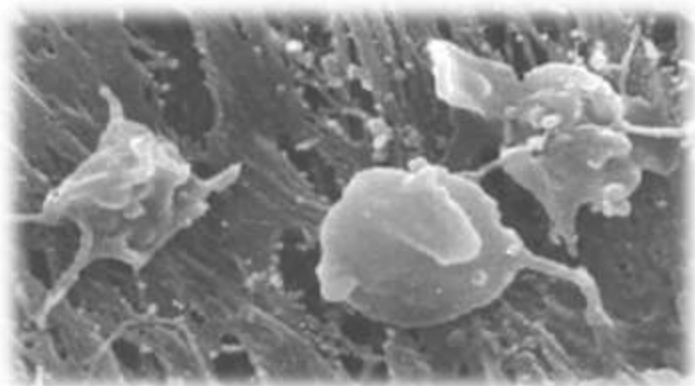




Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Донецкий государственный медицинский  
университет имени М. Горького» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

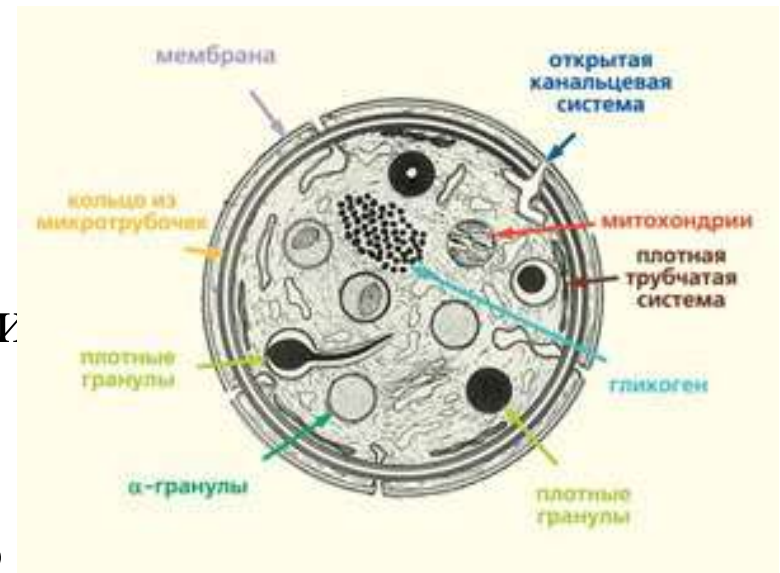
# Исследование агрегационной функции тромбоцитов



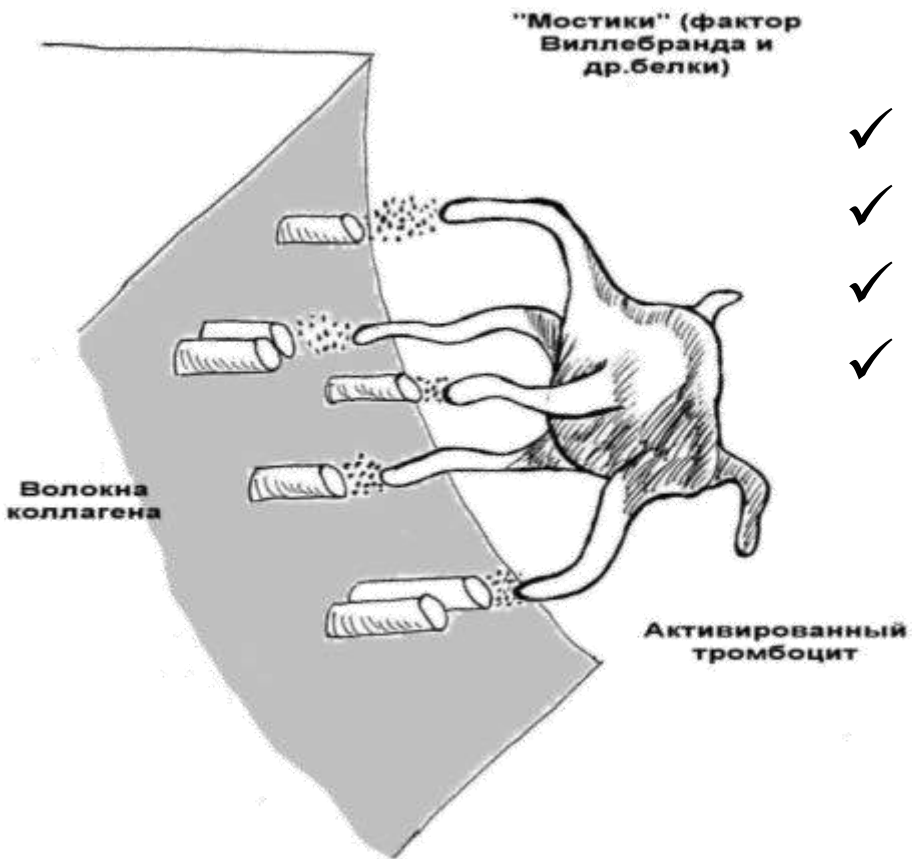
к.м.н., доц. Баешко Г.И.  
к.м.н., доц. Бордюгова Е.В.  
асс. Марченко Е.Н.

