

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ. ФОКУС НА СПОНТАННУЮ АГРЕГАЦИЮ

КОЗЛОВСКИЙ В.И.*, КОВТУН О.М.*, СЕРОУХОВА О.П.*, ДЕТКОВСКАЯ И.Н.***, КОЗЛОВСКИЙ И.В.*

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

**УЗ «Витебский областной клинический родильный дом»

Резюме.

В обзорной статье приведены современные представления и строения и функции тромбоцитов, механизмах их стимулированной и спонтанной агрегации. Особое внимание уделено методам выявления спонтанной агрегации тромбоцитов. Показано, что спонтанная агрегация тромбоцитов имеет место при многих заболеваниях, увеличивая риск сердечно-сосудистых катастроф и других тромботических осложнений. В исследовании авторов спонтанная агрегация тромбоцитов наблюдалась у 66% пациентов с артериальной гипертензией (АГ) II степени и 48,4% - с АГ II степени в сочетании с хронической обструктивной болезнью легких различной степени тяжести и была ассоциирована с гиперхолестеринемией.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов.

Abstract.

Modern conceptions of the structure and function of platelets, mechanisms of their stimulated and spontaneous aggregation are presented in this review article. Particular attention is paid to methods of detecting spontaneous aggregation of platelets. It has been shown that spontaneous platelet aggregation occurs in many diseases, increasing the risk of cardiovascular events and other thrombotic complications. In their study the authors observed spontaneous platelet aggregation in 66% of patients with arterial hypertension (AH) stage II and in 48,4% of cases with AH stage II combined with chronic obstructive pulmonary disease of various degree of severity, and it was associated with hypercholesterolemia.

Key words: aggregation of platelets.

В настоящее время показано, что повышение агрегации тромбоцитов является важным элементом патогенеза как развития, прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний, так и возникновения осложнений.

Механизмы активации тромбоцитов могут быть различными и зависят от состава плазмы крови, изменений функционального состояния и структуры мембран тромбоцитов. Значительная роль принадлежит и изменению функционального состояния эндотелия с утратой эндотелиальными клетками их дезагрегантных и антиадгезивных свойств. Показано, что при дисфункции эндотелия в крови повышен уровень адгезивных протеинов (intercellular adhesion molecule-1 [ICAM-

1], E-селектин [ELAM-1], vascular cell adhesion molecule-1 [VCAM-1], фактор фон Виллебранда [VWF], тромбомодулин) [10].

Особое значение имеет спонтанная агрегация тромбоцитов (САТ), когда избыток агрегатов тромбоцитов циркулирует в системном кровотоке. За этим следует целый ряд изменений и, прежде всего, в мелких сосудах.

Длительное повышение спонтанной агрегации тромбоцитов может приводить к ремоделированию сосудистой стенки и, прежде всего, мелких сосудов.

Строение тромбоцитов

В крови здорового человека при световой микроскопии различают четыре основные формы тромбоцитов [31]:

1. Нормальные (зрелые) тромбоциты (87,0±0,13%);
2. Юные (незрелые) тромбоциты (3,20±0,13%);
3. Старые тромбоциты (4,10±0,21%);
4. Формы раздражения (2,50±0,1%).

Поверхность тромбоцитов представлена двухслойной мембраной, состоящей из белков и липидов. Гликопротеины поверхности тромбоцитов играют ведущую роль в адгезии тромбоцитов к белкам субэндотелиального матрикса, во взаимодействии с лигандом (коллагеном и тромбином). На мембране тромбоцита представлены также рецепторы для фибронектина, ламинина, витронектина и фактора Виллебранда. Тромбоциты при активации экспрессируют также молекулы адгезии семейства селектинов. Аминосодержащий конец внеклеточной части этой молекулы содержит лектин, который обеспечивает взаимодействие тромбоцита с лейкоцитом. Утрата этого гликопротеина с поверхности клетки связана с процессом старения тромбоцитов *in vivo*.

В цитоплазме тромбоцита присутствует несколько типов гранул:

– крупные альфа-гранулы, содержащие гликопротеины (фибриноген, фибронектин, фактор Виллебранда), белки, связывающие гепарин (фактор 4 тромбоцитов, который также регулирует проницаемость сосудов, хемотаксис нейтрофилов и эозинофилов), факторы роста (тромбоцитарный фактор роста, трансформирующий фактор роста-β, фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста эпителия, фактор роста фибробластов, инсулинопод-

обный фактор роста), факторы свертывания (тромбопластин, фактор V и др.) и тромбоспондин – участвуя в процессах свертывания крови, воспаления, регенерации;

– плотные дельта-гранулы, содержащие АДФ, АТФ, Ca²⁺, серотонин, гистамин;

– лизосомы и микропероксисомы, содержащие протеолитические ферменты.

В крови тромбоциты циркулируют 5-11 дней, а затем разрушаются в печени, легких и селезенке.

Механизмы стимулированной агрегации тромбоцитов

Активацию и последующую агрегацию тромбоцитов вызывают различные по природе вещества (табл. 1): тромбин (один из мощнейших индукторов агрегации), коллаген, АДФ, адреналин, серотонин, простагландины P_gG₂ и P_gH₂, арахидоновая кислота, тромбоксан A₂, фактор активации тромбоцитов (ФАТ), а также вещества, отсутствующие в организме – форболовые эфиры, латекс, лектины, ионофор A23187, бактерии (порин *Salmonella typhimurium*, бактериальный липополисахарид [9] и пр.) и др.

Под воздействием индукторов агрегации происходит видоизменение формы тромбоцитов от дисковидной до сферической с образованием псевдоподий и склеивание их – адгезия тромбоцитов. Изменение морфологии тромбоцита обусловлено изменением цитоскелета клетки за счет сократительных белков, регулируемых уровнем кальция, за которым следует

Таблица 1 – Активаторы тромбоцитов

In vivo			In vitro
В норме		При патологии	
В крови в области поврежденного сосуда	В поврежденной стенке сосуда	В крови	
АДФ Адреналин Серотонин Вазопрессин Тромбин Плазмин Тромбоксан A ₂ Фактор фон Виллебранда	Коллаген Фактор фон Виллебранда	Протеолитические энзимы Антитромбоцитарные антитела Комплексы антиген-антитело Бактерии Вирусы Опухолевые клетки	АДФ Тромбин Синтетические аналоги тромбоксана A ₂ Ристомидин Коллаген Адреналин

выброс содержимого гранул во внеклеточное пространство.

