



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 импедансный метод 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:

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

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 тромбоиновый 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

Tecm 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 аспирин соответствует 550 ARU, т.е. значение ARU <550 у пациента, получающего аспирин, соответствует достигнутому терапевтическому эффекту.

Если после прекращения приема аспирин 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, которое, 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.

Таблица 6. Референтные значения для анализатора PFA-100		
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 афибриногенемией.

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.

Memog ELISA

Метод ELISA используется для определения показателей активации тромбоцитов в плазме, таких как растворимый Р-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.

Таблица 7. Дифференциальная диагностика нарушения функции тромбоцитов в зависимости от используемых картриджей с использованием анализатора INNOVANCE PFA-200			
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 ACK или ACK-подобные влияния	↑	Норма или умеренно увеличено	Минимальное увеличение
Определение эффекта ингибиторов рецепторов P2Y12	Норма	Норма	↑

Що більше підходить Вам?



Made in USA!

Світовий лідер з виробництва одягу для лікарів. 40 років успіху у всьому світі. Віднедавна — в Україні.



cherokee

Одеса, вул. Середньофонтанська, 19г,
ТЦ «Кристал», тел.: (068) 337-87-32



Made in Ukraine

Пошито з інноваційних матеріалів за модними та зручними фасонами на сучасному устаткуванні.



Doktoram

Київ, вул. Басейна, 4-10, ТЦ «Бессарабський квартал», тел.: (044) 209-49-86

КУПУЙТЕ
ТУТ!

Інтернет-магазин — **www.doktoram.com**
тел.: (098) 106-03-03



Doktoram.com

сучасний медичний одяг

Місце, де можна придбати
найкращий медичний одяг
американського
та українського брендів

Переваги для лікарів

- Дихаючі тканини
- Великий вибір фасонів
- Широка палітра кольорів
- Регулярне оновлення колекцій
- До 200 прань
- Якість і комфорт для лікарів
- Доставка по всій Україні
- Зручна та безпечна покупка



Здоров'я[®] України[©]

МЕДИЧНА ГАЗЕТА

На нашому сайті

www.health-ua.com

повна версія всіх
номерів
медичної газети
«Здоров'я України»:
загальнотерапевтичні
та всі тематичні
номери





СПІВПРАЦЯ З «СІНЕВО» — СУЦІЛЬНИЙ ПЛЮС ДЛЯ ЛІКАРЯ

Повний спектр
досліджень
на кращому
світовому
обладнанні



Міжнародний контроль
якості досліджень
і довіра понад 20 тисяч
лікарів в Україні



20000
ЛІКАРІВ



72 медичні
лабораторії
у 16 країнах Європи



Інформаційна підтримка
та зручні онлайн сервіси
для лікарів і пацієнтів

0 800 50 70 30 безкоштовно зі стаціонарних телефонів по території України

044 20 500 20

www.synevo.ua



[synevolab](https://www.facebook.com/synevolab)