# Общие понятия

- Тромбоциты – плоские безъядерные клетки, диаметр 1-5 мкм.
- Образуются из мегакариоцитов костного мозга.
- Содержание тромбоцитов в крови здорового человека составляет 150-420 Г/л.
- Циркуляция в кровотоке – от 7 до 10 суток.
- Разрушение происходит в печени и селезенке.

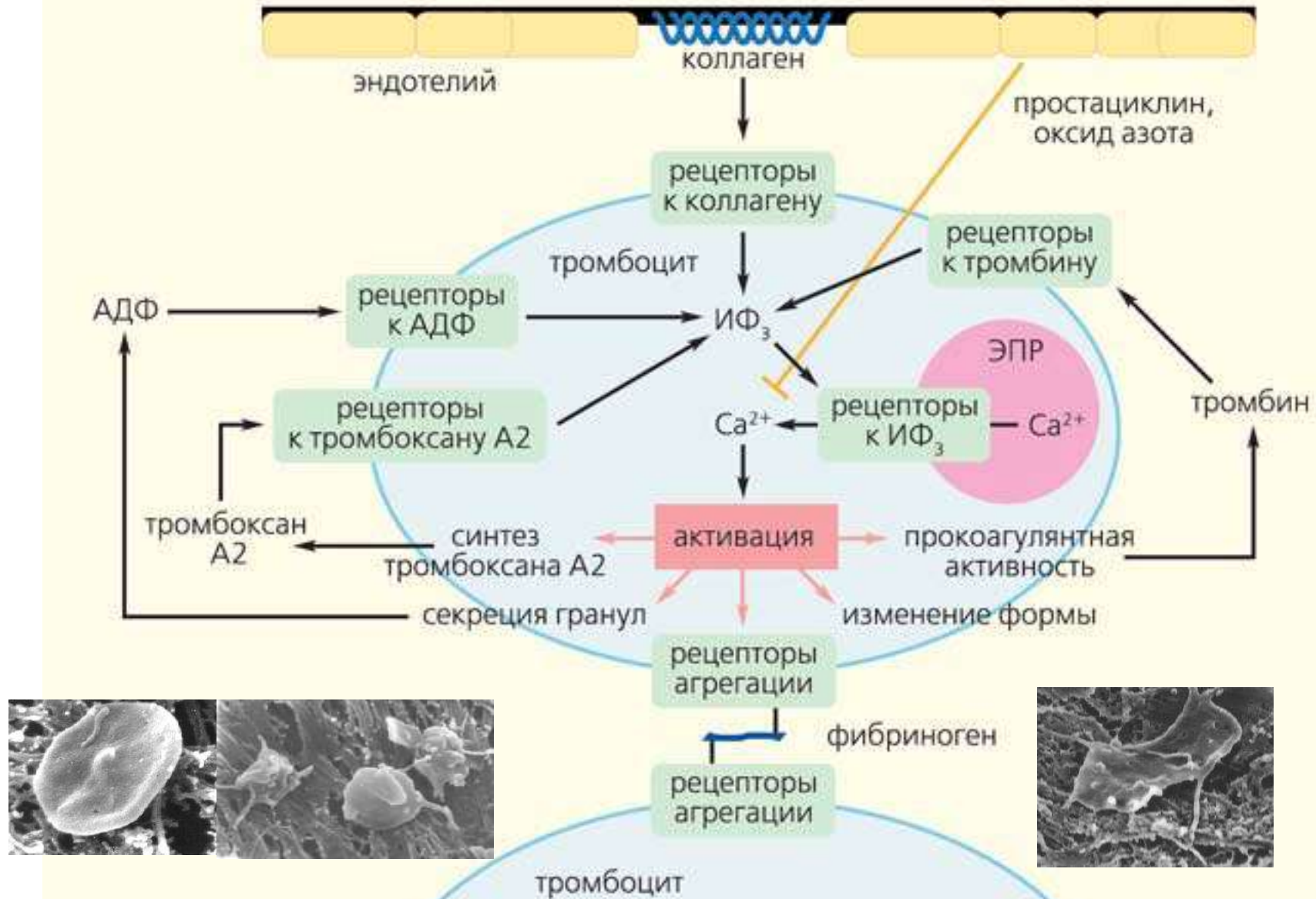


# Функции тромбоцитов



- ✓ адгезивно-агрегационная;
- ✓ ангиотрофическая;
- ✓ сорбционно-транспортная;
- ✓ дегрануляция и освобождение БАВ.