Степень агрегации тромбоцитов и реакции высвобождения (выброса содержимого гранул в окружающую среду) зависит от природы агрегирующего агента и его дозы. При малой силе агрегирующего агента происходит только высвобождение содержимого плотных гранул, тогда как сильные агреганты инициируют выброс веществ из α -гранул и лизосом (реакция высвобождения).

Активацию тромбоцитов объясняют несколькими механизмами: образованием тромбоксана A_2 из арахидоновой кислоты; деградацией фосфатидилинозитолов до фосфатидной кислоты, связывающей кальций; образованием фактора активации тромбоцитов – лизолецитинового компонента фосфолипидов мембраны кровяных пластинок.

При активации тромбоциты связываются с молекулами адгезии, такими как фактор фон Виллебранда – ФВ (синтезируемый эндотелиоцитами и содержащийся в небольшом количестве в тромбоцитах), который

взаимодействует с гликопептидами Ib и Ia на поверхности тромбоцита. Этот фактор также участвует в тромбоцит-тромбоцитарном взаимодействии через связывание гликопротеина Ib/IIIa. Адгезия тромбоцитов, опосредованная ФВ, происходит наиболее интенсивно при высоких скоростях сдвига, т.е. в артериях. При многих заболеваниях, сопровождающихся острым и хроническим повреждением эндотелия (артериальная гипертензия, сахарный диабет, атеросклероз, опухоли различной локализации, гестоз и т.д.), уровень ФВ в крови значительно повышается.

При низком напряжении сдвига (в случае повреждения стенок крупных артерий, вен) тромбоциты присоединяются к коллагену непосредственно через коллагеновые рецепторы их плазматической мембраны – гликопротеины Ia-IIa (GPIa-IIa).

Общая схема активации тромбоцитов и основные эффекты острого и хронического повышения агрегационной активности тромбоцитов показаны на рисунке 1.



Рисунок 1 – Общая схема активации тромбоцитов и основные эффекты.

Примечание: АДФ – аденидинуклеотид; P_gG₂ & P_gH₂ – простагландины G₂ и H₂; ФАТ – фактор активации тромбоцитов; ФВ – фактор фон Виллебранда.

Спонтанная агрегация тромбоцитов и возможные механизмы ее возникновения

Кроме стимулированной агрегации тромбоцитов, выделяют так называемую спонтанную агрегацию. Изменение состава плазмы (повышение в крови уровня ряда биологически активных веществ) обуславливают повышенную способность тромбоцитов к формированию агрегатов.

Ниже приведены факторы, при которых повышается агрегация тромбоцитов.

Изменение напряжения сдвига. *In vivo* в условиях воздействия сил сдвига, превышающих нормальные (например, при повышении артериального давления), тромбоциты могут спонтанно активироваться без контакта с субэндотелием. Полагают, что это связано с повышением афинности ФВ к рецепторам тромбоцитов в этих условиях. Он связывается с гликопротеинами GP Ib и GP IIb/IIIa одновременно, приводя к образованию подвижных тромбоцитарных агрегатов. Усиливают этот процесс АДФ и адреналин. Механизм этого действия неясен. Исследования показали, что ингибирование циклооксигеназы аспирином оказывает небольшое влияние на агрегацию тромбоцитов под воздействием напряжения сдвига, а агенты, повышающие уровень внутриклеточной цАМФ, такие, как простагландин, ингибируют механически индуцированную агрегацию [28]. Кроме того, значительное воздействие сил сдвига на эндотелий приводит к его денудации с обнажением коллагена.

Увеличение количества рецепторов на поверхности тромбоцитов. В исследовании Сироткиной О.В. и коллег спонтанная агрегация тромбоцитов коррелировала с количеством GP IIb/IIIa на поверхности тромбоцитов ($r=0,39$, $p<0,05$) [38].

Разрушение клеток крови (внутрисосудистый гемолиз). Наличие повышенного количества старых тромбоцитов, склонных к разрушению в сосудистом русле и выбросом биологически активных веществ, также может быть ответственно за развитие спонтанной агрегации [1].

В развитие САТ существенный вклад вносят другие клеточные элементы крови: эритроциты и лейкоциты. Ряд заболеваний сопровождается структурными изменениями мембран

эритроцитов, снижением их деформируемости и повышенным разрушением «жестких» эритроцитов в системном кровотоке, прежде всего, в местах наибольших гемодинамических нагрузок. Высвобождаемые из разрушенных эритроцитов биологически активные вещества, в частности АДФ, активируют тромбоциты и могут приводить к их агрегации. Наличие повышенной хрупкости эритроцитов коррелирует со спонтанной агрегацией тромбоцитов [11].

Повышение адгезии моноцитов приводит к развитию дисфункции эндотелия и последующей активации тромбоцитов [10].

Влияние стабилизаторов. У некоторых пациентов может наблюдаться спонтанная агрегация тромбоцитов или так называемая ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения. У таких лиц точный подсчет числа тромбоцитов может быть осуществлен при взятии крови с цитратом в качестве антикоагулянта. Агрегация тромбоцитов может быть и с другими реагентами, такими, как гепарин или цитрат. Эти антикоагулянты также могут приводить к структурным изменениям клеток. Многие исследователи предлагают использовать только один стандартный антикоагулянт - K_2 ЭДТА в концентрации 1,5-2,2 мг на 1 мл крови. Однако и это не спасает от появления артефактов. При наличии аутоантител к тромбоцитам ЭДТА индуцирует агрегацию тромбоцитов, что проявляется псевдотромбоцитопенией.

Остается спорным вопрос об участии тромбосана A_2 в спонтанной агрегации тромбоцитов [17, 22].

Методы исследования спонтанной агрегации тромбоцитов

Большинство методов исследования САТ можно разделить по принципу из выполнения на две основные группы: 1) оптические (измерение оптической плотности суспензии тромбоцитов), 2) визуальные (непосредственная морфологическая оценка агрегированных тромбоцитов или изменение их количества). Оценивают как наличие агрегатов тромбоцитов в исследуемой плазме или цельной крови, так и агрегационную активность тромбоцитов в ответ на неспецифические стимулы (длительное вращение в центрифуге, встряхивание). Иногда наличие САТ оценивают по степени их дезагрегации.

