
СТАНДАРТИЗАЦИЯ ОЦЕНКИ ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ АГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

А.Г. Кочетов, О.В. Лянг, Р.Р. Политидис,
П.П. Огурцов, А.Д. Джаппуев

Кафедра госпитальной терапии
с курсом клинической лабораторной диагностики
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

Исследование агрегационной активности тромбоцитов имеет большое значение в диагностике состояния системы гемостаза, а также при оценке эффективности антиагрегантной терапии. Целью настоящей работы явилась стандартизация наиболее распространенного в настоящее время турбидиметрического метода исследования агрегации тромбоцитов с использованием различных индукторов агрегации и их концентраций. Было обследовано 38 практически здоровых доноров. Представлены стандартные типы и рассчитаны референтные характеристики кривых агрегации для лазерного агрегометра.

Ключевые слова: тромбоциты, агрегация, турбидиметрический метод.

Исследование агрегационной активности тромбоцитов в настоящее время является одним из наиболее востребованных в клинической практике методов оценки тромбоцитарного гемостаза. Нарушения тромбоцитарного гемостаза являются пусковыми моментами или первопричиной формирования тромбов [1, 2, 3, 4]. Не менее важное значение исследование агрегационной активности тромбоцитов имеет при мониторинге антиагрегантной терапии.

Оптическая турбидиметрическая агрегометрия, называемая также световой трансмиссионной агрегометрией (*light transmission aggregometry* — LTA), используется наиболее широко и является «золотым стандартом» в оценке влияния аспирина на реактивность тромбоцитов [2, 3, 5, 6, 7, 8]. Недостатками метода являются невысокая чувствительность (при образовании микроагрегатов, содержащих менее 50—100 тромбоцитов, не наблюдается увеличения светопропускания), зависимость от светопоглощающей активности среды, интенсивности падающего света и качества пробирки [9]. Распространена графическая регистрация результатов данного метода в виде агрегационных кривых [2]. Однако экспериментальных работ, посвященных соответствию этапов агрегации тромбоцитов фазам агрегационной кривой, до настоящего времени не проводилось.

В 1989 году З.А. Габбасовым и соавторами был предложен модифицированный метод исследования светопропускания взвеси тромбоцитов, получивший название флуктуационного метода, основанного на анализе флуктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале [5]. Метод был предложен для исследования агрегации именно в тех случаях, когда агрегаты малы и их образование не может быть обнаружено традиционным турбидиметрическим методом.

Указанные выше методы исследования агрегационной активности тромбоцитов позволяют оценить качество и количество агрегатов, но не имеют стандартных правил последующей интерпретации для использования в клинической практике [6]. Необходимы критерии оценки метода, позволяющие описать полученные результаты. Существует способ, предложенный З.С. Баркаганом, основанный на индивидуальном для каждого пациента подборе доз индукторов агрегации, позволяющих получить двухволновую (двухфазную) фотометрическую кривую [2]. Но этот способ трудоемок, так как требует постоянно большого количества разведений индукторов агрегации от пациента к пациенту, а также проведения непредвиденного числа постановок, что, соответственно, требует и большого количества крови от пациента для получения плазмы, богатой тромбоцитами.

Цель исследования. Разработка критериев оценки агрегационной активности тромбоцитов с использованием различных индукторов агрегации и их концентраций с целью получения агрегатограмм, характеризующих этапы индуцированной агрегации, реакции высвобождения и дезагрегации.

Материал и методы. В группу исследования были включены 38 практически здоровых доноров-добровольцев в возрасте 20—30 лет (средний возраст составил $26,3 \pm 1,8$ лет), не предъявляющих жалоб и прошедших диспансеризацию по месту жительства или работы. Группа состояла из 18 мужчин и 20 женщин. Критериями исключения из группы доноров были физическая, термическая нагрузка, сильный эмоциональный стресс в сутки, предшествующие взятию крови. У женщин взятие крови осуществлялось в середине менструального цикла.

