



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44405 (13) A

(51) G 01N 1/28, G 01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД  
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ  
ВЛАСНИКА  
ПАТЕНТУ

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ТРОМБОЦИТІВ

1

2

(21) 2000042318

(22) 24 04 2000

(24) 15 02 2002

(46) 15 02 2002, Бюл. № 2, 2002 р.

(72) Коркушко Олег Васильович, Лішневська  
Вікторія Юріївна(73) ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕ-  
ДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ(57) Спосіб визначення функціонального стану  
тромбоцитів, оцінки їх агрегаційної активності,  
який відрізняється одночасним розрахунком  
відсотка активних тромбоцитів в аналогічній порції  
крові, з розрахунком дійсного рівня параметрів  
агрегації кров'яних пластинок за формулою $V1 = V\% / \text{мин} \times 100\% / n\%$  $A1 = A\% \times 100\% / n\%$ 

Де

V - вихідна швидкість агрегації тромбоцитів в 1-шу  
хв агрегації, отримана при вивченні агрегації  
тромбоцитів без врахування кількості активних  
клітин,V1 - вихідна швидкість агрегації тромбоцитів в 1-  
шу хв агрегації, отримана після врахування кіль-  
кості активних клітин,A - вихідний рівень максимальної агрегації тром-  
боцитів, отриманий при вивченні агрегації тром-  
боцитів без врахування кількості активних клітин,A1 - рівень максимальної агрегації тромбоцитів,  
отриманий після розрахунку кількості активних їх  
клітин,N - відсоток активних тромбоцитів, що беруть  
участь в реакції агрегації

Винахід належить до медицини і може бути  
використаний для діагностики ризику внутрішньо-  
судинного тромбоутворення при різних патологіч-  
них станах організму

Враховуючи актуальність проблеми активації  
внутрішньосудинного тромбоутворення в патоген-  
езі багатьох патологічних процесів, було запро-  
поновано багато способів вивчення агрегаційної  
активності тромбоцитів. Широко використовується  
з цією метою в наш час в різноманітних модифіка-  
ціях метод вивчення агрегаційної спроможності  
тромбоцитів, запропонований Born G у 1962 році  
(Born G V. Aggregation of blood platelets by adeno-  
sine diphosphate and its reversal // Nature - 1962 -  
194 - P 927 - 929). Основою цього методу є змі-  
нення світлопропускання плазми під час агрегації  
тромбоцитів після введення в збагачену тромбо-  
цитами плазму індуктора агрегації. Недоліком ме-  
тоду є те, що при вимірюванні агрегаційних власти-  
востей кров'яних пластинок враховується тільки їх  
загальна кількість в пробірці, без врахування фун-  
кціонального стану. Останнє в умовах надмірної  
внутрішньосудинної активації кров'яних пластинок і  
пов'язаною з цим наявністю значної кількості де-  
гранульованих пластинок in vitro, може призводити  
до хибного висновку про низький рівень максима-  
льної агрегації тромбоцитів

Спосіб Varon David и Savion Naphtali (G 01 N  
33/186 US 55232338 A Varon David, Savion Naphtali  
Способ и устройство для определения функции  
тромбоцитов в первичном гемостазе, ИСМ 1997,  
№6, в 084, с 38) також не враховує функціональ-  
ний стан тромбоцитів на момент підготовки зразка  
крові для дослідження, а саме не ведеться підра-  
хунок кров'яних пластинок, що проагрегували та  
дегранулювали до початку дослідження. Крім того,  
нанесення індуктора на стінки камери порушує  
фізіологічні умови вивчення агрегації, оскільки при  
"прилипанні" заохочується механізм адгезії тром-  
боцитів, який має окреме значення для характери-  
стики функціонального стану кров'яних пластинок

Найбільш близьким прототипом до запропоно-  
ваного нами способу є спосіб оцінки морффунк-  
ціонального стану тромбоцитів, запропонований  
Ладним А І у 1988 році (Ладный А И, Кондаков  
И К, Ермаков И И. Экспресс-метод оценки мор-  
фофункционального состояния тромбоцитов // Лаб  
дело - 1988 - №2 - С 27-29). Цей спосіб  
враховує функціональний стан тромбоцитів, однак  
не дозволяє оцінити динаміку процесу агрегації і  
агрегаційну активність не активованих пластинок

Основою винаходу є завдання створення  
більш досконалого способу діагностики підвищеної  
агрегаційної активності тромбоцитів, який буде

(13) A

(11) 44405

(19) UA

визначати морфофункціональний стан кров'яних платівок у пробірці до початку проведення індукованої агрегації. Це дозволить врахувати кількість тромбоцитів, що мають прийняти участь в реакції агрегації *in vitro*.