Методы оценки агрегационной активности тромбоцитов в образце цельной крови позволяют учитывать клеточное и плазменное окружение тромбоцитов, т.е. в условиях, приближенных к физиологическим; нет необходимости центрифугировать кровь и, следовательно, подвергать дополнительному механическому воздействию тромбоциты; выраженная гиперлипидемия не влияет на точность результатов исследования в отличие от оптических методов.

Оптические методы

Наиболее распространенным методом оценки как индуцированной, так и спонтанной агрегации тромбоцитов является турбидиметрический метод Борна [3], основанный на исследовании изменений оптической плотности плазмы. Изменение оптических свойств исследуемого раствора в процессе агрегации тромбоцитов обусловлено уменьшением общей рассеивающей поверхности клеток в результате их склеивания друг с другом.

При анализе любых агрегатограмм оценивают общий характер агрегации (одноволновая, двухволновая; полная, неполная; обратимая, необратимая), степень агрегации (достижение максимальной агрегации), ско-

рость агрегации (изменение оптической плотности плазмы за первую минуту или угол наклона кривой на этапе бурной агрегации).

Метод Friedlander (PAT III). Из цитратной крови, взятой из локтевой вены, сразу готовится богатая тромбоцитами плазма путем центрифугирования при комнатной температуре в течение 10 минут при 1000 оборотах в минуту. Прогревают полученную плазму в течение 90 секунд при температуре 37°C и помещают пробирку с плазмой в агрегометр. Агрегация тромбоцитов измеряется турбидиметрическим способом. После прогревания в кювету опускают мешалку, вращающуюся со скоростью 4000 об./мин. Ведется непрерывная запись агрегации в течение 10 минут, оценивается разница между первоначальной и конечной оптической плотностью. Агрегация считается спонтанной, если изменения в оптической плотности составляют 10 и более единиц. Измеряется время спонтанной агрегации как время от начала агрегации до точки, при которой оптическая плотность достигает 20 единиц [1].

Авторы отмечают, что спонтанная агрегация выявлялась, если концентрация тромбоцитов в плазме составляла больше 320 000/мл. Выше этого уровня степень агрегации была пропорциональна количеству тромбо-

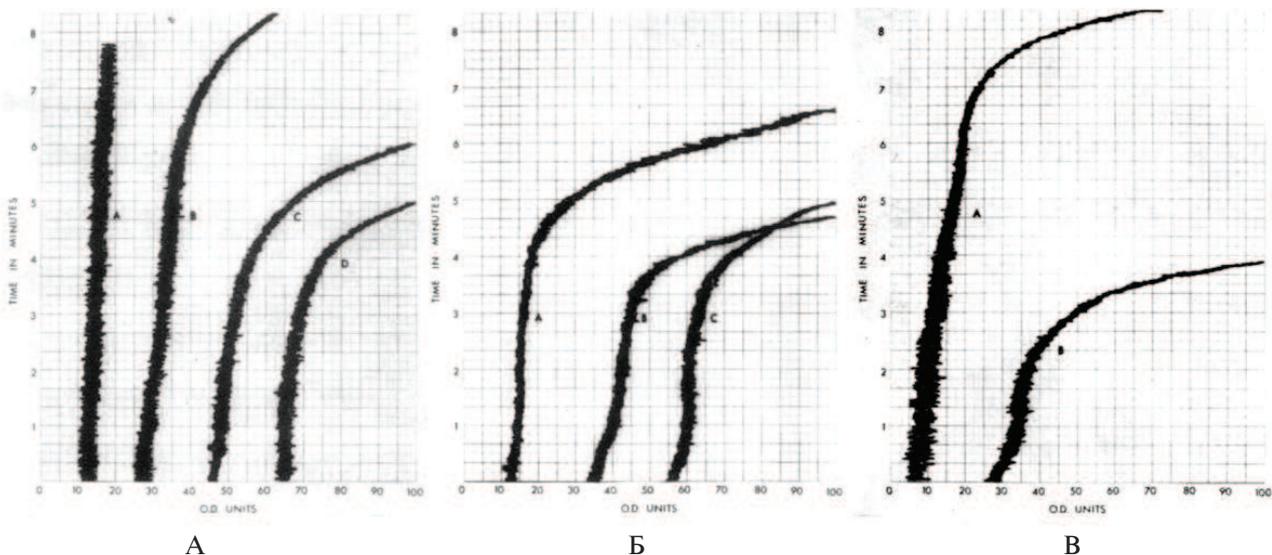


Рисунок 2 – Изменение интенсивности САТ при различных условиях: А – влияние концентрации тромбоцитов на спонтанную агрегацию (соотв. 280 000, 325 000, 375 000 и 495 000 кл/мм³); Б – влияние скорости вращения центрифуги на САТ (соотв. 1000, 2000 и 4000 об./мин); В – влияние времени отстаивания богатой тромбоцитами плазмы при 20°C (соотв. сразу после взятия и через 2 часа) [1].

цитов (рис. 2А) [1]. Время спонтанной агрегации было обратно пропорционально скорости вращения мешалки (рис. 2В), а также времени исследования: 5-10 минут тотчас после взятия до 3-5 минут, если богатая тромбоцитами плазма находилась при комнатной температуре в течение 2 часов (рис. 2Б) [1]. Однако если забор плазмы осуществлялся из цельной крови, то через 2 часа хранения при комнатной температуре спонтанная агрегация тромбоцитов не определялась. Свободный гемоглобин в этих образцах не был выявлен.

Если в богатой тромбоцитами плазме определялась спонтанная агрегация, то индуцированная агрегация при добавлении АДФ, адреналина, норадреналина, коллагена или тромбина также характеризовалась чрезмерным ответом. Добавление гепарина к богатой тромбоцитами плазме не тормозило спонтанной агрегации [1].

В бедной тромбоцитами плазме спонтанная агрегация не происходила, хотя при ее центрифугировании и получении богатой тромбоцитами плазмы этот феномен встречался. Это предполагает, что агрегирующий фактор выделяется из тромбоцитов в процессе исследования. Этим фактором является АДФ, который запускает агрегацию, а выделенный из тромбоцитов вторично АДФ поддерживает этот процесс [1].

Другой способ определения спонтанной агрегации тромбоцитов состоит в оценке угла наклона кривой агрегации. Если угол α превышал 60° , то такую агрегацию считали сильной; если меньше 40° – отсутствие спонтанной агрегации [5]. В другом исследовании оценивалось время наступления САТ (критерий – увеличение оптической плотности на 20% и выше). Если агрегация наступала в течение 10 минут от начала перемешивания, то она считалась выраженной, 10-20 минут – умеренной [18].

