

Винахід відноситься до медицини, зокрема до кардіології і ревматології, і може бути використаний для оцінки активності тромбоцитарної ланки гемостазу, ефективності антитромботичної і протизапальної терапії захворювань серцево-судинної системи.

В даний час використовуються способи морфологічної оцінки функціонального стану тромбоцитів шляхом суправітального фарбування в збагаченій ними цитратній плазмі флуоресцентним барвником акридиновим жовтогогарячим з наступною фіксацією та підрахунком відсоткового співвідношення неактивованих, активованих, дегранульованих кров'яних платівок та їх агрегатів (1). Істотним недоліком даного способу є активування тромбоцитів у процесі взяття матеріалу для дослідження, що утрудняє інтерпретацію результатів і знижує його вірогідність.

Прототипом винаходу є спосіб підрахунку тромбоцитарної формули при електронно-мікроскопічному дослідженні тромбоцитів (2), що включає одержання крові з локтєвої вени з урахуванням вимог, що забезпечують мінімальну активацію кров'яних платівок, негайну фіксацію отриманої крові, виділення тромбоцитів зі збагаченої ними плазми шляхом центрифугування, додаткову фіксацію їх, зневоднювання і поміщення у епоксидні смоли з наступним підрахунком кількості кров'яних платівок різних морфологічних типів: неактивованих, активованих, дегранульованих, агрегованих. Недоліком даного способу є можливість підрахунку лише кількісного співвідношення тромбоцитів різних морфологічних типів, що відображають їхній функціональний стан у кровообігу без визначення реактивності кров'яних платівок, що гостро необхідно для прогнозування плинності серцево-судинних захворювань і оцінки ефективності їхньої терапії.

Ціль винаходу - підвищення вірогідності способу оцінки реактивності тромбоцитів.

Поставлена мета досягається тим, що, поряд з підрахунком розширеної тромбоцитарної формули, що включає визначення оборотно і необоротно активованих тромбоцитів, провадиться кількісна оцінка неактивованих і оборотно активованих кров'яних платівок з високою і низькою щільністю некомпенсованих негативних зарядів глікокаліксу. Для цього використовують тромбоцити, виділені шляхом центрифугування з негайно фіксованої крові людей, отриманої з локтєвої вени з урахуванням вимог, що забезпечують мінімальну активацію кров'яних платівок. У тромбоцитах визначають концентрацію негативних зарядів у глікокаліксі шляхом постановки реакції зв'язування ферризолю по Б.Ветцелю (3). Після проведення цитохімічної реакції матеріал обезводнюють й поміщають в епоксидні смоли за стандартною методикою (4). Неконтрастовані і контрастовані уранілацетатом і цитратом свинцю ультратонкі зрізи досліджують на електронному мікроскопі. На отриманих електроннограмах провадять підрахунок загальної кількості неактивованих і оборотно активованих тромбоцитів, а також підраховують кількість неактивованих і оборотно активованих платівок з високою і низькою щільністю некомпенсованих негативних зарядів у глікокаліксі. Реактивність тромбоцитів визначають по формулі

$$R = \frac{n_2 + a_2}{N + A} - \frac{n_1 + a_1}{N + A} + 1$$

де R - показник реактивності тромбоцитів,

N - загальна кількість неактивованих тромбоцитів,

n_1 - кількість неактивованих тромбоцитів з високою щільністю некомпенсованих негативних зарядів у глікокаліксі,

n_2 - кількість неактивованих тромбоцитів з низькою щільністю некомпенсованих негативних зарядів у глікокаліксі,

A - загальна кількість оборотно активованих тромбоцитів,

a_1 - кількість оборотно активованих тромбоцитів з високою щільністю некомпенсованих негативних зарядів у глікокаліксі,

a_2 - кількість оборотно активованих тромбоцитів з низькою щільністю некомпенсованих негативних зарядів у глікокаліксі.

