

Методологические подходы для минимизации лабораторных исследований в диагностике гиперагрегации тромбоцитов

Холманских Н. А. – врач клинической лабораторной диагностики ФГУ «НИИ ОММ Росмедтехнологий», г. Екатеринбург

Пестряева Л. А. – к.б.н., руководитель научного отделения биохимических методов исследования ФГУ «НИИ ОММ Росмедтехнологий», г. Екатеринбург

Данькова И.В. – к.м.н., старший научный сотрудник отделения интенсивной терапии и реанимации ФГУ «НИИ ОММ Росмедтехнологий», г. Екатеринбург

Methodological approaches for minimization laboratory researches in diagnostics of platelets hyperaggregation

Kholmanskikh N.A., Pestryaeva L.A., Dankova I.V.

Резюме

Предложен способ диагностики гиперактивности тромбоцитов, не требующий специальных условий моделирования реологии в сосудистой стенке *in vitro*. Способ основан на биохимическом исследовании плазмы крови пациента, используемой для рутинных гемостазиологических тестов, с последующим подсчетом диагностического индекса по решающему правилу. Всего обследовано 65 пациентов. Проведен корреляционный анализ степени агрегации тромбоцитов и pH плазмы крови пациентов. Методом дискриминантного анализа выведено решающее правило соответствия значений pH плазмы и гиперагрегации тромбоцитов: $D = \text{const1} \times \text{PPP} - \text{const2}$ где: D - диагностически значимый индекс; const1 и const2 - постоянные величины; PPP - значение показателя pH бедной тромбоцитами плазмы исследуемого пациента. Способ не требует дорогостоящей материально-технической базы, специальных реактивов, удобен в исполнении при использовании минимального количества исследуемого материала, обеспечивает получение необходимой информации в течение часа с момента забора крови пациента, воспроизводим в лаборатории любого уровня.

Ключевые слова: гиперагрегация, тромбоциты, pH плазмы крови.

Summary

The way of diagnostics of hyperactivity platelets, not demanding special conditions of haemocoagulation shifts in a vascular wall *in vitro* is offered. The way is based on biochemical research of plasma of blood of the patient used for routine haemostaziological of tests; with the subsequent calculation of a diagnostic index by solving rule. It is surveyed 65 patients in total. The correlation analysis of a degree of aggregation platelets and pH-plasmas of blood at women is carried out. The method of the discriminantal analysis deduces solving rule of conformity of values pH-plasmas and hyperaggregations of platelets. Solving rule: $D = \text{const1} \times \text{PPP} - \text{const2}$. Where: D - diagnostic significant index; const1 and const2 - constants; PPP - value of a parameter pH poor platelets plasmas of the researched patient. The way does not demand the expensive material base, special reactants, is convenient in execution at use of a minimum quantity of a researched material, provides reception of the necessary information within one hour from the moment of a fence of blood of the patient, we reproduce in laboratory of any level.

Keywords: hyperaggregation, platelets, pH-plasmas of blood

Введение

Исследованию гемостаза в клинической и лабораторной практике в последние десятилетия уделяется большое внимание. Современная лабораторная диагностика основана на понимании общебиологических за-

кономерностей функционирования системы гемостаза и выбора адекватных методов оценки их состояния. К сожалению, исследованию сосудисто-тромбоцитарного звена на практике, уделяется мало внимания. Традиционно ограничиваются общим подсчетом концентрации тромбоцитов, т.к. методы исследования функциональной активности тромбоцитов характеризует повышенная сложность в организации диагностического процесса и трудоемкость в исполнении.

Референсным методом определения функциональной активности тромбоцитов, считается метод, предло-

Ответственный за ведение переписки -
Холманских Наталья Александровна.
620028, Екатеринбург, ул. Репина, д.1.
Pestryaev@k66.ru

женный *Вот*. Определения функциональной активности тромбоцитов, происходит по флуктуации светопропускания тромбоконцентрата на агрегометре [1]. Преимуществом этого метода является исследование агрегации в стандартизированных условиях. Метод дорогостоящ и трудоемок в исполнении, требует наличия специфической аппаратуры, для организации и регистрации агрегационного процесса: моделирования специальных условий реологии сосудистой стенки *in vitro*: выделения «живого» тромбоконцентрата, количественного приведения диагностических проб тромбоцитов в соответствие с требованиями производителей диагностической аппаратуры, приобретения диагностических наборов реагентов.

В связи с широким внедрением в практическое здравоохранение системы менеджмента качества, основанной на единых требованиях международных стандартов для диагностики *in vitro*, принципов стандартизации системы аналитического процесса и обеспечения медицинской лаборатории, стало возможной разработка новых критериев диагностики [2,3].