Оценка САТ по степени дезагрегации *in vitro*. С помощью оптического агрегометра записывают в течение 6 минут кривую дезагрегации после добавления к 0,3 мл богатой тромбоцитами плазмы 0,01 мл 0,1 М раствора динатриевой соли ЭДТА через 30 секунд после начала перемешивания. По максимальной величине радиуса дезагрегации судят о величине внутрисосудистой агрегации тромбоцитов [36].

Исследование САТ с помощью лазерных агрегометров. Метод предложен в 1989 году З.А. Габбасовым и соавторами [33]. Основан на анализе флуктуаций светопропускания (ФСП), вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале. Относительная дисперсия таких флуктуаций пропорциональна среднему размеру агрегатов, и используется для исследования кинетики агрегации. Отличается высокой чувствительностью, что делает его пригодным для исследования спонтанной агрегации, агрегации под действием низких концентраций индукторов, а также агрегации субклеточных частиц и макромолекул.

Частицы классифицируют по размерам на мелкие (интенсивность отраженного света, выраженного в вольтах (В) – 0,025-0,4 В или 9-25 мкм), средние (0,4-1 В или 25-50 мкм) и большие (1-2,048 В или 50-70 мкм). В числовом значении это составляет соответственно 0,07-1,4; 1-11 и 11-31 тысячи тромбоцитов в одном агрегате. Для кривых среднего размера иногда вычисляют также показатель агрегации, равный квадрату степени агрегации минус 1. Показатель агрегации отражает относительное увеличение среднего радиуса агрегатов и равен 0 при отсутствии агрегации.

Метод Г.Я. Левина и М.Н. Ехорихиной [29]. Заключается в вычислении интегральной оптической плотности суспензии тромбоцитов, помещенных между двумя плоскопараллельными пластинами, вращающимися навстречу друг другу, в условиях сдвигового потока. Производится видеозапись процесса и последующая компьютерная обработка полученных микрофотоснимков с помощью специально разработанной программы. Вычисляемый показатель содержит, по сути, информацию об объеме агрегата, поскольку количество точек объекта на изображении пропорционально площади объекта, а оптическая плотность характеризует толщину агрегата в каждой точке. Оценивают степень и скорость спонтанной агрегации тромбоцитов:

1. Степень агрегации – по суммарной максимальной интегральной оптической плотности тромбоцитарных агрегатов (усл.ед.).

2. Скорость агрегации – по суммарной интегральной оптической плотности тромбоцитарных агрегатов через 180 с. после начала процесса агрегации (усл.ед.).

Микроскопия в диагностике спонтанной агрегации тромбоцитов

Световая микроскопия. Исследуют мазок крови при микроскопии, при этом следует обращать внимание на соотношение числа отдельно лежащих тромбоцитов и их агрегатов, состоящих из 3-5 и более клеток. Этот феномен лучше выявляется при просмотре осадка, полученного при интенсивном центрифугировании богатой тромбоцитами плазмы (20-30 мин при 6000 об/мин). В норме агрегаты тромбоцитов не должны выявляться.

Метод РАТ I. Каплю богатой тромбоцитами плазмы, термостатируемой при температуре 37°C, наносят на пластиковую пластинку и выдерживают в течение 30 минут. Препараты затем промывают, фиксируют и высушивают. Оценивают наличие САГ с помощью микроскопа: в норме агрегаты не выявляются, при патологии видны скопления тромбоцитов [7].

Метод К.К. Wu и J.C. Ноак в модификации S.K. Bowry [4]. Метод оценки спонтанной внутрисосудистой агрегации, основанный на изучении процесса дезагрегации *in vitro*. В основе метода лежит подсчет тромбоцитов из венозной крови в растворе, содержащем ЭДТА и формалин (раствор А), который немедленно фиксирует отдельно лежащие тромбоциты и их агрегаты, и только ЭДТА (раствор В). Спонтанная агрегация тромбоцитов рассчитывается по формуле: $(A - B):A \times 100\%$, где А – количество тромбоцитов в пробирке с раствором ЭДТА, а В – количество тромбоцитов в пробирке с формалином и ЭДТА. У здоровых людей спонтанная агрегация тромбоцитов в венозной крови чаще отсутствует (т.е. А=В), пределы нормальных колебаний составляют от 0 до 4% [25].

Метод Н.И. Тарасовой (1982) [37]. По этому методу учитывается убыль тромбоцитов из цельной цитратной крови после 3-минутного взбалтывания ее на встряхивателе АВУ-1 со скоростью 90-100 раз в 1 мин. В пробирку с 0,5 мл крови, подвергавшейся встряхиванию, вводится 1 мл 1% раствора формалина в изотоническом растворе хлорида натрия. Вторая пробирка с контролем не подвергается встряхиванию, и в содержащуюся в ней кровь того же исследуемого через 3 мин также вводится раствор формалина. Кровь в обеих пробирках отстаивается 30 мин, после чего в надосадо-

ном слое подсчитывается число тромбоцитов. В норме разница в количестве тромбоцитов не превышает 20%, при повышенной наклонности к агрегации она возрастает.

Сканирующая электронная микроскопия. Кровь или суспензию тромбоцитов, фиксируют глутаровым альдегидом в течение 1,5 часов при комнатной температуре, затем помещают на поликарбонатные мембраны с порами диаметром 0,22-0,40 мкм, обезвоживают. Подсчет тромбоцитов различной формы осуществляется в сканирующем электронном микроскопе, определяется процентное содержание различных по форме клеток к их общему количеству. Об активности клеток судят по изменению их формы, выраженности псевдоподий, образованию межклеточных агрегатов (рис. 3).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) [34]. С помощью АСМ можно проводить морфофункциональный анализ тромбоцитов с выделением стадий адгезии, распластывания, реакции высвобождения, агрегации (рис. 4). Образец тромбоцитов инкубируют на предметном стекле во влажной среде при 20°C в течение 15-20 минут, затем клетки фиксируют метанолом и тщательно отмывают и высушивают препарат при 20°C. Для исследования поверхности используют сканирующий зондовый микроскоп. Адгезированные тромбоциты имеют расширенные псевдоподии, при агрегации тромбоцитов и развитии реакции высвобождения тромбоциты теряют гранулы и выглядят как распластанные «тени тромбоцитов».

