

СОВРЕМЕННЫЕ АГРЕГОМЕТРЫ

Н.А. Ворошилов, «ЭкоМедСМ»

Тромбоциты играют ключевую роль в регуляции гемостаза, обеспечивают стабильность сгустка и его ретракцию, участвуют в репарации сосудов. Как центральный элемент клеточного гемостаза их функция состоит во взаимодействии между собой, с другими клетками крови, с клетками эндотелия и субэндотелия – для быстрого формирования первичного сгустка нужной формы и размера в условиях активного кровотока.

Способность к агрегации и адгезии позволяет тромбоцитам за секунды физически локализовать место сосудистого повреждения и обеспечить только в этой области повышенное содержание просвертывающих факторов, которые поставляются из поврежденной сосудистой стенки, из плазматической системы и из самих активированных тромбоцитов.

Даже небольшие нарушения гомеостаза могут приводить к выраженной дисфункции тромбоцитов, которая способна вызвать тромбозы или кровотечения, оказывать негативное влияние на течение сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, на воспалительные процессы, процессы атерогенеза и пр. Неудивительно, что количество врачей различных специальностей, нуждающихся в быстрой и адекватной оценке тромбоцитарной функции, растет с каждым годом.

В соответствии с перечисленными функциями современный агрегометр должен уметь оценивать: агрегационные и адгезивные свойства тромбоцитов (желательно в условиях максимально приближенных к физиологическим); способность тромбоцитов к реакции освобождения из гранул; влияние антитромбоцитарных препаратов на функциональные способности тромбоцитов.

Проблемы стандартизации агрегометрии

Реальные возможности исследования тромбоцитов появились еще в 1960-х после изобретения оптического агрегометра. Этот метод до сих пор считается «золотым стандартом» в агрегометрии, несмотря на определенные ограничения. Однако большой проблемой в этой области справедливо считается отсутствие общепринятой стандартизации методов исследования.

В ноябре 2008 года американская стандартообразующая организация CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) выпустила документ «Исследования тромбоцитарной функции методом агрегометрии; рекомендуемые принципы»¹. В этом документе констатируется факт возросшей потребности клиницистов в подобных тестах, и в особенности стандартизованных методов контроля за применением современных антитромбоцитарных препаратов.

Этот документ, который является результатом консенсуса лидеров в данной области, одна из первых успешных попыток обобщить данные об основных методах исследования тромбоцитов и на основе единой терминологии описать все этапы исследования для каждого метода.

В документе CLSI рассматриваются четыре основных клинически апробированных метода: а) оптическая агрегометрия на плазме; б) импедансная агрегометрия на цельной крови; в) люминисцентное измерение реакций секреции и высвобождения; г) агрегометрия в условиях физиологических сдвиговых усилий.

Интересно рассмотреть, какая роль отводится каждому методу, какие преимущества и недостатки отмечены. Далее приводится интегрированная информация большей частью из документа CLSI и из других статей.

Оптическая агрегация (по Vorn и O'Brien, 1962).

Основные преимущества:

Долгий опыт использования в клинической и научной практике; доступность оборудования (самый распространенный и недорогой тип агрегометра в мире); самая низкая цена за тест; широкий спектр агонистов и концентраций; возможность мониторинга лаг-фазы, фазы изменения формы тромбоцитов, первичной (обратимой) и вторичной (необратимой) агрегации; возможность комбинации с люминисцентным методом для детекции реакций с высвобождением АТФ*. Метод позволяет диагностировать большинство тромбоцитарных патологий и болезнь Вилебранда (включая ее типирование); измерение спонтанной агрегации; осуществление контроля действия большинства антитромбоцитарных препаратов.

Недостатки и ограничения:

Работает на PRP/PPP плазме (плазма обогащенная/безтромбоцитарная), т.е. не в физиологическом окружении, так как в образце нет других форменных элементов крови; ограничения на работу с липемичными и иктеричными образцами (поскольку метод оптический, то цветность или мутность плазмы резко снижает точность измерений даже при условии бланкирования аутологичной PPP плазмой; например, при значениях билирубина в плазме более чем 34.2 $\mu\text{моль/л}$ максимальная агрегация уменьшается на ~12%; необходимость центрифугирования крови – это самая длительная часть процесса исследования, которая чревата возможностью потери части тромбоцитов и (или) их ранней активацией; необходимость разведения высоких тромбоцитов до 200-250 тыс/мкл (с помощью PPP плазмы или изотонического р-ра) – еще одно трудоемкое манипулирование с тромбоцитами; исследование агрегации проводится в условиях низких сдвиговых усилий и не на поверхности, что далеко от условий нормального физиологического процесса; требуется большое кол-во крови (несколько мл); ограничение при работе с тромбоцитами ниже 100 тыс/мкл (резко падает чувствительность метода); «не чувствует» действие некоторых препаратов с антиагрегантными свойствами (например, дипиридамола).