Результати підрахунків оцінюють наступним образом: показник реактивності тромбоцитів нижчий за 0,25 вказує на низький рівень реактивності, коливання його від 0,25 до 0,75 свідчать про задовільну реактивність, від 0,75 до 1,0 про високу реактивність кров'яних платівок, а показники, вищі за 1,0 вказують на значний ризик тромбоутворення.

Приклади конкретного виконання способу

Приклад 1.

У хворого М. з діагнозом ішемічна хвороба серця: гострий інфаркт міокарду при госпіталізації у клініку, в першу добу захворювання була взята проба крові з локтєвої вени з урахуванням вимог, що забезпечують мінімальну активацію кров'яних платівок, піддана негайній фіксації, тромбоцити виділені зі збагаченої ними плазми шляхом центрифугування. У тромбоцитах проведена реакція зв'язування ферризолю по Б.Ветцелю (3). Після проведення цитохімічної реакції матеріал обезводнювали й поміщали в епоксидні смоли. Ультратонкі зрізи, отримані на ультратомі LKB-8800, неконтрастовані і контрастовані уранілацетатом і цитратом свинцю, досліджували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К. На отриманих електроннограмах підраховували кількість неактивованих (32) і оборотно активованих (59) тромбоцитів. Серед них також підраховували кількість платівок з високою ($n_1=8$, $a_1=11$) і низькою ($n_2=21$, $a_2=43$) щільністю некомпенсованих негативних зарядів у глікокаліксі. Реактивність тромбоцитів визначили по вищевказаній формулі, показник її дорівнює 1,49, що вказує на високий ризик тромбоутворення. Клінічні дані підтвердили наявність тромбу у коронарній артерії серця. Після інтенсивної антикоагулянтної терапії на сьомий день захворювання проведено повторне дослідження реактивності тромбоцитів. При підрахунку на електроннограмах отримано такі первинні дані: $N=53$, $A=89$, $n_1=38$, $a_1=56$, $n_2=12$, $a_2=27$. Показник реактивності тромбоцитів дорівнює 0,61, що вказує на помірний ступінь її.

Приклад 2.

Хвора Р. госпіталізована у клініку з приводу ревматоїдного артриту, активної фази, III ступеню активності з наявністю системних проявів захворювання (васкуліту). При госпіталізації в неї була взята проба крові з локтєвої вени з урахуванням вимог, що забезпечують мінімальну активацію кров'яних платівок, піддана описаній вище обробці з проведенням реакції зв'язування ферризолю та подальшим дослідженням на електронному мікроскопі і

підрахунком кількості неактивованих (27) і оборотно активованих (29) тромбоцитів, а також кількості платівок з високою ($n_1=14$, $a_1=11$) і низькою ($n_2=11$, $a_2=13$) щільністю некомпенсованих негативних зарядів у глікокаліксі. Показник реактивності тромбоцитів, визначений за формулою, був високим і дорівнював 0,98. Після проведення курсу протизапальної терапії, через 20 діб була взята повторна проба крові та проведено дослідження реактивності тромбоцитів. При підрахунку на електронограмах отримано такі первинні дані: $N=52$, $A=26$, $n_1=31$, $a_1=11$, $n_2=18$, $a_2=13$. Показник реактивності тромбоцитів декілька знизився (до 0,86), але залишався високим, що відповідало зберігавшимся у клінічній картині ознакам васкуліту.

Джерела інформації:

1. Ладный А.И., Кондаков И.К., Ермакович И.И. Экспресс-метод оценки морфофункционального состояния тромбоцитов. // Лабораторное дело. - 1988. - №2. - С.27-29.
2. Петров М.Н., Вашкинелъ В.К., Алмазов В.А. О значении способа фиксации кровяных пластинок для оценки тромбоцитарной формулы. // Лабораторное дело. - 1975. - №1. - С.22-26.
3. Гайер Г. (1974) Электронная гистохимия. (Пер. с англ.). Мир, Москва, 488с.
4. Вашкинелъ В.К., Петров М.Н. (1982) Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. Л.: Наука, 88с.