Другие методы исследования

Метод регистрации убыли тромбоцитов.

Цельную цитратную кровь помещают в прибор для встряхивания на 60 минут. Определяют отношение (в процентах) количества тромбоцитов до и после встряхивания. Чем больше снижается уровень тромбоцитов, тем более выражена «спонтанная» агрегация [13].

Сканирующая поточная цитометрия.

Метод и прибор разработаны В.П. Мальцевым и коллегами [26]. Со скоростью до 600 частиц в секунду цитометр записывает индикатрису светорассеяния каждой, структура которой зависит от свойств частицы (размер, плотность, форма). Специально разработанный алгоритм позволяет восстановить по индикатресе свой-

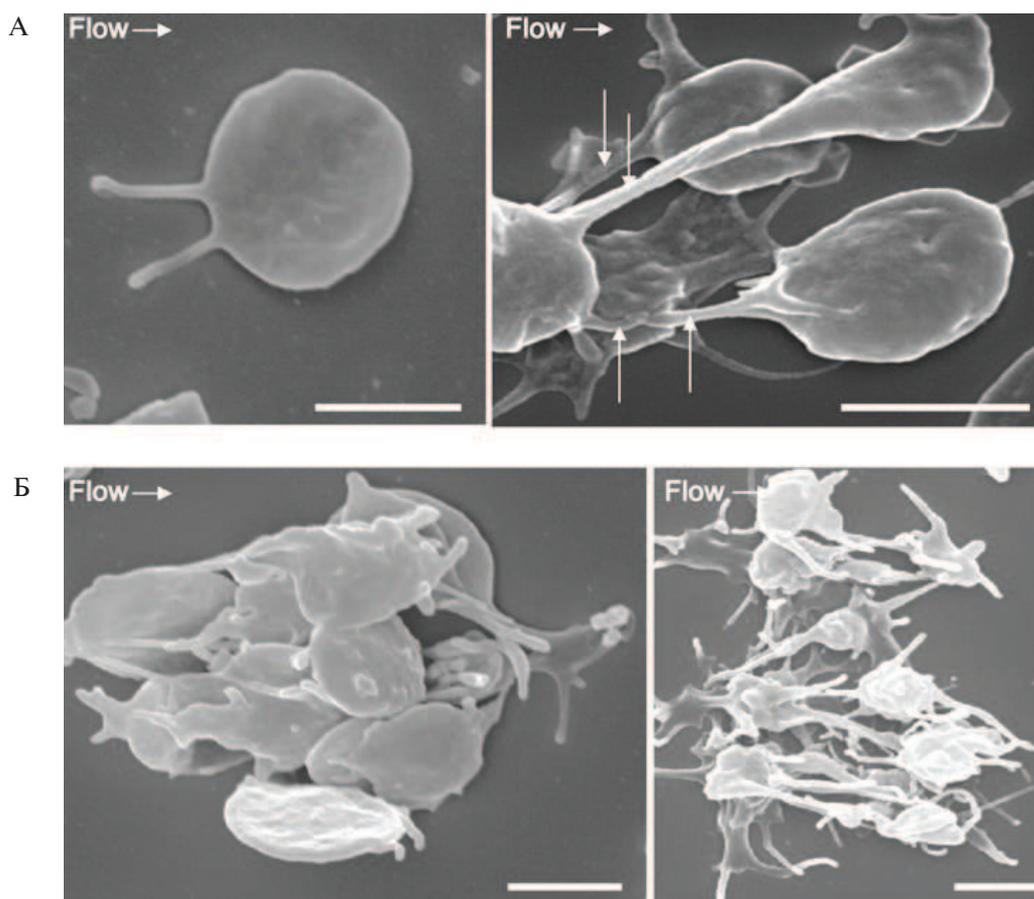


Рисунок 3 – А – образование псевдоподий и адгезия тромбоцитов; Б – адгезия и агрегация тромбоцитов [14].

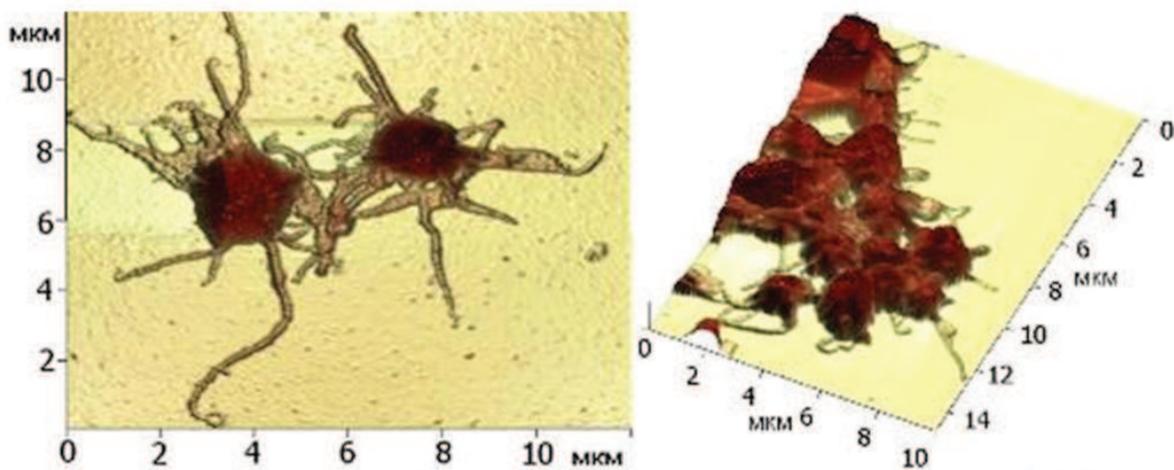


Рисунок 4 – АСМ-изображение активированных (А) и агрегированных (Б) тромбоцитов [34].

ства частицы и идентифицировать ее. Одновременно с индикатрисой светорассеяния проточный цитометр измеряет флуоресценцию той же частицы.

Наличие спонтанной агрегации тромбоцитов оценивается по регистрации уровня тромбоцитарного фактора 4 и β -тромбоглобулина, выделению L- и P-селектина или активирован-

ных гликопротеинов (GP Ib и GP IIb/IIIa) с использованием моноклональных антител.