Спосіб здійснюється таким чином

Кров для дослідження забирають з літрової вени широкою голкою без шприца, в силіконовану пробірку, яка містить 3,8% розчин цитрату натрію в об'ємному співвідношенні 1:9 (кінцева концентрація в пробірці 0,38%). Після забору суміш кров-цитрат центрифугують при 165 – 200g. Отриману збагачену тромбоцитами плазму відбирають в 2 чисті силіконовані пробірки. Плазму з 1 пробірки використовують для проведення агрегатометрії, плазму із 2 пробірки – для розрахунку функціональних груп тромбоцитів.

Безтромбоцитарну плазму отримують при подальшому центрифугуванні осадку клітин крові, що залишилась у пробірці після відбору збагаченої тромбоцитами плазми, протягом 15хв. При 1500g.

Вивчення агрегаційної активності тромбоцитів проводили методом турбідиметричної агрегатометрії. Ступінь агрегації тромбоцитів оцінювали по зміні оптичної щільності збагаченої тромбоцитами плазми в процесі агрегації кров'яних платівок під впливом індуктора агрегації. Розраховували наступні параметри: швидкість агрегації за 1-шу хвилину (V), рівень максимальної агрегації (A).

Одночасно здійснювали розрахунок кількості активних тромбоцитів. З цією метою приготувляли мазок фарбованих акридіновим оранжевим, фіксованих 20% формальдегідом тромбоцитів і підраховували кількість юних, неактивованих, активованих, агрегованих та де-агрегованих кров'яних платівок. Далі вираховували загальний процент активних тромбоцитів юних, неактивованих, активованих та агрегованих.

Потім перераховують параметри агрегаційної кривої з урахуванням відсотку (n) активних тромбоцитів. Показники швидкості та максимального рівня агрегації, отримані в результаті перерахунку, в порівнянні з контролем, відображають реальний рівень агрегаційної активності кров'яних платівок в обстежуваній особі.

Агрегаційну активність тромбоцитів з урахуванням їх морфо-функціонального стану розраховують по формулі

$$V1 = V\% / \text{мін} \times 100\% / n\%$$

$$A1 = A\% \times 100\% / n\%$$

Де

V – вихідна швидкість агрегації тромбоцитів в 1-шу хв агрегації, отримана при вивченні агрегації тромбоцитів без врахування кількості активних клітин

V1 – вихідна швидкість агрегації тромбоцитів в 1-шу хв агрегації, отримана після врахування кількості активних клітин

A – вихідний рівень максимальної агрегації тромбоцитів, отриманий при вивченні агрегації тромбоцитів без врахування кількості активних клітин

A1 – рівень максимальної агрегації тромбоцитів, отриманий після розрахунку кількості активних клітин

N – відсоток активних тромбоцитів, що беруть

участь в реакції агрегації

Запропонованим способом обстежено 22 практично здорових людини 20 – 29 років, 40 практично здорових людей 60 – 79 років та 63 хворих на ІХС 60 – 79 років.

Приклад 1. У хворого Б., 65 років з діагнозом ІХС стабільна стенокардія III функціонального класу, параметри кривої адреналін-індукованої агрегації становлять

швидкість агрегації в 1-шу хв (V) – 10% / хв,

рівень максимальної агрегації (A) – 30%

При цьому, по даним люмінесцентної мікроскопії, кількість деагранульованих тромбоцитів в мазку становить 40%. Відповідно, кількість платівок, що агрегують в пробірці становить 60%.

Враховуючи це, параметри адреналін-індукованої агрегації склали

$$\text{швидкість агрегації (V1)} = 10 \times 100 / 60 = 16,3\%$$

$$\text{рівень максимальної агрегації (A1)} = 30 \times 100 / 60 = 50\%$$

Як свідчить наведений приклад, розраховані показники агрегації достовірно перевищують отримані при агрегатометрії та свідчать про високий рівень агрегаційної активності тромбоцитів у даного пацієнта, і відповідно – про підвищений ризик внутрішньосудинного тромбоутворення.

