

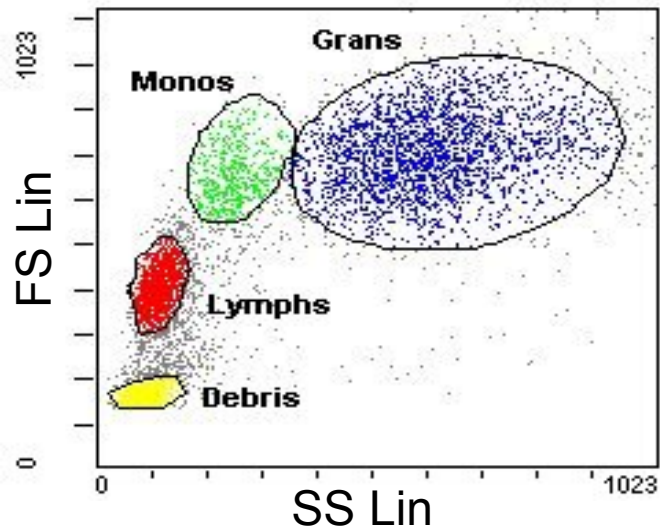
# Некоторые частные приложения клинической проточной цитометрии

Токар М. И.  
ЗАО «БиоХимМак Диагностика»

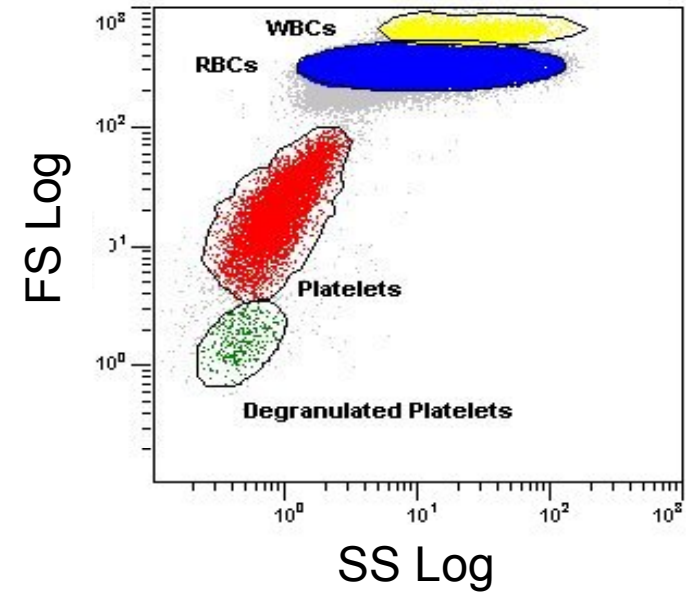




# Тромбоциты детектируются по светорассеянию



Цельная кровь после лизиса эритроцитов



Цельная кровь (без лизиса эритроцитов)



## Приложения проточной цитометрии к исследованию тромбоцитов (1)

### **Измерение активации тромбоцитов (циркулирующие активированные тромбоциты, гиперреактивность и гипореактивность тромбоцитов)**

- Активационно-зависимые антигены
- Лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты
- Тромбоцитарные микрочастицы
- Тромбоцитарно-тромбоцитарные агрегаты
- Кровотечение

### **Диагностика специфических заболеваний**

- Синдром Бернара-Сулье
- Тромбастения Гланцманна
- Патология пулов хранения
- Гепарин-индуцированная тромбоцитопения

### **Мониторинг противотромбоцитарных агентов**

- Тиенопиридины
- Антагонисты GPIIb-IIIa
- Аспирин

### **Мониторинг тромбоцитопоза**

- Ретикулированные тромбоциты



## Приложения проточной цитометрии к исследованию тромбоцитов (2)

### Применения для банков крови

- Контроль качества тромбоцитарных концентратов
- Оценка контаминации тромбоцитарных концентратов лейкоцитами
- Иммунофенотипирование НРА-1а
- Детекция антител матери и плода против НРА-1а
- Тромбоцитарный кросс-матч тест