Импедансная агрегация (по Cardinal и Flower, 1980)

Основные преимущества:

Метод давно используется в клинической и научной практике; широкий спектр агонистов (возможен даже тромбин в виде TRAP-6) и концентраций; возможность комбинации с люминисцентным методом для детекции реакций высвобождения АТФ*; измерение

спонтанной агрегации. Метод позволяет диагностировать основные тромбоцитарные патологии и болезнь Вилебранда, осуществлять контроль действия любых антитромбоцитарных препаратов (аспирина, клопидогреля и пр.); работает на цельной крови, т.е. в физиологическом окружении других форменных элементов крови; нет ограничения на работу с липемичными и иктеричными образцами (поскольку метод не оптический); нет необходимости центрифугирования крови – т.е. нет дополнительного риска активации тромбоцитов; позволяет выполнять исследования очень быстро (~10 мин/тест) и выполнять большие объемы тестов в день; исследование агрегации проводится на поверхности плоского электрода на первичном монослое неактивированных тромбоцитов; на один тест требуется малое кол-во цельной крови – 300 мкл; использование одноразовых электродов устранило очень важный недостаток – необходимость их мыть.

Основные недостатки:

Меньшая распространенность метода по сравнению с оптической агрегацией (хотя сейчас популярность метода резко возросла); большая стоимость оборудования в пересчете на канальность; более высокая цена за тест при использовании одноразовых электродов; регистрация некоторых эффектов (например, дезагрегации) и диагностика некоторых тромбоцитарных патологий (например, типирование болезни Вилебранда) затруднена; ограничение при работе с тромбоцитами ниже 100 тыс/мкл (резко падает чувствительность метода); необходимость мыть многоразовые электроды перед каждым тестом.

Агрегометр проточного типа (Kratzer и Born, 1985) Анализатор функции тромбоцитов «PFA-100» (Siemens)

Основные преимущества:

Единственный клинически апробированный тест, в котором образование первичного сгустка происходит динамически на микро-мембране из коллагена при прохождении через нее цельной крови под давлением, т.е. в условиях физиологических сдвиговых усилий; анализатор определяет время окклюзии мембраны и фактически является



стандартизованным аналогом теста на время кровотечения; функциональный тест первичного гемостаза, который зависит от плазменного vWF и тромбоцитарных рецепторов GPIIb/IIIa и GPIb/ V/IX; глобальный тест, так как затрагивает практически все аспекты агрегации/адгезии тромбоцитов, межклеточные взаимодействия и плазменные факторы; имеется два вида картриджей – коллаген/ АДФ и коллаген/эпинефрин, которые позволяют определять

пациентов на аспирине; есть свидетельства, что тест на этом приборе имеет прогностическое значение для выявления возможных осложнений после сердечно-сосудистых вмешательств; ограничения при работе с тромбоцитами наступают ниже 50 тыс/мкл.

Основные недостатки:

дорогое оборудование и высокая цена за тест; низкая чувствительность к клопидогрель-подобным препаратам (в разработке находится новый тип картриджа – коллаген/P2Y12, который позволит решить эту проблему).

Агрегометры, способные работать в режиме Р.О.С.

Многие авторы подчеркивают, что нужно внедрение новых приборов, которые лучше моделируют процессы тромбоцитарной функции *in-vivo*, более просты в эксплуатации и имеют клинически проверенные и алгоритмически понятные интерпретации. Подчеркивается также возможность выполнения таких тестов вне лаборатории (или в экспресс-режиме). Импедансные агрегометры (на цельной крови) и «PFA-100» могут быть использованы в режиме Р.О.С. Интересен в этом смысле и новый агрегометр «Multiplate» (компания Dynabyte, Германия).

Импедансный 5-канальный агрегометр на цельной крови «Multiplate»

(Calatzis и Spannagl, конец 90-х, в статье CLSI фигурирует как метод «MEA» – Multiple Electrode Aggerometry)

Агрегометр использует для исследования одноразовый картридж с двумя парами плоских медных электродов покрытых серебром. При инкубировании с цельной кровью на поверхности электродов образуется монослой неактивированных тромбоцитов. При активации тромбоцитов они начинают налипать на этот монослой и, таким образом, изменять электрическое сопротивление (импеданс) между электродами.