# Основные пути активации тромбоцита

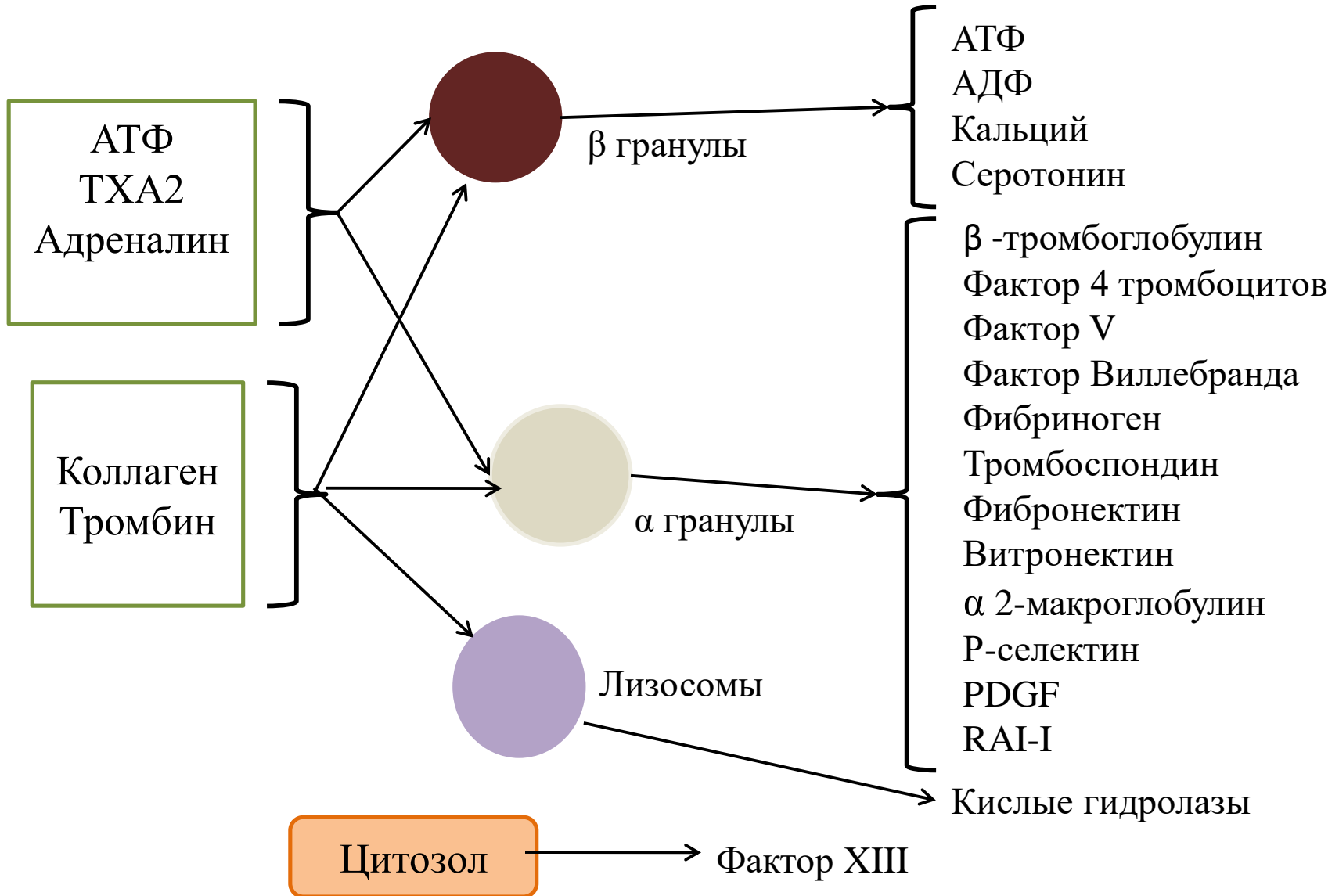


*ИФ $_3$  — инозитолтрифосфат, ЭПР — эндоплазматический ретикулум.*

# Факторы тромбоцитов

*Активаторы*

*Секретируемые компоненты*



# Активаторы тромбоцитов

## Слабые

- ✓ АДФ,
- ✓ адреналин,
- ✓ вазопрессин,
- ✓ серотонин.

## Сильные

- ✓ коллаген,
- ✓ тромбин,
- ✓ высокие дозы АДФ.

Двухфазная кривая.  
Обусловлена усилением агрегации после выделения хранимых в гранулах БАВ.

Монофазная кривая. После мембранной стимуляции происходит необратимая агрегация тромбоцитов.

# Виды агрегации

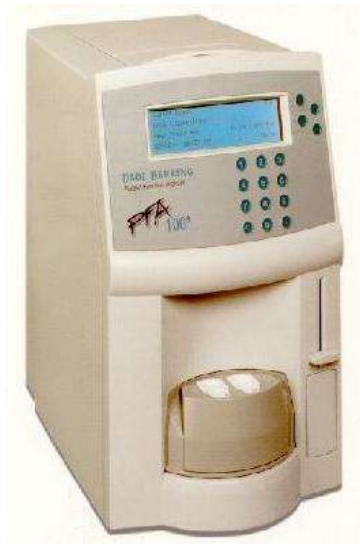
- Спонтанная — определяется без вещества-индуктора. Для определения агрегационной активности тромбоцитов забранную из вены кровь помещают в пробирку, которую закладывают в специальный прибор, где её прогревают до температуры 37°C;
- Индукцированная — исследование проводится с добавлением в плазму индукторов. Как правило, используют четыре вещества: АДФ, коллаген, адреналин и ристомицин. Метод применяется для определения ряда заболеваний крови;
- Низкая — встречается при патологиях кровеносной системы. Снижение уровня тромбоцитов может привести к различным кровотечениям.
- Повышенная — приводит к увеличенному тромбообразованию.