Взятие крови осуществлялось натошак, путем венопункции, в вакуутайнеры с 3,8% цитратом натрия, общим объемом 10 мл. Богатую тромбоцитами плазму получали путем центрифугирования цельной крови при 1000 оборотах в минуту 10 минут, бедную тромбоцитами плазму — при 3000 оборотах в минуту 15 минут.

Агрегацию тромбоцитов исследовали на лазерном агрегометре «AGGREGATION ANALYSER» НПФ БИОЛА (Россия) с компьютерной обработкой по программе AGGR. Концентрацию тромбоцитов определяли с использованием соответствующей функции агрегометра [5]. При необходимости стандартизовали тромбоцитарную плазму разведением безтромбоцитарной или обогащением более концентрированной плазмой до содержания тромбоцитов 250 000—300 000 в 1 мкл. Для проведения одного исследования использовалось 200 мкл плазмы и 25 мкл индуктора, что в конечном итоге позволяло получить 8—10 различных агрегатограмм на одного пациента.

Приготовление рабочих растворов индукторов агрегации осуществлялось с использованием диагностических наборов химреактивов фирмы «Технология-стандарт» (Россия): аденозиндифосфат (АДФ), коллаген и ристоцетин. Лиофилизированный коллаген массой 120 мг разводился 6 мл дистиллированной воды для получения конечной концентрации в реакционной смеси 2,22 мкг/мл, лиофилизированный ристоцетин массой 7,5 мг разводился 0,5 мл растворителя для получения конечной концентрации в реакционной смеси 1,67 мкг/мл. Лиофилизированный

АДФ массой 2,0 мг разводился 2 мл растворителя для получения маточного раствора с концентрацией 1 мг/мл. Из маточного раствора АДФ получались следующие разведения: АДФ 10,0 мкг/мл (100 мкл маточного раствора + 900 мкл физраствора NaCl, соответственно концентрация в реакционной смеси составила 11,11 мкг/мл), АДФ 5,0 мкг/мл (500 мкл раствора АДФ 10 мкг/мл + 500 мкл физраствора NaCl, 5,56 мкг/мл), АДФ 2,5 мкг/мл (500 мкл раствора АДФ 5,0 мкг/мл + 500 мкл физраствора NaCl, 2,78 мкг/мл), АДФ 1,25 мкг/мл (500 мкл раствора АДФ 2,5 мкг/мл + 500 мкл физраствора NaCl, 1,39 мкг/мл). Конечная концентрация индуктора в реакционной смеси рассчитывалась исходя из того, что общий объем смеси составляет 225 мкл, в котором содержится 25 мкл индуктора.

Запись кривых агрегации осуществлялась в течение 6 минут с 3-секундным интервалом детекции. Добавление индуктора агрегации производилось через 6—12 секунд от начала записи кривой.

Статистическая обработка данных исследования проводилась с использованием программного обеспечения SPSS 18.0 с учетом типа переменных и нормальности распределения. Значение вероятности (p) менее 0,05 (двухсторонняя проверка значимости) демонстрировало статистическую достоверность.

Результаты исследования и обсуждение. Основным типом процентных (%) кривых Борна/О'Брайена для коллаген-, ристоцетин-, АДФ 10,0 мкг/мл-индуцированной агрегации выявлена однофазная необратимая кривая (см. рис.). Высокая степень максимальной трансмиссии (до 80%) позволяет предположить, что в данных кривых наблюдается отражение процесса слияния фазы индуцированной агрегации и фазы высвобождения. Подтверждением служит наличие двухфазных кривых с высокой трансмиссией у части доноров на вышеуказанные индукторы, а также преимущественное достоверное наличие двухфазной кривой с четко выраженной стадией эндогенно-индуцированной агрегации на среднюю дозу индуктора АДФ 5,0 мкг/мл. Достоверно меньшая часть доноров имела однофазную необратимую с высокой трансмиссией АДФ 5,0 мкг/мл-индуцированную %-кривую, аналогичную АДФ 10,0 мкг/мл-индуцированной %-кривой агрегации.

