в комплексе с флуоресцентной меткой биотином или РКН2. Функцию тромбоцитов изучают по количеству образования микрочастиц, с помощью антител, отражающих активацию тромбоцитов (экспрессия Р-селектина, РАС-1), или с использованием FITC- меченых HLA-A2 специфических антител [45].

Преимуществом иммуноцитофлуориметрического метода является возможность изучения функции тромбоцитов в цельной крови с выполнением минимального количества манипуляций, что предотвращает потерю субпопуляций тромбоцитов и активацию клеток *in vitro*. Метод является высоко чувствительным и позволяет изучать функциональную активность у пациентов с глубокой тромбоцитопенией. Для выявления активных тромбоцитов в кровотоке достаточно их содержания 1%. Для исследований необходимы малые объемы образца крови, поэтому этот метод применим в педиатрической практике [46,47].

Маркеры активации тромбоцитов в плазме можно выявить с помощью **методов иммуноферментного анализа (ИФА)**. В основе иммуноферментного анализа лежит иммунная реакция антигена с антителом. Присоединение к антителам ферментной метки позволяет учитывать результат по появлению ферментативной активности или по изменению ее уровня. Различают несколько модификаций ИФА. Наибольшее распространение получил твердофазный иммунный анализ ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Методом ELISA выявляют такие показатели активации тромбоцитов как растворимый Р-селектин, тромбоцитарный фактор 4 (антигепариновый фактор),  $\beta$ -тромбомодулин [48].

Экспрессию Р-селектина, гликопротеинового комплекса GP IIb/IIIa Zhang и соавторы определяли с помощью усовершенствованного метода ИФА - биотин-авидин – ELISA теста. Исследователи отмечают, что при применении авидин-биотиновых конъюгатов достигается высокая чувствительность и специфичность определения, а также в значительной степени снижаются фоновые реакции. Авторы указывают на высокую степень корреляции результатов экспрессии Р-селектина и комплекса GP IIb/IIIa, полученных данным методом и с помощью проточной цитометрии [49].

Таким образом, на сегодняшний день оценка функциональной способности тромбоцитов возможно различными методами пригодными как для скринингового тестирования, так и более детального, углубленного изучения выявленных нарушений. У каждого метода есть свои преимущества и недостатки. Для одних исследователей золотым



стандартом изучения функции тромбоцитов остается классическая агрегатометрия, другие предпочитают новые технологии. Выявить оптимальный метод помогут дальнейшие научные и клинические исследования.

#### Литература

1. Michelson AD (ed). Platelets. Boston: Academic Press. - 2007.
2. Папаян Л.П. «Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний» / Под ред. Петрищева Н.Н. - 1999. - СПб. – 121 с.
3. Kadir R.A., Lee C.A., Sabin C.A. et al Pregnancy in women with von Willebrand's disease or factor XI deficiency // Br. J. Obstet. Gynaecol. – 1998. – Vol. 105. – P. 314 – 321.

4. Inbal A., Muszbek L. Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2003. – Vol. 29. – P. 171 – 174.
5. Vagdatli E., Gounari E., Lazaridou E. et al Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation // *Hippokratia.* – 2010. – Vol. 14. – P. 28 – 32.
6. Ahnadi C.E., Boughrassa F.F., Chapman-Montgomery E.S. et al. Comparison of two methods to assess variability of platelet response to anti-platelet therapies in patients with acute coronary syndrome undergoing angioplasty // *Thromb. Haemost.* – 2004. – Vol. 92. – P. 1207 – 1213.
7. Harrison P., Mumford A. Screening tests of platelet function: update on their appropriate uses for diagnostic testing // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2009. – Vol. – 35. – P. 150 – 157.
8. Шитикова А.С. Лабораторное исследование функции тромбоцитов в клинической практике и методы контроля за гемостатической и дезагрегационной терапией: Методические рекомендации МЗ РСФСР. - Л. - 1984. – 33 с.
9. Clauser S., Cramer-Border E. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2009. V. – 35. – P. 213–223.
10. Harrison P. Platelet function analysis // *Blood.* – 2005. – Vol. 19. - P. 111 – 123.
11. Liang X.M., Han S.J., Reems J.A. et al. Platelet retraction force measurements using flexible post force sensors // *Lab. Chip.* – 2010. – Vol. 10. – P. 991 - 998.
12. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. - М.:Ньюдиамед. - 2001. – 286 с.
13. Kundu S.K., Heilmann E.J., Sio R. et al. Description of an in vitro platelet function analyzer – PFA-100 // *Semin.Thromb. Hemost.* – 1995. – Vol. 21(Suppl 2). – P. 106 – 112.
14. Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction // *J. Lab. Clin. Med.* – 2001. – Vol. 138. – P. 152 – 163.
15. Francis J.L. Platelet Function Analyzer (PFA-100) // In: Michelson A.D., editor. *Platelets.* San Diego: Academic Press. - 2004. – P. 325 – 335.
16. Koscielny J., Kiesewetter H., von Tempelhoff G.F. More on: platelet function analyzer (PFA-100) closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function // *J. Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 4. – P. 1426 – 1427.