# Методы исследования функции тромбоцитов

Методы исследования функции тромбоцитов	Принцип метода	Применение метода
Время кровотечения	Время между началом и остановкой кровотечения	Скринговый тест для диагностики <i>in vivo</i>
Световая трансмиссионная агрегометрия	Оптический метод с использованием различных индукторов агрегации	Скрининговый тест для оценки риска кровотечения, диагностика дефектов гликопротеинов тромбоцитов. Мониторинг ответа тромбоцитов на 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 <i>in vitro</i> прохождения цельной крови в специальном картридже	Риск кровотечения, тромботический 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 $\beta$ -тромбоглобулина, тромбоцитарного фактора 4, растворимого P-селектина, тромбоксанов и др.



# Агрегометры



Анализатор функции тромбоцитов  
«PFA-100» (Siemens)



Оптический агрегометр  
CHRONO-LOG 490. США.



Агрегометр Multiplate (Германия)  
Импедансная агрегометрия.

# Метод оптической агрегометрии

Определение степени агрегации тромбоцитов изучают с помощью анализатора агрегации тромбоцитов.

- «Золотым стандартом» оценки функциональной активности тромбоцитов был признан метод оптической агрегометрии.
- Принцип метода заключается в регистрации агрегации тромбоцитов в результате активации данного процесса добавлением индуктора агрегации (АДФ, коллаген, адреналин и др.) к плазме, обогащенной тромбоцитами.
- Мерой определения процесса является графически регистрируемое падение оптической плотности плазмы крови в результате потребления тромбоцитов в агрегатах, образующихся под воздействием индукторов агрегации.
- С помощью этого метода возможно оценивать как повышенную, так и сниженную агрегационную активность тромбоцитов.

# Особые требования

- ◆ Отмена препаратов, влияющих на агрегацию за 21 день.
- ◆ Исследование проводят в плазме богатой тромбоцитами (PRP).
- ◆ Желательно содержание тромбоцитов от 200 кл/нл.
- ◆ На протяжении 3 дней до забора крови надо соблюдать диету.

Исключить из рациона чеснок, кофе, куркуму, имбирь, алкоголь, лук и рыбий жир – продукты, влияющие на агрегационную активность клеток крови.

- ◆ За 12 часов до забора крови следует воздержаться от приема пищи.
- ◆ Кровь следует брать между 7-9 часами утра.
- ◆ Жгут не должен лежать на руке дольше, чем 2 минуты, во избежание контактной активации тромбоцитов.
- ◆ Хранение образцов цельной крови допускается до 3 часов.
- ◆ Богатую тромбоцитами плазму исследуют не позднее 1-2 часов после получения.

# Факторы, влияющие на агрегацию тромбоцитов

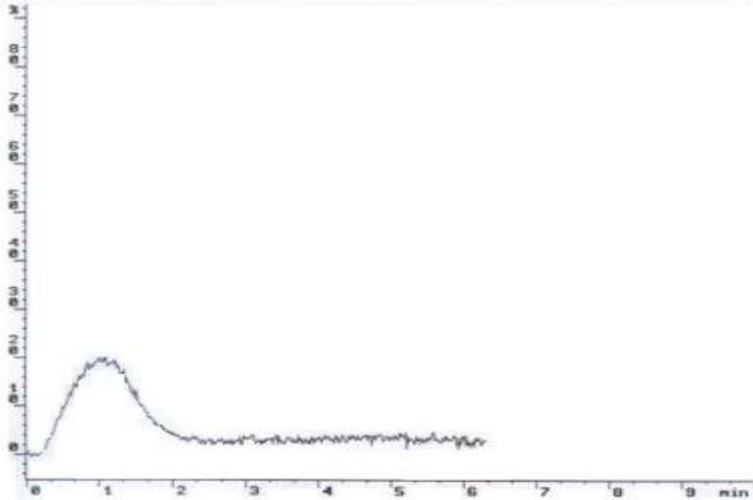
## Усиливают:

- препараты Са
- этамзилат
- адроксон
- курение

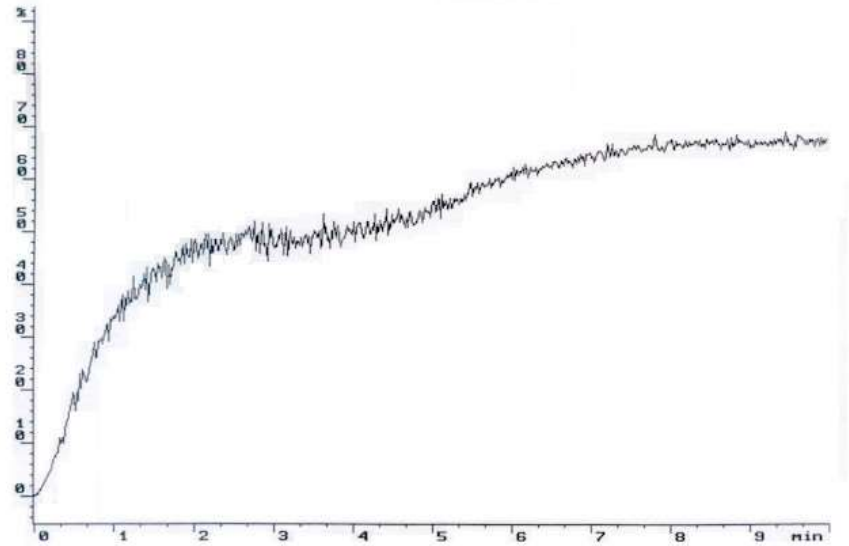
## Снижают:

- антиагреганты
- адrenoблокаторы
- блокаторы кальциевых каналов
- нефракционированный гепарин и низкомолекулярные гепарины
- антибиотики пенициллин, карбенициллин (тромбоцитопения и нарушение функции)
- витамины С и Е
- диета(рыбная в течение нескольких недель)

# Агрегатограмма

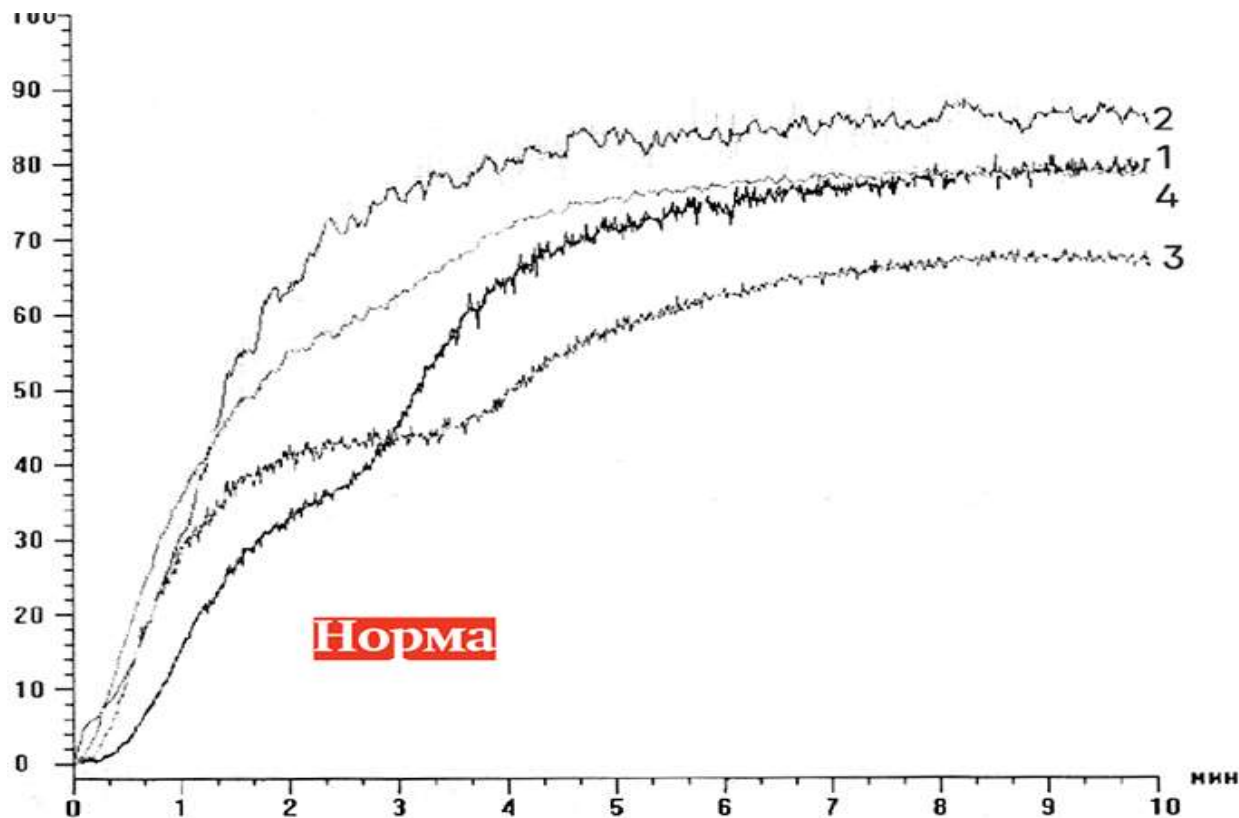


АДФ-агрегация ( $0,5 \times 10^{-6}$  М)  
Нормальная кривая. Первичная агрегация с  
деагрегацией.