АДФ 2,5 мкг/мл-индуцированная агрегация не показала достоверных различий по типу %-кривой. С одинаковой частотой встречались однофазные необратимые и однофазные обратимые %-кривые. Объединяет оба типа %-кривых агрегации на указанную дозу индуктора АДФ невысокая степень максимальной трансмиссии — не более 40%. При АДФ 1,25 мкг/мл-индуцированной агрегации достоверно чаще встречался однофазный обратимый тип %-кривой, реже необратимый, с невысокой степенью трансмиссии до 30%.

Все типы кривых агрегации (рис. 1) по параметру R (средний размер агрегатов) оказались однофазными обратимыми. Интерпретация их остается неясной, учитывая, что авторы предлагаемой кривой позиционируют показатель R как средний условный радиус агрегата, что подтверждается идентичными типами кривых на низкие дозы индуктора агрегации АДФ 2,5 и 1,25 мкг/мл. В таком случае возникает вопрос: с чем связана обратимая стадия R-кривой при высоких дозах индуктора и высокой трансмиссии, указывающей на увеличение светопропускания (увеличение объема пространства, свободного от тромбоцитов) в реакционной смеси, что косвенно характеризует увеличение размера агрегатов?

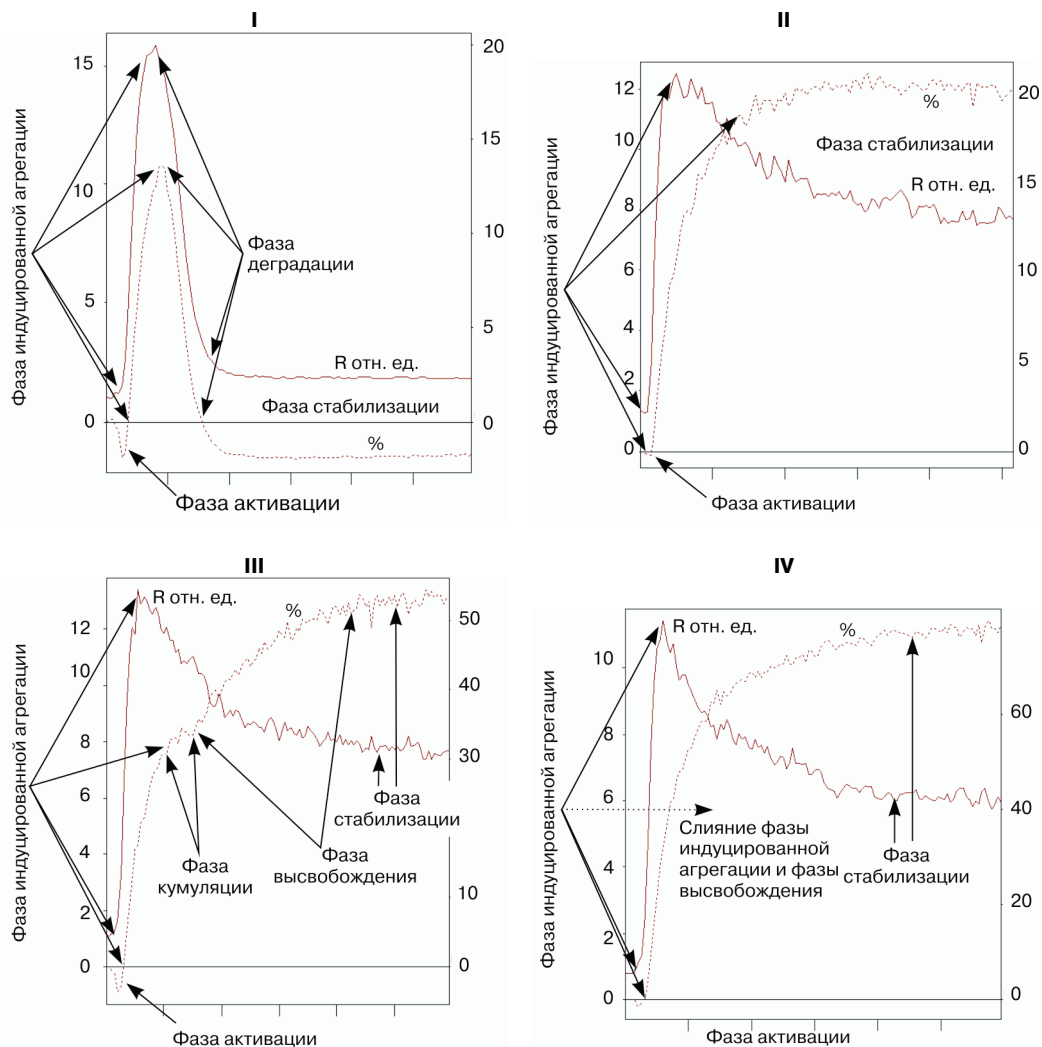


Рис. 1. Кривые агрегации, характерные для:

I — концентрации индуктора АДФ 1,25 и 2,5 мкг/мл; II — концентрации индуктора АДФ 2,5 и 1,25 мкг/мл,
 III — концентрации индуктора АДФ 5,0 мкг/мл, IV — концентрации индуктора АДФ 10,0 мкг/мл,
 Коллагена 2,22 мкг/мл, Ристоцетина 1,67 мкг/мл