17. Harrison P., Robinson M., Liesner R. et al. The PFA-100: a potential rapid screening tool for the assessment of platelet dysfunction // Clin. Lab. Haematol. – 2002. – Vol. 24. – P. 225 – 232.
18. Campbell J., Ridgway H., Carville D. Plateletworks: a novel point of care platelet function screen // Mol. Diagn. Ther. – 2008. – Vol. 12. – P. 253 - 258.
19. Varon D., Savion N. Cone and Platelet Analyzer // In: Michelson A.D., editor. Platelets. San Diego: Academic Press. - 2004. - P. 337 - 345.
20. McCrath D.J., Cerboni E., Frumento R.J. Thrombelastography maximum amplitude predicts postoperative thrombotic complications including myocardial infarction // Anesth. Analg. – 2005. – Vol. 100. – P. 1576 – 1583.
21. Adams M., Ward C., Thom J. et al. Emerging technologies in hemostasis diagnostics: a report from the Australasian Society of Thrombosis and Haemostasis Emerging Technologies Group // Semin. Thromb. Hemost. – 2007. – Vol. 33. – P. 226 – 234.
22. Harnett M.J., Hepner D.L., Datta S., Kodali B.S. Effect of amniotic fluid on coagulation and platelet function in pregnancy: an evaluation using thromboelastography // Anaesthesia. – 2005. – Vol. 60. – P.1068 - 1072.
23. Исраелян Л. А., Громова В. В., Лубнин А. Ю. Уменьшение частоты трансфузии донорской свежзамороженной плазмы на основании результатов тромбэластографического исследования у нейрохирургических больных в условиях операционной кровопотери //Анестезиол. и реаниматол. – 2009. - №5. – С. 28 - 31.
24. Craft R.M., Chavez J.J., Bresee S.J. et al. A novel modification of the Thrombelastograph assay, isolating platelet function, correlates with optical platelet aggregation // J. Lab. Clin. Med. – 2004. – Vol. 143. – P. 301 - 309.
25. Tantry U.S., Bliden K.P., Gurbel P.A. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation // J. Am. Col.l Cardiol. – 2005. – Vol. 46. – P. 1705 - 1709.
26. Bowbrick V.A., Mikhailidis D.P., Stansby G. Value of thromboelastography in the assessment of platelet function // Clin. Appl. Thromb. Hemost. – 2003. – Vol.9. – P. 137 -142.