Нами предложен способ диагностики гиперагрегации тромбоцитов на основе базовых положений о системе крови и клеточной теории строения организма, где тромбоцит рассматривается как клетка, а ее функциональное состояние есть результат механизма межклеточного и межклеточного взаимодействия. На сегодняшний день способ диагностики функционального состояния тромбоцитов на основании данной зависимости отсутствует. Прототипом предложенного способа является доказанная зависимость функциональных и морфологических изменений клеток от pH (концентрации водородных ионов) окружающей физиологической среды [4, 5, 6, 7] и исследования, подтверждающие наличие функциональных особенностей клеток крови в зависимости от результатов продуктов метаболизма межклеточных взаимодействий [8, 9]. За основу взяты два унифицированных метода:

1. pH-метрия, как один из показателей кислотно-основного состояния (КОС) физиологической среды [10];
2. определение функциональной активности тромбоцитов по флуктуации светопропускания тромбоконцентрата по *Вот* на агрегометре. Методы считаются «золотым стандартом диагностики», т.к. исследования проводятся в стандартизированных условиях.

Целью настоящей работы было проведение сравнительного анализа агрегационной активности тромбоцитов и pH плазмы для определения дополнительного диагностического критерия в оценке агрегационной активности тромбоцитов.

Материалы и методы

Проанализированы результаты обследования пациентов (65 человек), обратившихся в научно-консультативную поликлинику ФГУ «НИИ ОММ Росмедтехнологий».

Способ набора материала: сплошное контролируемое исследование.

Критерием исключения из исследования явля-

лись острые воспалительные заболевания и прием лекарственных препаратов оказывающих влияние на сводисто - тромбоцитарный гемостаз. Все пациенты за 10 дней перед обследованием не принимали дезагреганты, не проводилась профилактическая дезагрегационная и антикоагулянтная терапия.

Для исключения информационных ошибок, учета сходимости и воспроизводимости результатов лабораторных показателей, методы исследования были одинаковыми для всех пациентов (поводились на базе одной и той же лаборатории).

Всем пациентам проводился стандартная клинико-лабораторная диагностика состояния системы гемостаза (общее количество тромбоцитов, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПТ), концентрация фибриногена, лизис эуглобулиновой фракции (XII –а зависимый фибринолиз), РФМК - тест). В работе использовались унифицированные методики, сертифицированные анализаторы и наборы реагентов к ним (MICROS-60 ОТ HORIBA ABX (Франция), Helene Biosciences (Europe), «Технология - стандарт» (Россия)).

На основании проведенного обследования были сформированы две группы исследования. Пациенты с наличием признаков патологической активации сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза составили основную группу. Пациентки без патологии системы гемостаза были отнесены в группу сравнения.

Параллельно с лабораторными исследованиями системы гемостаза пациентам осуществлялось унифицированное определение функциональной активности тромбоцитов, pH окружающей физиологической среды. Функциональная активность тромбоцитов определялась по методу *Вот* на агрегометре AP2110 (Solar, Белоруссия). Исследование pH проводилось на газоанализаторе ABL-725 (Radiometer, Дания).

Материалом для исследования служила венозная кровь, полученная из локтевой вены пациента стандартизированным способом вакуумной венепункции для гемостазиологических лабораторных исследований с использованием первичных тест систем типа Vacutainer, Monovette, Venoject в объеме, указанном производителем для данного типа тест-систем.

Для получения бедной и богатой тромбоцитами плазмы использовали стандартный протокол проведения процедуры центрифугирования для данного типа плазмы крови (центрифугирование при 3000 - 4000 об/мин (1200g) в течение 15 минут и 1000 об/мин (240g) в течение 7 минут). Возможно использование центрифуги любой модели с достаточной величиной относительной центробежной силы центрифугирования конкретного ротора; с учетом соблюдения соответствия установки времени и условий центрифугирования [11].

Первичная статистическая обработка материала проведена с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel. Достоверность различий между показателями оценивали по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$. Дополнительно к стандартной статистической обработке

результатов исследований, полученные данные для оценки информативности признаков обрабатывались с помощью пакета прикладных программ «Квазар» (разработка ИММ УрО РАН, регистрация Гос. Фонда алгоритмов и программ № П006903) [12].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено, что показатели значений рН плазмы у пациенток обеих групп разнонаправлены, но прослеживалась четкая зависимость между функциональной активностью тромбоцитов и значениями рН ($p < 0,001$). Установлена достоверная отрицательная корреляционная связь между значением рН в плазме и степенью агрегации тромбоцитов: коэффициент корреляции r составил $-0,83$; ($p < 0,05$). Что позволило предложить способ диагностики гиперактивности тромбоцитов, не требующий специального моделирования условий реологии в сосудистой стенке *in vitro*. (Подана заявка на изобретение, приоритетная справка № 2010116052/15 от 22.04.2010г.).

Способ основан на биохимическом исследовании плазмы крови пациента, используемой для рутинных гемостазиологических тестов, с последующим подсчетом диагностического индекса по решающему правилу.