С целью уточнения диагностической интерпретации параметра R проведено микроскопическое исследование по визуальному подсчету изменения количества и размера агрегатов. Сравнительный анализ количества и размера агрегатов проводился после добавления 25 мкл индукторов агрегации АДФ 5,0 мкг/мл и 1,25 мкг/мл в 200 мкл плазмы, предварительно равномерно распределенной по поверхности предметного стекла. Исследование проводили с использованием бинокулярного микроскопа «Микмед-1» под увеличением в 800 раз (окуляры К10^x, объектив 40-0,65 / ЛОМО8240321). После плавного покачивания предметного стекла с целью перемешивания и гомогенизации реакционной смеси подсчитывалось количество агрегатов на 1000 тромбоцитов и медианное количество тромбоцитов в подсчитанных агрегатах исходно, через 10, 20 секунд после добавления индуктора и каждые 20 секунд в последующие 4 минуты.

Сравнительный анализ количества и размера агрегатов позволил выявить в фазе индуцированной агрегации и фазе дезагрегации по %- и R-кривой АДФ 1,25 мкг/мл-индуцированной агрегации прямую зависимость количества и размера агрегатов. По %-кривой АДФ 5,0 мкг/мл-индуцированной агрегации в фазе высвобождения наблюдалось увеличение размера агрегатов на фоне снижения количества агрегатов, что совпало со снижением амплитуды R-кривой. Таким образом, параметр R отражает не столько условный средний размер агрегатов, сколько условное количество агрегатов в реакционной смеси. Максимальное значение R (R_{\max}) являлось максимальным условным значением количества агрегатов, которое мало зависило от концентрации индуктора. Скорость образования агрегатов, определенная авторами методики как тангенс угла наклона кривых, наоборот, находилась в четкой зависимости от концентрации индуктора, что проявилось в исследовании достоверной разницей значений наклона R- и %-кривых агрегации АДФ 10,0/5,0/2,5 и 1,25 мкг/мл.