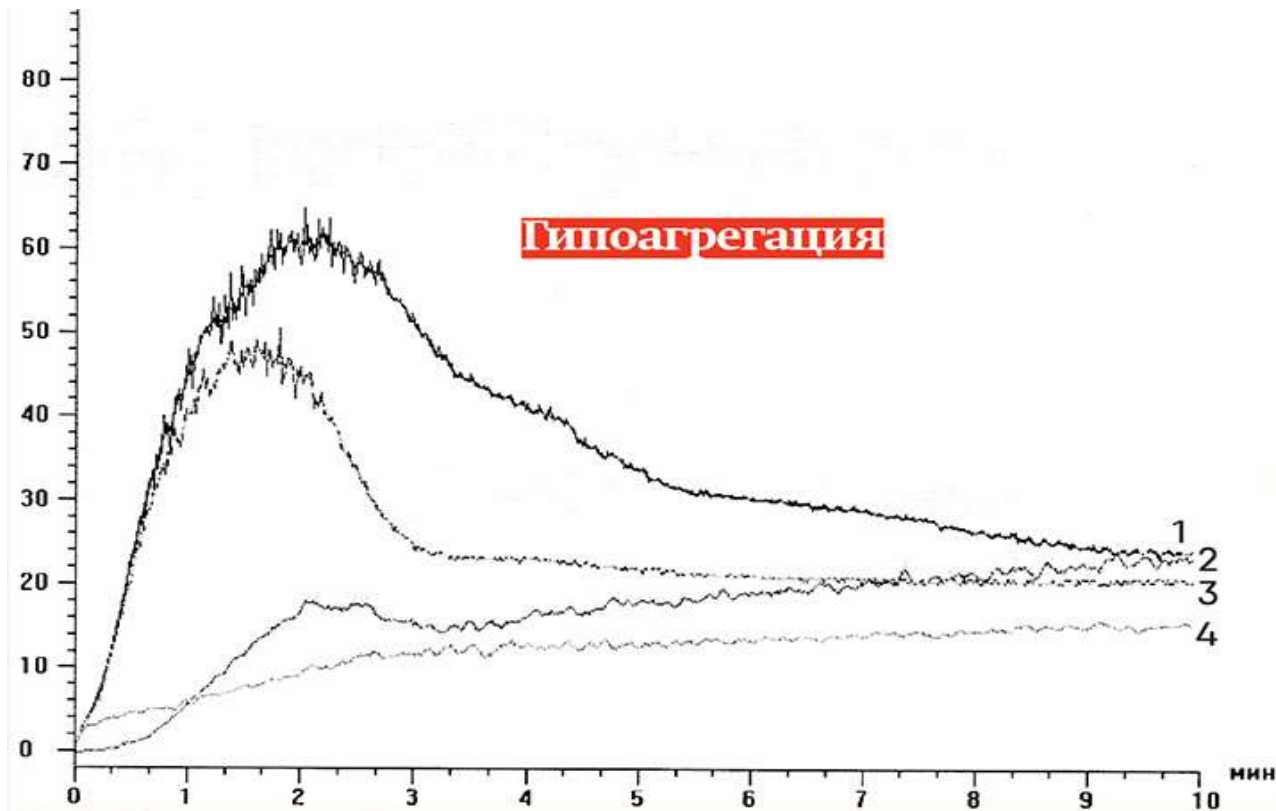
АДФ-агрегация ( $1,5 \times 10^{-6}$  М)  
Нормальная кривая. Двухфазная  
агрегация

# Агрегатограмма 1



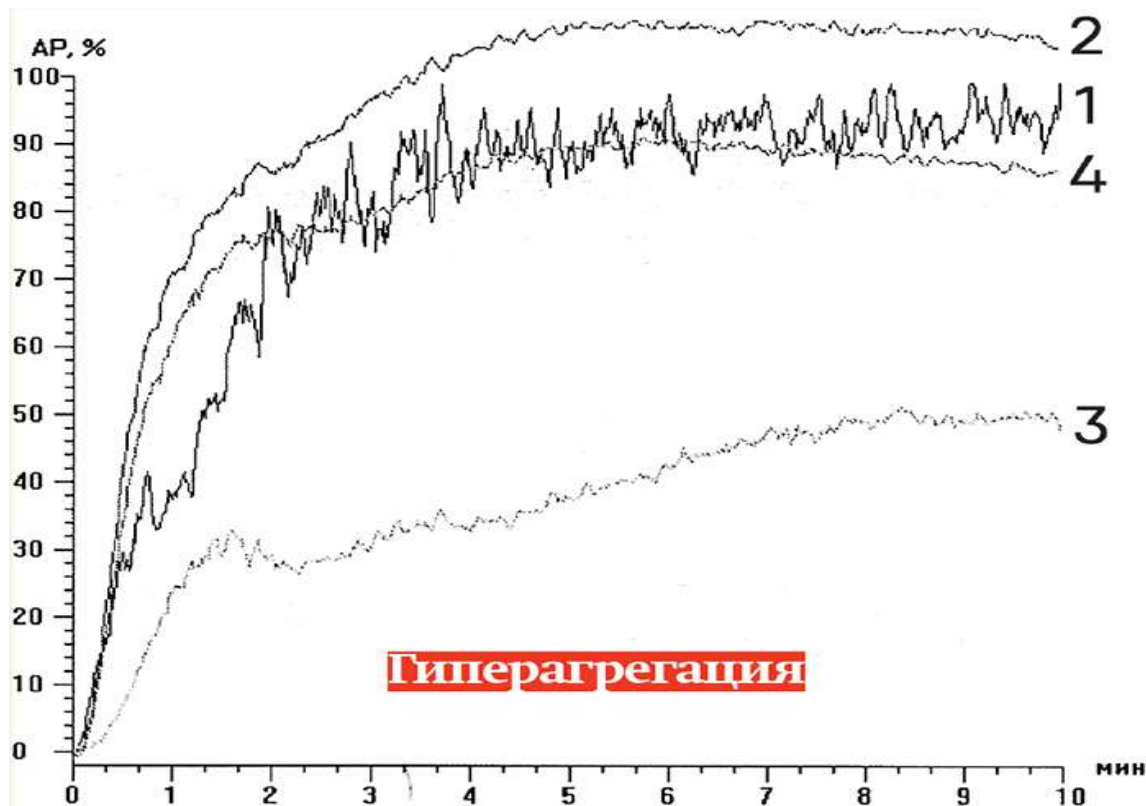
№	Реагент	Результат	Норма, %
1	Адреналин, мкМ 5,0	80,8	73–86
2	Ристоцетин, мг/мл 1,0	88,6	55–100
3	АДФ, мкМ 2,5	68,0	66–84
4	АДФ, мкМ 1,5	79,8	55–74