### Ассоциированные с тромбоцитами иммуноглобулины

- Иммунная тромбоцитопения
- Аллоиммунизация

### Подсчёт тромбоцитов

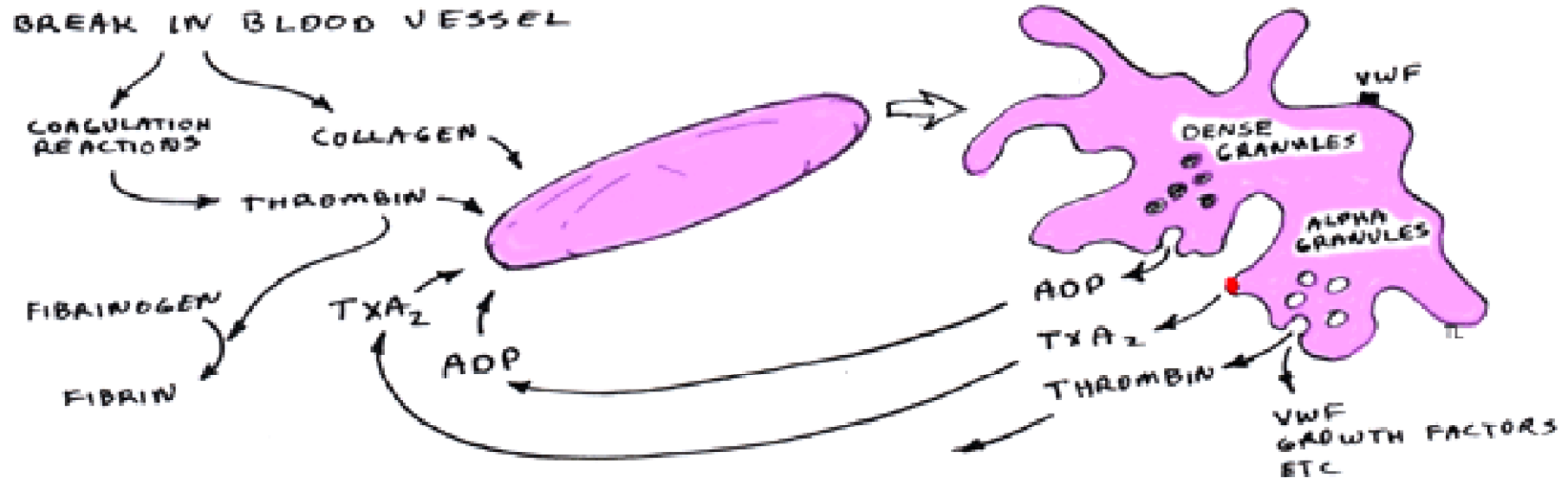
### Другие исследовательские задачи

- Выживаемость, трассировка и функционирование тромбоцитов *in vivo*
- Кальциевый взрыв
- F-актин
- Передача сигналов
- Флуоресцентный резонансный перенос энергии



- I. Активационно-зависимые антигены
- II. Лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты
- III. Тромбоцитарные микрочастицы

# Активация тромбоцита



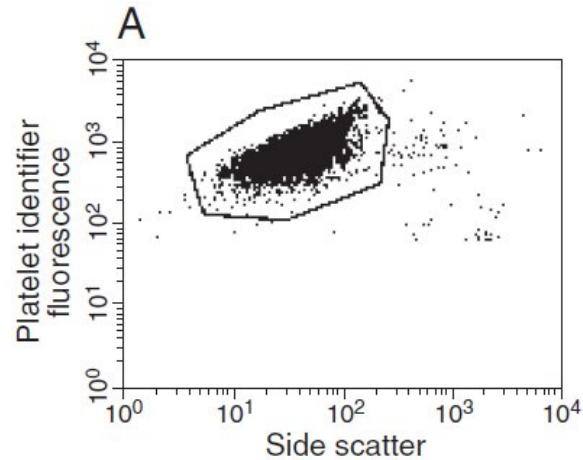
Первичная активация тромбоцита, например, тромбином, приводит к появлению на его поверхности дополнительных адгезивных молекул, высвобождению содержимого гранул и конформационным изменениям в гликопротеиновых рецепторах. Всё это способствует распространению и усилению активации тромбоцитов и в конечном счёте адгезии.



