



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).

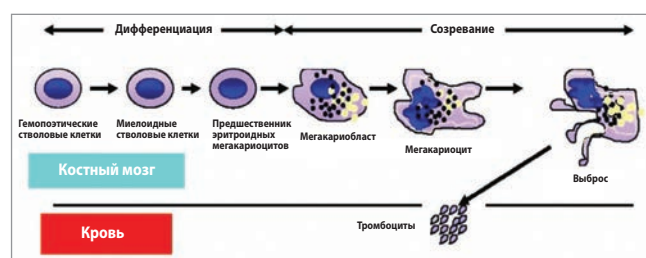


Рис. 2. Жизненный цикл тромбоцитов

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 – $180-350 \times 10^9/\text{л}$.

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.

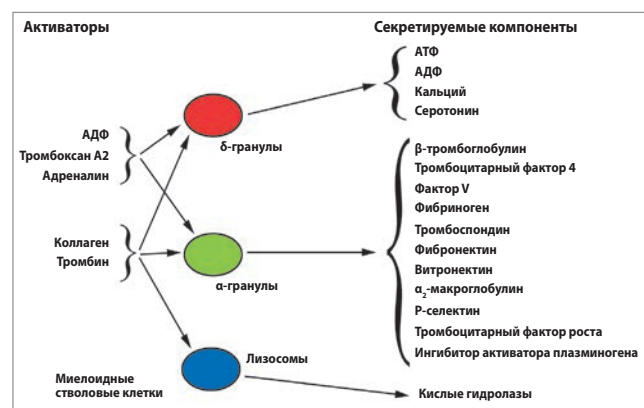


Рис. 3. Три вида гранул хранения в тромбоцитах (α -гранулы, δ -гранулы и лизосомы)

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 амебоцитами, 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.
1865 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», обнаруживающиеся 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. Dekhuyzen 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. Стандартизированного 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 A2, 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,

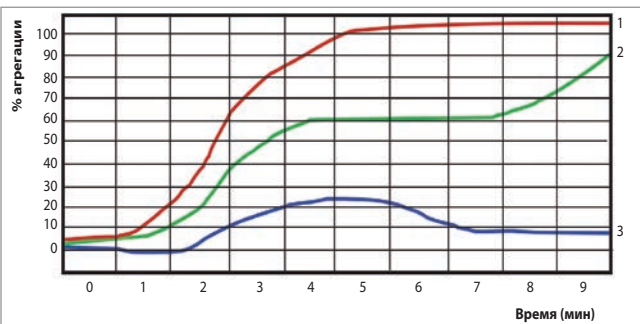


Рис. 4. Примеры агрегационных кривых:
1 – 10 мкМ АДФ: нормальный ответ, агрегация >60%;
2 – 5 мкМ АДФ: нормальный ответ, типичная бифазная кривая;
3 – 10 мкМ АДФ: патология, агрегация <60%.

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).

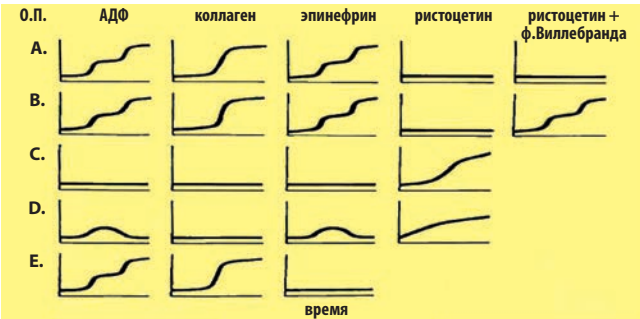


Рис. 6. Агрегатограммы тромбоцитов при различных заболеваниях:
А – болезнь Бернара-Сулье; В – болезнь Виллебранда;
С – тромбастения Гланцмана; D – болезни недостаточности пула хранения; E – синдром серых тромбоцитов

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 функций тромбоцитов	Принцип метода	Применение метода
Время кровотечения	Время между началом и остановкой кровотечения	Скрининговый тест для диагностики in vivo
Световая трансмиссионная агрегометрия	Оптический метод с использованием различных индукторов агрегации	Скрининговый тест для оценки риска кровотечения, диагностика дефектов гликопротеинов тромбоцитов. Мониторинг ответа тромбоцитов на антитромбоцитарные 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 антитромбоцитарные 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 in vitro 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 антитромбоцитарные 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.