Методом дискриминантного анализа выведено решающее правило соответствия значений рН плазмы степени агрегации тромбоцитов, на основании которого вычисляют диагностический индекс D по формуле:

$$D = \text{const1} \times \text{PPP} - \text{const2}$$

где: D - диагностически значимый индекс; const1 и const2 - постоянные величины; PPP - значение показателя рН бедной тромбоцитами плазмы исследуемого пациента. Далее установлено, что при D менее $-0,25$, можно сделать достоверное заключение ($p < 0,001$) о гиперагрегации тромбоцитов, а при D более $-0,25$ можно сделать достоверное заключение ($p < 0,001$) об отсутствии признаков гиперагрегации тромбоцитов.

Характеристика диагностического метода: чувствительность алгоритма к наличию гиперагрегации тромбоцитов составляет 96,0%, специфичность 80,3%, эффективность метода $-88,15\%$.

Пример. Больная Г., 32 года. Соматически ВСД по гипертоническому типу. В анамнезе сверхранние оперативные роды в сроке 26-27 недель беременности в 2009г., в связи с тяжелой преэклампсией. Была направлена на исследование системы гемостаза в связи с планированием беременности. Результаты коагуляционного скрининга: количество тромбоцитов $257 \times 10^9 / \text{л}$, АЧТВ 31с (норма 30-40с), ПТ-тест 105% (норма 90-110%), фибриноген $2,5 \text{ г/л}$ (норма 2-4 г/л), лизис эуглобулиновой фракции (XII -а зависимый фибринолиз) - 8 мин (норма 7-12 мин), РФМК 6 мг/дл (норма до 4 мг/дл). Агрегация тромбоцитов с АДФ ($2,5 \text{ мкмоль/л}$): степень 108,7% (норма до 80%), скорость 80 % /мин., время 8 мин, однофазная, необратимая.

Заключение: признаки активации внутрисосудистого микросвертывания крови, гиперагрегация тромбоцитов.

Проведено исследование рН бедной тромбоцитами плазмы, которое составило 7,331. $D = -0,994$, что указывает на наличие гиперагрегации тромбоцитов.

Выводы

Предлагаемый способ диагностики гиперагрегации тромбоцитов, позволяет с высокой точностью поводить оценку состояния тромбоцитарного звена гемостаза и выявлять группу риска на развитие тромботических нарушений. Данный способ диагностики может быть предложен для широкого применения. Способ не требует дорогостоящей материально-технической базы, специальных реактивов, удобен в исполнении при использовании минимального количества исследуемого материала, обеспечивает получение необходимой информации в течение часа с момента забора крови пациента, воспроизводим в лаборатории любого уровня. ■

Литература:

1. Born C.V.R. Nature 1962; 189(1-2): 927-929.
2. ГОСТ Р ИСО22870 Национальный стандарт Российской Федерации (Проект) Исследования по месту лечения (ИМЛ). Требования к качеству и компетентности. Point-of-care testing (POCT) - Requirements for quality and competence. Клин. лаб. диагн. 2009; 7: 43-47.
3. Осипова О.Н., Менченя В.А., Капитулец Н.Н., Савичева А.М., Чередииченко Д.В., Эммануэль А.В. Руководство по качеству системы менеджмента качества медицинской лаборатории. СПб.-Тверь: ООО «Издательство «Триада»; 2008.
4. Абрамочкина И.Г. Клиническая оценка морфологических особенностей эритроцитов мочи у детей с гематурией различного генеза: Автореф. дисс. канд. мед. наук; Самара, 1998.
5. Marchetti P. Et al. Diabetologia. 1986; 29 (10): 695-698.
6. Джорджеву П., Паунеску Е. Биохимические методы диагноза и исследования. Бухарест; 1963. 84-106.
7. Делевский Ю.П. Влияние рН среды на агглютинирующую способность анти-а-моноклональных антител и их ингибирование а-гликоконъюгатами липидной и протеиновой природы с разными изоэлектрическими свойствами. Клин.лаб. диагн. 2008; 8: 29-32.
8. Холманских Н.А., Пестряева Л.А. Исследование состояния тромбоцитарного звена гемостаза по триместрам нормально протекающей беременности. Лабораторная медицина в свете Концепции развития здравоохранения России до 2020 года: труды научно-практической конференции (Москва. 2009г.). Москва; 2009: 168.
9. Холманских Н.А., Пестряева Л.А. Диагностика функциональных нарушений сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза при беременности. Мать и дитя: мат. X юбилейного Всерос. Форума. М., 2009: 227.
10. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир; 1991: 347-373.
11. Мошкин А.В., Долгов В.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике. М.; 2004. 14-39.
12. Математическое моделирование медицинских и биологических систем (под ред. Мазурова В.Д., Смирнова А.И.). УрО РАН СССР; 1989.