Конечное условное количество агрегатов, отражаемое показателем R-минимальное (R_{\min}), также подтвердило предполагаемую характеристику параметра R: на дозах индуктора АДФ 2,5 и 1,25 мкг/мл, с конечным этапом распада агрегатов (деагрегацией), наблюдалось увеличение числа остаточных агрегатов с увеличением концентрации индуктора; на дозах индуктора АДФ 10,0 и 5,0 мкг/мл, с конечным этапом агрегатообразования до тромбоцитарного тромба, наоборот, с увеличением концентрации индуктора снижалась R_{\min} , т.е. результатом агрегации являлось последовательное образование меньшего количества агрегатов, но большего размера.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в фазе индуцированной агрегации наряду с увеличением пространства, свободного от тромбоцитов (увеличение светопропускания — трансмиссии), наблюдается увеличение количества и размера агрегатов (увеличение параметра R). Момент образования максимального количества агрегатов не совпадает с началом фазы высвобождения — существует разница по времени максимума параметра R и фазы кумуляции по кривой трансмиссии, что может быть связано с количеством тромбоцитов, чувствительных к используемой дозе индуктора. Дальнейшее увеличение светопропускания при использовании высоких и средних доз индукторов агрегации происходит в связи с повышением концентрации индукторов в реакционной смеси за счет эндогенных стимуляторов агрегации тромбоцитарного происхождения, что приводит к активации и вовлечению в агрегацию еще не вступивших во взаимодействие тромбоцитов и конгломерации образовавшихся на индуцированном этапе агрегатов. Конгломерация агрегатов, как уже имеющихся, так и образующихся, сопровождается увеличением размера и снижением количества агрегатов, что и отражается снижением параметра R на фоне повышения трансмиссии. При малых дозах индукторов агрегации вслед за индуцированной агрегацией следует фаза дезагрегации, сопровождающаяся снижением размера и количества агрегатов по параметру R на фоне снижения трансмиссии. Однако, стимулированные тромбоциты не возвращаются к своей прежней форме и активности: значение остаточного R (R_{end}) остается выше начального значения (R_{start}), а кривая трансмиссии никогда не возвращается к 0 —

или не доходит до 0, или пересекает ось измерения в сторону отрицательных значений. Пересечение кривой трансмиссии оси измерения в сторону отрицательных значений свидетельствует не о полном распаде агрегатов (так как $R_{\text{start}} < R_{\text{end}}$), а является свидетельством уменьшения исходного, послужившем параметром калибровки, свободного от тромбоцитов пространства за счет измененной формы оставшихся активированными тромбоцитов.

Выводы

Полученные характеристики кривых агрегации тромбоцитов позволяют рекомендовать следующие параметры агрегатограмм в качестве референтного диапазона на агрегометре «AGGREGATION ANALYSER» НПФ БИОЛА:

1) **коллаген-индуцированная агрегация** с конечной концентрацией коллагена во взвеси тромбоцитов 2,22 мкг/мл — однофазная необратимая кривая агрегации с максимальной степенью светопропускания ($T_{\text{max}}\%$) от 30 до 60, скоростью индуцированной агрегации по кривой светопропускания ($V\%$) 20—50 и по кривой условного количества агрегатов (V_R) 6—25, условным максимальным количеством агрегатов (R_{max}) 5,5—20,0, условным минимальным конечным количеством агрегатов (R_{end}) 3—11, соотношением максимального и минимального конечного условного количества агрегатов ($R_{\text{max}} / R_{\text{end}}$) 1,2—2,4;

2) **ристоцетин-индуцированная агрегация** с конечной концентрацией ристоцетина во взвеси тромбоцитов 1,67 мкг/мл — однофазная необратимая кривая агрегации с $T_{\text{max}}\%$ от 50 до 80, $V\%$ 40—70 и V_R 0,1—10, R_{max} 5,5—14, R_{end} 0,5—4, $R_{\text{max}}/R_{\text{end}}$ 2,5—6,6;

3) **АДФ 10,0 мкг/мл-индуцированная агрегация** с конечной концентрацией АДФ во взвеси тромбоцитов 11,11 мкг/мл — однофазная необратимая кривая агрегации с $T_{\text{max}}\%$ от 50 до 80, $V\%$ 35—75 и V_R 0,8—22, R_{max} 4—20, R_{end} 2—10, $R_{\text{max}}/R_{\text{end}}$ 1,5—2;

4) **АДФ 5,0 мкг/мл-индуцированная агрегация** с конечной концентрацией АДФ во взвеси тромбоцитов 5,56 мкг/мл — однофазная необратимая кривая агрегации с $T_{\text{max}}\%$ от 50 до 80, $V\%$ 35—65 и V_R 6,7—21, R_{max} 10—20, R_{end} 4,7—10,3, $R_{\text{max}}/R_{\text{end}}$ 1,4—2,7;