27. Bailey L.A., Sistino J.J., Uber W.E. Is platelet function as measured by Thrombelastograph monitoring in whole blood affected by platelet inhibitors? // *J. Extra. Corpor. Technol.* – 2005. – Vol.37. – P. 43 - 47.
28. Jennings L.K., McCabe White M. Platelet aggregation // In: Michelson AD (ed). *Platelets.* Boston: Academic Press. - 2007. – P. 495 – 507.
29. Moffat K.A., Ledford-Kraemer M.R., Nichols W.L. North American Specialized Coagulation Laboratory Association. Variability in clinical laboratory practice in testing for disorders of platelet function // *Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 93. – P. 549 – 553.
30. Favalaro E.J., Mohammed S. Platelet function testing: auditing local practice and broader implications // *Clin. Lab. Sci.* – 2010. – Vol. 23. – P. 21 – 31.
31. Tohg H., Takahashi H., Watanabe K. Development of large platelet aggregates from small aggregates as determined by laser-light scattering: effects of aggregant concentration and antiplatelet medication // *Thromb. Haemost.* – 1996. – Vol. 75. – P. 838 - 843.
32. Breet N.J., van Werkum J.W., Bouman H.J. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation // *JAMA.* -2010. – Vol. 303. – P. 754 - 762.
33. McGlasson D., Fritsma G. Whole blood platelet aggregometry and platelet function testing // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2009. – Vol. 35. – P. 168 – 180.
34. White M.M., Foust J.T., Mauer A.M. et al. Assessment of lumiaggregometry for research and clinical laboratories // *Thromb. Haemost.* – 1992. – Vol.67. – P. 572–577
35. Fox S.C., Sasae R., Janson S. et al. Quantitation of platelet aggregation and microaggregate formation in whole blood by flow cytometry // *Platelets.* – 2004. – Vol. 15. – P. 85 - 93.
36. Aleil B., Ravanat C., Cazenave J. et al. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 3. – P. 85 - 92.
37. Sbrana S., Pina F.D., Rizza A. et al. Relationships between optical aggregometry (type born) and flow cytometry in evaluating ADP-induced platelet activation // *Clinical. Cytometry.* – 2008. – Vol. 74. – P. 30 – 39.
38. Сироткина О.В., Боганькова Н.А., Ласковец А.Б. и соавт. Иммунологические методы в оценке функциональной активности тромбоцитов у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями // *Мед. Иммунолю* – 2010. – Т. 12. - № 3. – С. 213 – 218.

39. Zamarron C., Ginsberg M.H., Plow E.F. Monoclonal antibodies specific for a conformationally altered state of fibrinogen // *Thromb. Haemost.* – 1990. – Vol. 64. – P. 41 - 46.
40. McEver R.P. P-selectin/PSGL-1 and other interactions between platelets, leukocytes, and endothelium. In: Michelson A.D., ed. *Platelets*. New York: Academic Press. – 2002. – P. 139 - 155.
41. Konstantopoulos K., Kamat S.G., Schafer A.I. et al. Shear-induced platelet aggregation is inhibited by in vivo infusion of an antiglycoprotein IIb/IIIa antibody fragment, c7E3 Fab, in patients undergoing coronary angioplasty // *Circulation*. – 1995. – Vol. 91. – P. 1427 -1431.
42. Gawaz M., Ruf A., Neumann F-J. et al. Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement // *Thromb. Haemost.* – 1998. – Vol. 80. – P. 994 - 1001.
43. Quinn M., Deering A., Stewart M. et al. Quantifying GPIIb/IIIa receptor binding using 2 monoclonal antibodies: discriminating abciximab and small molecular weight antagonists. *Circulation*. – 1999. – Vol. 99. – P. 2231 - 2238.
44. Liu C.Z., Hur B.T., Huang T.F. Measurement of glycoprotein IIb/IIIa blockade by flow cytometry with fluorescein isothiocyanateconjugated crotavirin, a member of disintegrins. *Thromb Haemost.* – 1996. – Vol.76. – P. 585 - 591.
45. Hughes D.L., Evans G., Metcalfe P. et al. Tracking and characterization of transfused platelets by two colour, whole blood flow cytometry // *British. Journal. of Haematology*. - 2005. – Vol. 130. – P. 791 - 794.
46. Michelson A.D. Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry: methods and clinical studies // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. – 1994. – Vol. 5. – P. 121 - 131.
47. Rajasekhar D., Barnard M.R., Bednarek F.J., Michelson A.D. Platelet hyporeactivity in very low birth weight neonates // *Thromb. Haemost.* – 1997. – Vol.77. – P. 1002 - 1007.
48. TAMAGAWA-MINEOKA R., KATOH N., UEDA E. et al. Elevated platelet activation in patients with atopic dermatitis and psoriasis: increased plasma levels of  $\beta$  - thromboglobulin and platelet factor 4 // *Allergol. Internat.* – 2008. – Vol. 57. – P. 391 - 396

49. Zhang. Y., Zhao Y., Lu S. et al. A high throughput biotin-avidin - ELISA for studying of expression platelet membrane glycoproteins and its clinical application // Tohoku J. Exp. Med. – 2010. – Vol. 222. – P. 83 - 88.