Импедансная агрегометрия. В кювету с цельной кровью погружают электрод, на котором формируется монослой тромбоцитов. На другой электрод подают другое напряжение и измеряют сопротивление, возникшее на первом электроде вследствие покрывающих его тромбоцитов. При наличии спонтанной агрегации, а также при внесении индукторов агрегации и привлечении новых тромбоцитов в место агрегации, толщина слоя клеток и, соответственно, сопротивление на электроде возрастают пропорционально интенсивности агрегации. Метод позволяет исследовать агрегацию тромбоцитов в присутствии всех клеточных и плазменных элементов крови в приближенных к физиологическим условиям [2].

Подготовка к взятию крови для исследования агрегации

Для предотвращения преждевременной активации тромбоцитов при взятии образца крови необходимо соблюдать ряд условий.

Кровь следует брать между 7 и 9 часами утра, когда активность системы гемостаза максимальна. За 12 часов до взятия крови следует воздержаться от приема пищи. За 20-30 минут до забора крови физическая активность должна быть минимальной, любые процедуры (лечебные, диагностические) должны быть исключены.

Забор производится из локтевой вены. Венепункцию рекомендуется толстой и короткой иглой (диаметр 1,2 мм, длина менее 5 см) осуществлять без наложения жгута либо, если это невозможно, время венозного застоя не должно превышать 1 минуты [27]. Затем кровь смешивают с антикоагулянтом (например, цитратом натрия в отношении 9:1) и осторожно перемешивают плавным переворачиванием на 180° не менее 4 раз, лучше 8-10 раз. Необходимо избегать контакта крови со стенками пробирки до смешивания со стабилизатором [28]. Пробирки нельзя встряхивать. Это может вызвать пенообразование и гемолиз, механический лизис эритроцитов и других клеток [30].

Хранят пробирки до исследования при комнатной температуре, т.к. холод вызывает активацию тромбоцитов. При использовании цельной крови хранение образцов возможно

до 3 часов, богатую тромбоцитами плазму исследует не позднее 2 часов после получения.

Все исследования проводятся в силиконированной стеклянной посуде или оборудовании из полимерных материалов. Для исследования непригодна плазма с признаками гемолиза, липемическая, содержащая примесь эритроцитов.

Соблюдение этих условий важно для предупреждения преждевременной активации клеток еще до начала агрегометрии.

За 7-10 дней до исследования отменяют лекарственные средства, влияющие на агрегацию клеточных элементов крови: дезагреганты (дипиридамол и его производные, ацетилсалициловая кислота и ее производные, клопидогрель, абциксимаб, тиклопидин), индометацин, гироксихлорохин, фенилбутазон, сульфин-пиразон, низкомолекулярные декстраны, трициклические антидепрессанты.

При стандартном добавлении цитрата натрия в цельную кровь в отношении 1:9, уровень гематокрита может существенно повлиять на конечную концентрацию цитрата натрия в плазме крови. Гематокрит в пределах между 0,25-0,55 (25-55%) несущественно влияет на результаты. Низкий гематокрит приводит к более низкой концентрации цитрата натрия в плазме, что может спровоцировать агрегацию клеток крови еще до исследования. Высокий гематокрит, наоборот, ведет к увеличению концентрации стабилизатора в плазме и гипокоагуляции [28].

Спонтанная агрегация тромбоцитов при различных патологических состояниях и ее клиническое значение

У молодых здоровых людей спонтанную агрегацию выявляют редко.

Повышение спонтанной агрегации тромбоцитов отмечается при ряде патологических состояний (табл. 2) [6, 8, 15, 16, 19, 21, 32].

Ряд исследователей выявили повышение частоты и выраженности спонтанной агрегации с возрастом [12].

В последнее время спонтанная агрегация тромбоцитов, наряду с общеизвестными факторами риска атеротромбоза (курение, снижение уровня холестерина липопротеидов высокой плотности, повышение диастолического АД, гипергликемии) выделяется

Таблица 2 – Патологические состояния, сопровождающиеся повышением частоты спонтанной агрегации тромбоцитов

Атеросклероз	Пневмонии
Ишемическая болезнь сердца	Пиелонефриты
Артериальная гипертензия	Другие инфекционные заболевания
Сахарный диабет	Гломерулонефриты
Облитерирующий атеросклероз нижних конечностей	Новообразования
Хроническая обструктивная болезнь легких	Полицитемия
Васкулиты	Тромбофилии
Антифосфолипидный синдром	Лейкозы
Системная красная волчанка	Эффекты некоторых медикаментов (гормональные контрацептивы)
Синдром Рейно	Синдром сонного апноэ
Болезнь Бехчета	

как независимый фактор риска. Основанием для этого послужили результаты многоцентрового проспективного исследования HAPARG (Haemostaseologische Parameter als Risikofaktoren bei Gesunden: haemostatic parameters as risk factors in healthy volunteers), в котором участвовало 1884 мужчин и 989 женщин [5].

Авторы исследования HAPARG обнаружили повышенную спонтанную агрегацию у пациентов с сахарным диабетом, заболеваниями периферических и коронарных артерий, ассоциированную с высоким риском тромботических осложнений у этих пациентов, тогда как другие известные факторы риска не коррелировали с указанными расстройствами. Частота спонтанной агрегации увеличивалась с возрастом и чаще выявлялась у женщин, чем у мужчин, во всех возрастных группах. Однако число конечных точек (сердечно-сосудистые и церебральные события, тромбозы периферических вен) было значительно выше у мужчин (50 событий) по сравнению с женщинами (3) с незначительными отличиями уровня фибриногена, антитромбина III, фактора VIII, фактора фон Виллебранда и фактора VII в этих группах. Выявлены факторы, ассоциированные с повышенной частотой спонтанной агрегации – курение, низкий уровень ЛПВП, повышенный уровень глюкозы и высокое диастолическое давление.

Показано повышение спонтанной агрегации тромбоцитов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и микроангиопатией по сравнению с людьми, не страдавшими диабетом

[18]. Как выявлено в исследовании PARD, наличие спонтанной агрегации ассоциировано с высоким риском новых сосудистых окклюзий у пациентов с сахарным диабетом [28].

В исследовании M.D. Trip и коллег [18] наличие выраженной агрегации у пациентов, перенесших инфаркт миокарда за 3 месяца до исследования, было ассоциировано с высокой летальностью от сердечно-сосудистых событий (34,6%) в течение последующих 5 лет в сравнении с пациентами, у которых была умеренно выраженная спонтанная агрегация тромбоцитов (10,3%) или ее отсутствие (6,4%).