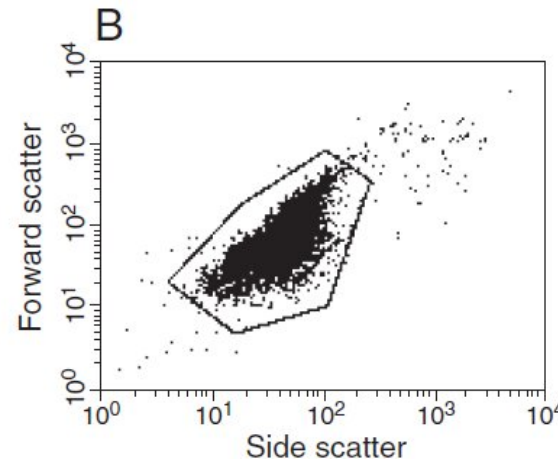
- Белки гранулярных мембран
  - P-селектин ( $\alpha$ -гр.)
  - GMP-33 ( $\alpha$ -гр.)
  - CD63 (лизосомы)
  - LAMP-1 (лизосомы)
  - LAMP-2 (лизосомы)
  - CD40 лиганд
  - LOX-1 (лектин-подобный рецептор окисленных липопротеинов низкой плотности)



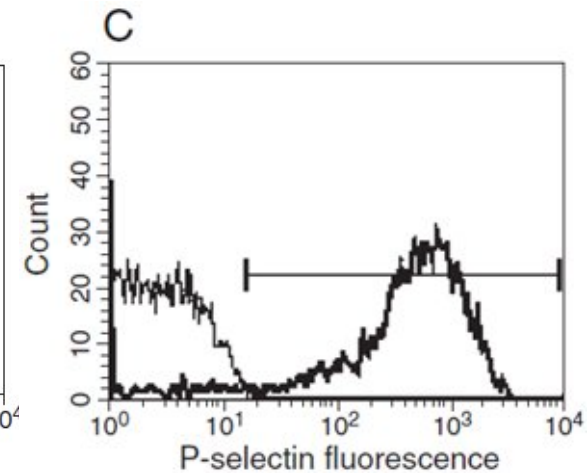
## Оценка активации по фенотипу тромбоцитов



Идентификация тромбоцитов по флуоресцентному маркеру



Идентификация одиночных тромбоцитов по светорассеянию



Оценка активационного маркера (контроль – без активации)

Агонисты тромбоцитов: тромбин, TRAP (thrombin receptor-activating peptide), ADP (adenosine diphosphat), эпинефрин...