# Агрегатограмма 2



№	Реагент	Результат	Норма, %
1	АДФ, мкМ 2,5	61,8	66-84
2	Адреналин, мкМ 5,0	24,0	73-86
3	АДФ, мкМ 1,5	48,1	55-74
4	Ристоцетин, мг/мл 1,0	15,9	55-100

# Агрегатограмма 3



№	Реагент	Результат	Норма, %
1	Адреналин, мкМ 5,0	80,8	73–86
2	АДФ, мкМ 2,5	108,7	66–84
3	АДФ, мкМ 0,5	51,3	13–26
4	АДФ, мкМ 1,5	91,0	55–74



# Импедансный метод оценки агрегации

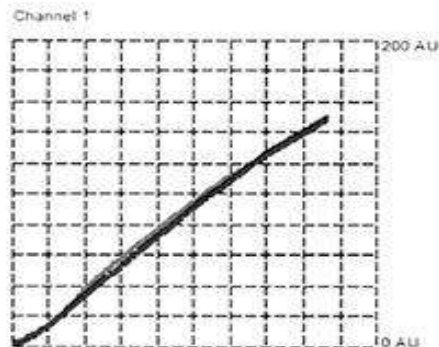
- ❖ Исследуются изменения сопротивления между двумя электродами, которые погружены в цельную кровь.
- ❖ При добавлении в среду агониста происходит образование агрегатов с тромбоцитами, осажденными на электродах агрегометра, что, в свою очередь, приводит к увеличению сопротивления (импеданса) системы.
- ❖ Способность тромбоцитов к агрегации оценивают на основе оценки изменения импеданса.
- ❖ Метод не требует предварительной подготовки, центрифугирования и получения обогащенной плазмы.
- ❖ Импедансная агрегатометрия максимально показывает физиологическое состояние и то, что происходит в крови пациента на данный момент.
- ❖ Метод позволяет выполнять большее количество исследований за меньший период времени.

# Агрегатограмма

## Норма

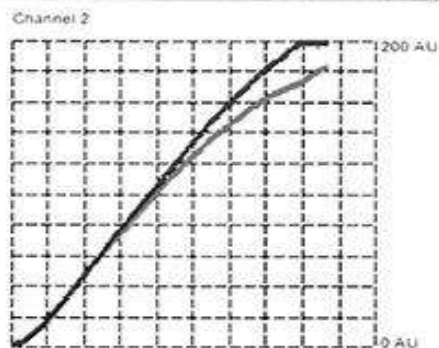
**Patient ID :** 18-06-01  
KK-ГЕМ (10:00)  
**Test name :** ADPtest (Hirudin blood). V1 [ud]  
**Measurement started :** 18. Jun. 2021. 08:55 (Measuring duration 6:00 min)  
**Area under the curve :** 699 AU\*min. (530 - 1220)

Reference: 530.0 - 1220.0 AU\*min  
Target: 300.0 - 500.0 AU\*min



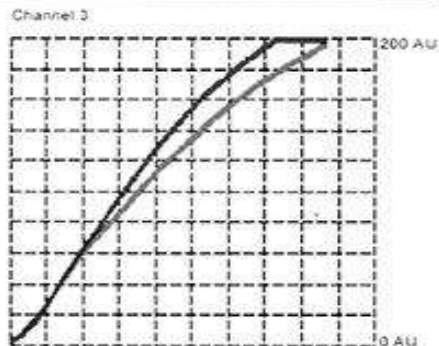
**Patient ID :** 18-06-01  
KK-ГЕМ (10:00)  
**Test name :** ASPtest (Hirudin blood). V1 [ud]  
**Measurement started :** 18. Jun. 2021. 08:55 (Measuring duration 6:00 min)  
**Area under the curve :** 955 AU\*min. (740 - 1360)

Reference: 740.0 - 1360.0 AU\*min  
Target: 200.0 - 300.0 AU\*min



**Patient ID :** 18-06-01  
KK-ГЕМ (10:00)  
**Test name :** TRAPtest (Hirudin blood). V1 [ud]  
**Measurement started :** 18. Jun. 2021. 08:55 (Measuring duration 6:00 min)  
**Area under the curve :** 1072 AU\*min. (940 - 1560)