Нами обследовано 106 пациентов (34 мужчины, 72 женщины) с артериальной гипертензией II степени, средний возраст $55,5 \pm 10,2$ лет (1-я группа) и 62 пациента (51 мужчина и 11 женщин) с артериальной гипертензией II степени в сочетании с хронической обструктивной болезнью легких различной степени тяжести в период обострения, средний возраст – $63,3 \pm 9,9$ лет (2-я группа). Среднее систолическое артериальное давление при поступлении составило в 1-й группе $178,8 \pm 26,6$ мм рт. ст., диастолическое – $102,8 \pm 12,2$ мм рт. ст., во 2-й группе – $155,6 \pm 21,4$ и $94,1 \pm 13,2$ мм рт. ст. соответственно. Исследовалась адреналин-индуцированная и спонтанная агрегация лейкоцитарно-тромбоцитарной суспензии (ЛТС) по методу Vorn (1962) на агрегометре AP-2110 «СОЛАР». По данным агрегатограммы степень агрегации ЛТС в 1-й группе составила $10,5 \pm 11,2\%$, скорость агрегации – $6,7 \pm 4,7\%$ /мин, во 2-й группе – $8,7 \pm 9,3\%$ и $6,1 \pm 5,9\%$ /мин соответственно. Спонтанная агрегация тром-

боцитов выявлена в 1-й группе у 70 человек (66,0%) во 2-й группе – у 30 человек (48,4%).

Спонтанная агрегация ЛТС у пациентов с сочетанием АГ и ХОБЛ достоверно коррелировала с уровнем общего холестерина ($r=0,39$, $p<0,05$). У пациентов с АГ 50 лет и старше спонтанная агрегация тромбоцитов достоверно коррелировала с уровнем общего холестерина ($r=0,45$, $p<0,05$), холестерином ЛПНП ($r=0,45$, $p<0,05$), ИМТ ($r=0,30$, $p<0,05$).

Применение антитромбоцитарных средств для коррекции САТ

Ряд исследований указывают на частичное ингибирование спонтанной агрегации под воздействием ацетилсалициловой кислоты или ингибиторов тромбоксана A_2 [17], в других – блокирование фермента индометацином не приводило к снижению агрегации [22]. Спонтанная агрегация полностью подавляется высокой концентрацией ЭДТА, простагландином, моноклональными антителами к GPIIb и GPIIb/IIIa [24], совместным приемом аспирина и клопидогреля [23], и частично – низкой концентрацией ЭДТА, монотерапией ацетилсалициловой кислотой [24] и клопидогрелем [23].

Заключение

Таким образом, спонтанная агрегация тромбоцитов является важным феноменом при многих патологических состояниях: сердечно-сосудистых заболеваниях, системных васкулитах, новообразованиях, хронических обструктивных заболеваниях легких и др. В настоящее время разработан ряд методов оценки спонтанной активации тромбоцитов как в цельной крови, так и плазме крови. Однако механизмы, лежащие в основе такой повышенной склонности тромбоцитов к агрегации, остаются малоизученными.

Спонтанная агрегация тромбоцитов, так же как и повышенная индуцированная их агрегация, не только имеет важное значение в патогенезе развития и прогрессирования различных заболеваний, но и является одним из независимых прогностических факторов, прежде всего, в плане развития тромбозов и тромбоэмболий различных локализаций. Поэтому представляется чрезвычайно актуаль-

ным коррекция агрегационной активности тромбоцитов. Помимо использования анти-тромбоцитарных средств (ацетилсалициловая кислота, клопидогрель, тиклопидин), необходимо устранить факторы, обуславливающие активацию тромбоцитов или их структурные изменения: устранение дислипидемий, коррекция артериального давления др.

Литература

1. A laboratory study of spontaneous platelet aggregation / I. Friedlander [et al.] // *J Clin Path.* – 1971. – № 24. – P. 323–327.
2. A new method to evaluate spontaneous platelet aggregation in type 2 diabetes by Cellfacts. – *CLINICA CHIMICA ACTA*, 1999. – № 329 (1-2). – P. 95–102.
3. Born, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G.V.R. Born // *Nature.* – 1962. – № 194. – P. 927–929.
4. Bowry, S.K. A modification of the Wu and Hoak method of the determination of Platelets Aggregation and Platelets adhesion / S.K. Bowry // *Throm Haemost.* – 1985. – Vol. 53. – № 3. – P. 381–385.
5. Breddin, H.K. Spontaneous platelet aggregation as a predictive risk factor for vascular occlusions in healthy volunteer? Results of the HAPARG study / H.K. Breddin, R. Lippold, M. Bittner // *Atherosclerosis.* – 1999. – № 144. – P. 211–219.
6. Breddin, K. Klinische und experimentelle Untersuchungen über die Thrombozytenaggregation bei Gefäßerkrankungen / K. Breddin // *Dtsch. Med. Wschr.* – 1968. – № 33. – P. 1555–65.
7. Breddin, K. Thrombozytenagglutination und Gefäßkrankheiten / K. Breddin, J. Bauke // *Blut.* – 1965. – № 11. – P. 144–164.
8. Breddin, K. Über die gesteigerte Thrombozytenagglutination bei Gefäßkrankheiten / K.U. Breddin // *Schweiz Med. Wschr.* – 1966. – № 95. – P. 655–660.
9. Effects of tetanus toxin, Salmonella typhimurium porin, and bacterial lipopolysaccharide on platelet aggregation / C. Matera [et al.] // *J. Med.* – 1992. – № 23(5). – P. 327–338.
10. Eldor, A. The hypercoagulable state in thalassemia / A. Eldor, E.A. Rachmilewitz // *Blood.* – 2002. – Vol. 99. – № 1. – P. 36–43.
11. Enhanced Spontaneous Platelet Aggregation and red Blood Cell Fragility in Whole Blood Obtained from Patients with Diabetes / S. Krause [et al.] // *Platelets.* – 1991. – № 2(4). – P. 203–206.
12. Evaluation of platelet hyperfunction in aged