Приклад 2. У хворого Б., 60 років з діагнозом ІХС стабільна стенокардія I функціонального класу, параметри кривої адреналін-індукованої агрегації становлять

швидкість агрегації в 1-шу хв (V) – 10% / хв,

рівень максимальної агрегації (A) – 30%

При цьому, по даним люмінесцентної мікроскопії, кількість деагранульованих тромбоцитів в мазку становить 30%. Відповідно, кількість платівок, що агрегують в пробірці становить 70%.

Враховуючи це, параметри адреналін-індукованої агрегації склали

$$\text{швидкість агрегації (V1)} = 10 \times 100 / 70 = 14,2\%$$

$$\text{рівень максимальної агрегації (A1)} = 30 \times 100 / 70 = 42,8\%$$

Як свідчить наведений приклад, розраховані показники агрегації в цьому випадку також достовірно перевищують отримані при агрегатометрії та свідчать про високий рівень агрегаційної активності тромбоцитів.

Приклад 3. У здорового обстеженого А., 45 років параметри кривої адреналін-індукованої агрегації становлять

швидкість агрегації в 1-шу хв (V) – 10 %/хв,

рівень максимальної агрегації (A) – 30%

При цьому, по даним люмінесцентної мікроскопії, кількість деагранульованих тромбоцитів в мазку становить 5%. Відповідно, кількість платівок, що агрегують в пробірці становить 95%.

Враховуючи це, параметри адреналін-індукованої агрегації склали

$$\text{швидкість агрегації (V1)} = 10 \times 100 / 95 = 10,5\%$$

$$\text{рівень максимальної агрегації (A1)} = 30 \times 100 / 95 = 31,5\%$$

В наведеному прикладі розраховані показники агрегації майже не відрізняються від отриманих при агрегатометрії, що підтверджує дійсно невисокий рівень агрегаційної активності тромбоцитів у

обстеженої людини

Параметри адреналін-індукованої агрегації тромбоцитів, отримані при проведенні агрегатомет-

рії без врахування кількості активних тромбоцитів, та після перерахунку, наведені в таблиці 1

Таблиця 1

Параметр	Група	Швидкість агрегації		Рівень максимальної агрегації	
		результат агрегатометрії	розрахований показник	результат агрегатометрії	розрахований показник
Здорові 60 – 79 років		19,26 ± 1,23	23,18 ± 2,21	50,32 ± 2,43	54,12 ± 3,41
Хворі на ІХС 60 – 79 років		21,69 ± 3,20	31,49 ± 3,12**	52,09 ± 3,20	72,12 ± 3,20**

Примітка \*\* Р < 0,01 у порівнянні з групою здорових

Як свідчать наведені в таблиці дані, параметри адреналін-індукованої агрегації у практично здорових, та хворих на ІХС, отримані при прове-

дені агрегатометрії практично не відрізняються

Однак, згідно результатам люмінесцентної мікроскопії, кількість дегранульованих тромбоцитів у хворих на ІХС значно перевищує цей показник в групі здорових (Таблиця 2)

Таблиця 2

Параметр	Група	Морфологічні групи тромбоцитів (%)				
		юні	неактивовані	активовані	дегранульовані	агреговані
здорові 60 – 79 років		0,41 ± 0,07	59,91 ± 1,72	18,53 ± 1,12	7,54 ± 0,36	12,89 ± 0,73
хворі на ІХС 60 – 79 років		0,61 ± 0,09**	44,21 ± 1,38**	23,48 ± 0,69**	24,72 ± 1,27**	10,87 ± 0,56

Примітка \*\* Р < 0,01 у порівнянні з групою здорових

Відповідно, кількість активних кров'яних пластинок в пробах крові хворих на ІХС нижче, ніж у практично здорових і перерахунок параметрів агрегатометрії з врахуванням даних люмінесцентної мікроскопії свідчить про достовірно більш високий рівень агрегаційної спроможності тромбоцитів у

хворих на ІХС в порівнянні із здоровими людьми

Застосування запропонованого способу дозволить підвищити точність діагностики стану системи гемостазу і своєчасно прийняти необхідні міри для корекції функціонального стану тромбоцитів. Заявлений спосіб може бути використаний в клініко-діагностичних установах системи охорони здоров'я різного профілю