Reference: 940.0 - 1560.0 AU\*min  
Target: 300.0 - 500.0 AU\*min

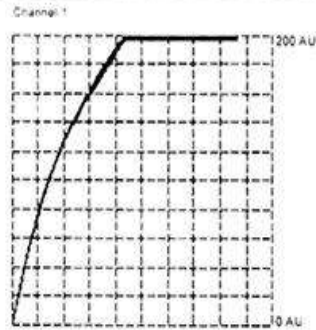


# Агрегатограмма

## Гиперагрегация

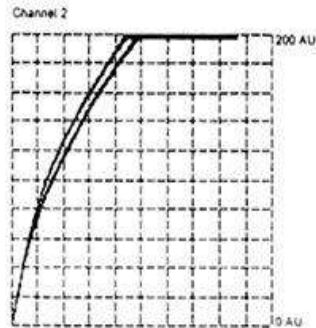
Patient ID : 17-02-04  
KK-rem ( 10 00 )  
Test name : ADPtest (Hirudin blood). V1 [ud]  
Measurement started : 17. Feb. 2021. 09 10 (Measuring duration 6 00 mn)  
Area under the curve : 1671 AU\*min. (530 - 1220)

Reference 530 0 - 1220 0 AU\*min  
Target 300 0 - 500 0 AU\*min



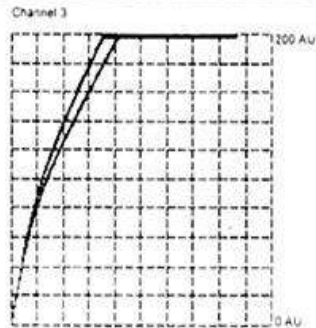
Patient ID : 17-02-04  
KK-rem ( 10 00 )  
Test name : ASPtest (Hirudin blood). V1 [ud]  
Measurement started : 17. Feb. 2021. 09 10 (Measuring duration 6 00 mn)  
Area under the curve : 1563 AU\*min. (740 - 1360)

Reference 740 0 - 1360 0 AU\*min  
Target 200 0 - 300 0 AU\*min



Patient ID : 17-02-04  
KK-rem ( 10 00 )  
Test name : TRAPtest (Hirudin blood). V1 [ud]  
Measurement started : 17. Feb. 2021. 09 10 (Measuring duration 6 00 mn)  
Area under the curve : 1782 AU\*min. (940 - 1560)

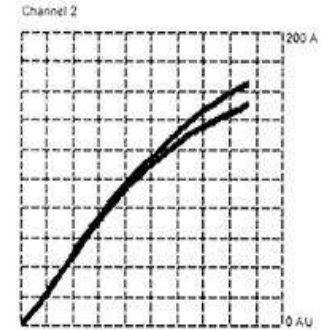
Reference 940 0 - 1560 0 AU\*min  
Target 300 0 - 500 0 AU\*min



## Гипоагрегация (в аспи-тесте)

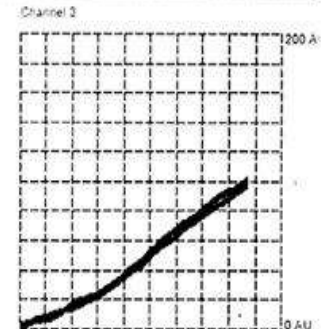
Patient ID : 24-09-03  
KK-rem ( 10 00 )  
Test name : ADPtest (Hirudin blood). V1 [ud]  
Measurement started : 24. Sep. 2021. 09 13 (Measuring duration 6 00 mn)  
Area under the curve : 832 AU\*min. (530 - 1220)

Reference 530 0 - 1220 0 AU\*min  
Target 300 0 - 500 0 AU\*min



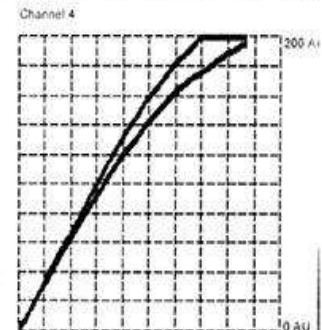
Patient ID : 24-09-03  
KK-rem ( 10 00 )  
Test name : ASPtest (Hirudin blood). V1 [ud]  
Measurement started : 24. Sep. 2021. 09 14 (Measuring duration 6 00 mn)  
Area under the curve : 390 AU\*min. (740 - 1360)

Reference 740 0 - 1360 0 AU\*min  
Target 200 0 - 300 0 AU\*min



Patient ID : 24-09-03  
KK-rem ( 10 00 )  
Test name : TRAPtest (Hirudin blood). V1 [ud]  
Measurement started : 24. Sep. 2021. 09 14 (Measuring duration 6 00 mn)  
Area under the curve : 1111 AU\*min. (940 - 1560)

Reference 940 0 - 1560 0 AU\*min  
Target 300 0 - 500 0 AU\*min



# Агрегатогаммы при врожденных нарушениях функции тромбоцитов

Болезнь (синдром)	Ретенция тромбо цитов	Агрегация под действием				Ретракци я сгустка
		АДФ, адреналин		Коллаген	Ристоцетин/ Ристомидин	
		Первая волна	Вторая волна			
<b>Тромбастения Гланцманна</b>	снижена	снижена	снижена	снижена	норма	нарушена
<b>Аспирино- подобный синдром</b>	норма/ снижена	норма	снижена	снижена	норма	норма
<b>Болезнь (недостаточность ) пула хранения</b>	снижена	норма	снижена	снижена	норма	норма
<b>Болезнь (синдром) Бернара -Сулье</b>	снижена	норма/ снижена	норма/ снижена	норма	снижена	норма
<b>Болезнь (синдром) Виллебранда</b>	снижена	норма	норма	норма	снижена	норма



*Спасибо за внимание!*