- subjects using spontaneous platelet aggregation in whole blood / A. Suehiro [et al.] // *Archives of Gerontology and Geriatrics*. – 1995. – Vol. 21. – № 3. – P. 277–283.
13. Hendra, T.J. 'Spontaneous' platelet aggregation in whole blood in diabetic patients with and without microvascular disease / T.J. Hendra, J.S. Yudkin // *Diabetic Medicine*. – 2009. – Vol. 9. – № 3. – P. 247–251.
 14. Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation / M.J. Maxwell [et al.] // *Blood*. – 2007. – № 109. – P. 566–576.
 15. Increased Whole Blood Platelet Aggregation in Patients with Raynaud's Phenomenon with or without Systemic Sclerosis / C.S. Lau [et al.] // *Scandin. J. Rheumat.* – 1993. – Vol. 22. – № 3. – P. 97–101.
 16. Influence of Spontaneous Platelet Aggregation on Progression of Glomerular Disease / Z. Zdrojewski [et al.] // *Nephron*. – 2002. – № 92. – P. 36–42.
 17. Mehta, J. Spontaneous platelet aggregation: observations on potential mechanisms / J. Mehta [et al.] // *Thrombosis Research*. – 1987. – Vol. 45. – № 3. – P. 249–256.
 18. Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction / M.D. Trip [et al.] // *N Engl J Med*. – 1990. – № 322. – P. 1549–54.
 19. Spontaneous Platelet Activation and Aggregation During Obstructive Sleep Apnea and Its Response to Therapy With Nasal Continuous Positive Airway Pressure. A Preliminary Investigation / G. Bokinsky [et al.] // *Chest*. – 1995. – Vol. 108. – № 3. – P. 625–630.
 20. Spontaneous platelet aggregation and coagulation parameters as risk factors for arterial occlusions in diabetics / H.K. Breddin [et al.] // *Int. Angiol.* – 1986. – № 5. – P. 181–195.
 21. Spontaneous Platelet Aggregation in Patients with Behçet's Disease by Using Laser-Light Scattering Aggregometer / H. Nakano [et al.] // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2004. – Vol. 528. – Part 11. – P. 437–441.
 22. Spontaneous platelet aggregation in whole blood is increased in non-insulin-dependent diabetes mellitus and in female but not male patients with primary dyslipidemia / V.C. Menys [et al.] // *Atherosclerosis*. – 1995. – Vol. 112. – № 1. – P. 115–122.
 23. The effect of clopidogrel, aspirin and both antiplatelet drugs on platelet function in patients with peripheral arterial disease / I. A. Jagroop [et al.] // *Platelets*. – 2004. – № 15(2). – P. 117–125.
 24. Von Willebrand's disease with spontaneous platelet aggregation induced by an abnormal plasma von Willebrand factor / H. R. Grainick [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1985. – № 76(4). – P. 1522–1529.
 25. Wu, K.K. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency / K.K. Wu, J.C. Hoak // *Lancet*. – 1974. – Vol. 2. – P. 924–926.
 26. Yurkin, M.A. The discrete dipole approximation for simulation of light scattering by particles much larger than the wavelength / M.A. Yurkin, V.P. Maltsev, A.G. Hoekstra // *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*. – 2007. – № 106. – P. 546–557.
 27. Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний / под ред. Н.Н. Петрищева, Л.П. Папаян. – СПб., 1999. – 110 с.
 28. Долгов, В.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В.В. Долгов, П.В. Свиринов. – М.-Тверь : Триада, 2005. – 227 с.
 29. Егорихина, М.Н. Фибриноген и агрегация тромбоцитов (на модели термической травмы) / М.Н. Егорихина, Г.Я. Левин // *Яросл. пед. вестн.* – 2010. – № 4. – Т. 3. – С. 61–66.
 30. Исследование клеточного состава крови с применением гематологических анализаторов // *Проблемы стандартизации в здравоохранении*. – 2009. – № 5. – С. 30–61.
 31. Клиническая лабораторная диагностика: методы исследования : учеб. пособие / И.А. Зупанец [и др.]. – Харьков : Золотые страницы, 2005. – 200 с.
 32. Меренкова, Е.А. Состояние агрегационной способности тромбоцитов при патологии легких у больных различных нозологических групп / Е.А. Меренкова, Н.Е. Моногарова // *Україн. Пульмонол. журн.* – 2006. – № 1. – С. 39–43.
 33. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов / З.А. Габбасов [и др.] // *Лаб. дело*. – 1989. – № 10. – С. 15–18.
 34. Орлов, С.А. Исследование морфофункциональной активности тромбоцитов методом атомно-силовой микроскопии / С.А. Орлов, С.В. Ходырев // *Междунар. форум по нанотехнологиям 2008 : сб. тез. докл. участников Междунар. конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий*. – М.: Рос. корпорация нанотехнологий, 2008. – С. 612.
 35. Савченко, А.П. Механизмы функционирования тромбоцитарного гемостаза / А.П. Савченко, И.Н. Медведев // *Фундаментальные исследования*. – 2009. – № 10. – С. 28–30.
 36. Способ исследования внутрисосудистой агрегации тромбоцитов in vitro : пат. 2102754 Рос. Федерации, МПК G01N33/48, A61B5/14, G01N33/49 / Е. И. Иконникова, П. Я. Довгалецкий, Л. А. Черноусова, И. Р. Мошкина; за-

- явитель Саратов. науч.-иссл. ин-т. кардиологии при СГМУ МЗ и МП России. – № 96102105/14 ; заявл. 05.02.1996 ; опубл. 20.01.1998.
37. Тарасова, Н.И. Способ количественной оценки спонтанной агрегации тромбоцитов / Н.И. Тарасова // Тромбообразование и патология гемостаза : сб. тр. – Томск, 1982. – С. 111–113.
38. Участие гликопротеина IIb-IIIa в спонтанной агрегации тромбоцитов / О.В. Сироткина [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2007. – Т. 143, № 4. – С. 398–401.

Поступила 22.11.2013 г.

Принята в печать 06.12.2013 г.

Сведения об авторах:

Козловский В.И. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской терапии УО «ВГМУ»;

Ковтун О.М. – аспирант кафедры факультетской терапии УО «ВГМУ»;

Сероухова О.П. – к.м.н., Независимая лаборатория ИНВИТРО г. Москва;

Детковская И.Н. – врач-терапевт УЗ «Витебский областной клинический родильный дом», заочный аспирант кафедры факультетской терапии УО «ВГМУ»;

Козловский И.В. – д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии УО «ВГМУ».

Адрес для корреспонденции: 210029, Витебск, ул. Правды, 58-3-16. Тел.моб.: +375 (29) 637-19-84 – Козловский Владимир Иосифович.