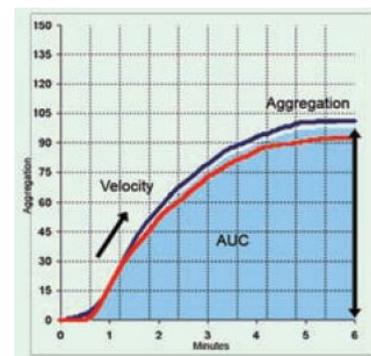
Изменение импеданса является мерой агрегации тромбоцитов в образце. При этом прибор автоматически устанавливает нулевой уровень, автоматически регистрирует скорость агрегации, ее максимум и проводит все вычисления. Для удобства сравнения данных и унификации результатов введены условные единицы AUC (площадь под агрегационной кривой). Все результаты, нормы и клинические рекомендации выдаются в этих единицах.

Все картриджи калиброваны на заводе. Одновременно в каждом картридже проводится параллельно два измерения для каждого теста, для внутреннего контроля измерения и повышения точности. Весь процесс проведения теста происходит под управлением программы, таким образом, обеспечивается стандартизация всего процесса и высокая воспроизводимость результата.

Для реализации диагностического алгоритма предложены следующие тесты:

TRAP-тест, ASPI-тест (для контроля аспирина), ADP-тест и APD-HS-тест (для контроля клопидогрель подобных препаратов), COL-тест (с коллагеном), RISTO-тест (исследование GpIb-зависимой агрегации и фактора Вилебранда).

Уникален TRAP-тест, который проводится с агонистом TRAP6 (тромбин активирующий пептид). По своим свойствам активировать тромбоциты TRAP-6 сравним с тромбином, но при этом он не приводит к образованию сгустка. Использование этого теста позволяет измерить максимальную способность к агрегации у пациента (так как его действие не блокируется аспиринем, ни клопидогрелем) и на этом фоне наблюдать снижение агрегации для пациентов с этими препаратами (на тестах ASPI, ADP, ADP-HS). При этом отсутствие такого снижения будет указывать на возможность резистентности пациента к данному препарату. Снижение самого TRAP-теста указывает на снижение агрегации в результате действия GpIIb/IIIa блокаторов (ReoPro, Aggrastat и Integrilin).



Анализатор агрегации «Multiplate» легко может быть использован в режиме P.O.C. Он подходит для круглосуточной работы, есть положительный опыт использования его не в лаборатории, а в операционных (например, сосудистыми и кардиохирургами). Этот анализатор агрегации полностью комплементарен, например, тромбоэластометру «ROTEM» (Pentapharm), вместе эти приборы эффективно закрывают многие потребности в экспресс-диагностике гемостаза. Думаю, что в ближайшем будущем могут появиться даже комбинированные тромбоэластометро-агрегометры.

Заключение

Конечно, в рамках короткой статьи невозможно рассказать о таком интересном документе, какой выпустила CLSI для унификации подходов к агрегометрии. Однако время для такого документа созрело и, вероятно, инициатива его создания исходит не из лаборатории. Практическим врачам, клиницистам нужны доступные, быстро выполнимые, легко воспроизводимые, понятные и клинически проверенные методы. Им нужны функциональные тесты, которые помогут правильно назначать и контролировать антитромбоцитарную терапию, прогнозировать возможные риски течения заболеваний. Важные шаги в этом направлении уже сделаны.

* Метод измерения реакций высвобождения на основе люмидетекции АТФ реализован в комбинированном оптико-импедансном люми-агрегометре «Model 700» фирмы «Chronolog», США.

Замечание 1.

В документе CLSI подробно рассмотрены все практические стороны преаналитического, аналитического и постаналитического этапа для практической агрегометрии, но к сожалению, размер статьи не позволяет рассмотреть все эти аспекты. Рекомендую прочитать этот документ полностью всем, кому интересны проблемы гемостаза и, в частности тромбоцитарной функции, его клинические аспекты и вопросы стандартизации. Это может быть полезно в Вашей практической работе.

Замечание 2.

В статье нет возможности детально рассмотреть принципы действия, рекомендации по использованию и интерпретации результатов для следующих приборов: «PFA-100» (исследование агрегации при сдвиговых усилиях), «Chronolog 700» (метод «в», комбинированный оптико-импедансный люми-агрегометр), «ROTEM» (тромбоэластометр), методов исследования реакций высвобождения серотонина, методов проточной цитометрии для исследования тромбоцитарной функции и многое другое. Каждый такой прибор и метод является предметом отдельной статьи.