5) **АДФ 2,5 мкг/мл-индуцированная агрегация** с конечной концентрацией АДФ во взвеси тромбоцитов 2,78 мкг/мл — однофазная обратимая или необратимая кривая агрегации с $T_{\text{max}}\%$ от 10 до 30, минимальной конечной степенью светопропускания ($T_{\text{min}}\%$) от -1,8 до 27, соотношением максимальной и минимальной конечной степенью светопропускания ($T_{\text{max}}/T_{\text{min}}$) 1,0—3,2, $V\%$ 12—35, V_R 6—27, R_{max} 8—25, R_{end} 0—14, $R_{\text{max}}/R_{\text{end}}$ 1—15;

6) **АДФ 1,25 мкг/мл-индуцированная агрегация** с конечной концентрацией АДФ во взвеси тромбоцитов 1,39 мкг/мл — однофазная необратимая кривая агрегации с $T_{\text{max}}\%$ от 5 до 25, $T_{\text{min}}\%$ от -5 до 11, $T_{\text{max}}/T_{\text{min}}$ 0,9—5, $V\%$ 12—40 и V_R 6—27, R_{max} 10—23, R_{end} 0—9, $R_{\text{max}}/R_{\text{end}}$ 2,5—11.

Заключение. Предлагаемый способ оценки агрегации тромбоцитов на лазерном агрегометре является простым в исполнении и эффективным лабораторным методом оценки функциональной активности тромбоцитов. 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. Показатели коллаген- и ристоцетин-индуцированной агрегации свидетельствуют о функциональном состоянии эндотелия, характеризуя адгезивную сенсibilизированность тромбоцитов, обусловленную внутрисосудистой десквамацией эндотелия.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Балуда В.П., Балуда М.В., Деянов И.И. и др.* Физиология системы гемостаза. — М., 1995. — 243 с.
- [2] *Баркаган З.С., Момот А.П.* Основы диагностики нарушений системы гемостаза. — М.: Ньюдиамед-АО, 2001. — 224 с.
- [3] *Долгов В.В., Свириц П.В.* Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. — М.: Тверь: Триада, 2005. — 227 с., 150 ил.
- [4] Национальные рекомендации по диагностике и лечению ХСН (Утверждены съездом кардиологов РФ в октябре 2003 г.) // Журнал сердечная недостаточность. — 2003. — № 4. — С. 276—297.
- [5] *Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю. и др.* Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов // Лаб. дело. — 1989. — № 10. — С. 5—18.
- [6] *Кочетов А.Г., Кобалава Ж.Д., Дроздов В.Н. и др.* Комплексная интерпретация агрегатограмм для оценки функциональной активности тромбоцитов у больных гипертонической болезнью // Клин. лаб. диагностика. — 1999. — № 4. — С. 43—45.
- [7] *Craft RM Chavez JJ, Bresee SJ et al.* A novel modification of the thrombelastograph assay, isolating platelet function, correlates with optical platelet aggregation // J Lab Clin Med. — 2004. — № 143. — P. 301—309.
- [8] *Topol EJ, Gum P, Kottke-Marchant K.* Determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease // J Am Coll Cardiol. — 2003. — № 42. — P. 1336—1337.
- [9] *Born G.* Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and reversal // Nature. — 1962. — Vol. 194. — № 9. — P. 927—929.

STANDARDIZATION OF TURBIDIMETRIC METHOD STUDY RATING OF PLATELET AGGREGATION ACTIVITY

**A.G. Kochetov, O.V. Lyang, R.R. Politidis,
P.P. Ogurtsov, A.D. Djappuev**

Department of Hospital Therapy
with the course of clinical laboratory diagnostic
Medical faculty

Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklai Str., 8, Moscow, Russia, 117198

Investigation of platelet aggregation is great importance in diagnostics of hemostasis, as well as in evaluating the effectiveness of antiplatelet therapy. The aim of this study was to standardize the most common currently turbidimetric method of platelet aggregation studies using different inducers of aggregation and their concentrations. Were examined 38 healthy donors. Represented by the standard types and calculated reference characteristics of the curves of aggregation for the laser aggregometry.

Key words: platelets, aggregation, turbidimetric method.