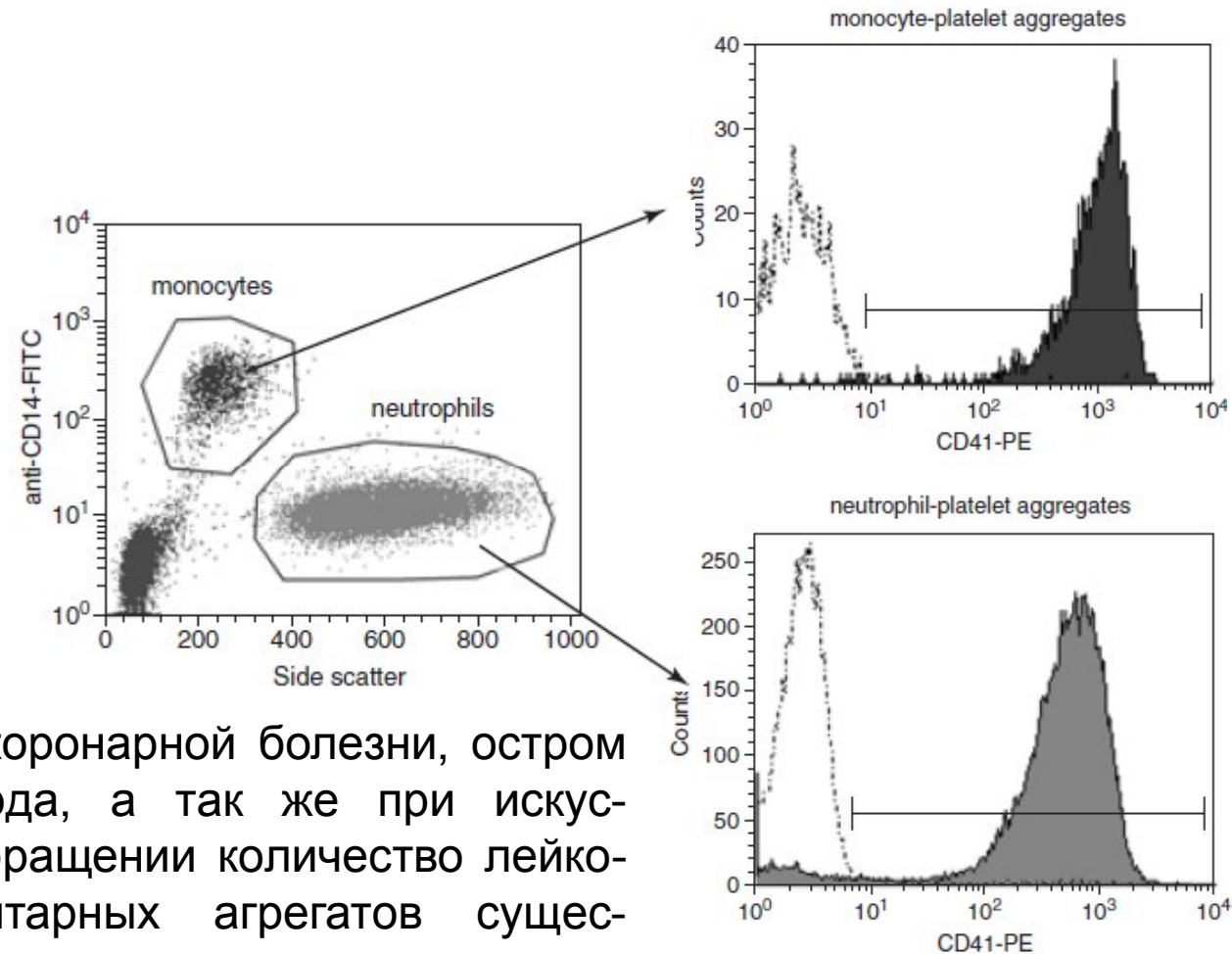


## Лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты

- Активация тромбоцитов в сосудистом русле приводит к появлению на их поверхности P-селектина, который образует связь с PSGL-1, постоянно экспрессирующимся на нейтрофилах и моноцитах. Образуются агрегаты, которые обладают значительно большей устойчивостью, нежели сами по себе активированные тромбоциты.
- Обнаружено, что количество циркулирующих лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов является гораздо более чувствительным и устойчивым показателем активации In Vivo, чем экспрессия P-селектина.



# Лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты

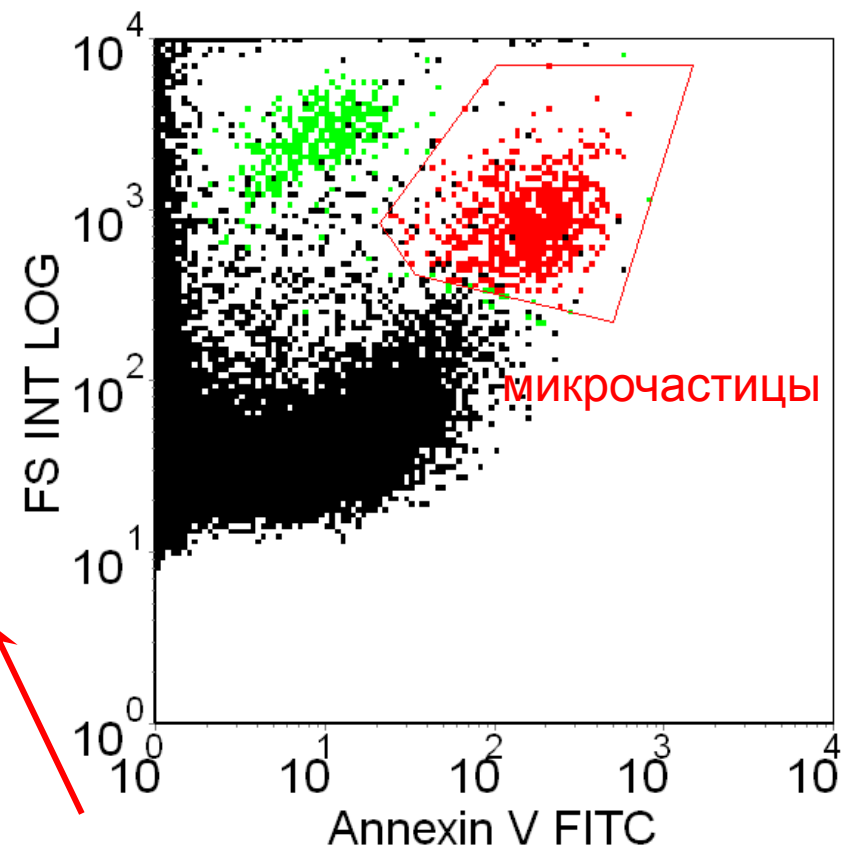
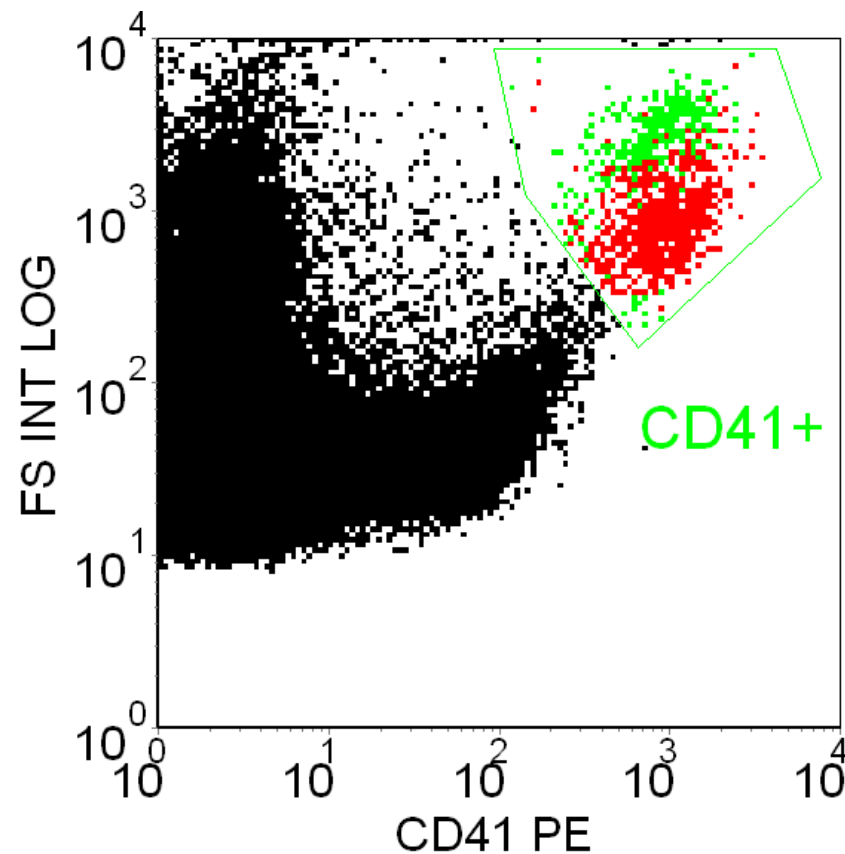


При стабильной коронарной болезни, остром инфаркте миокарда, а так же при искусственном кровообращении количество лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов существенно увеличивается.

Некоторые частные приложения клинической проточной цитометрии, М. Токар



- Нормальная плазма (активация TRAP-6)



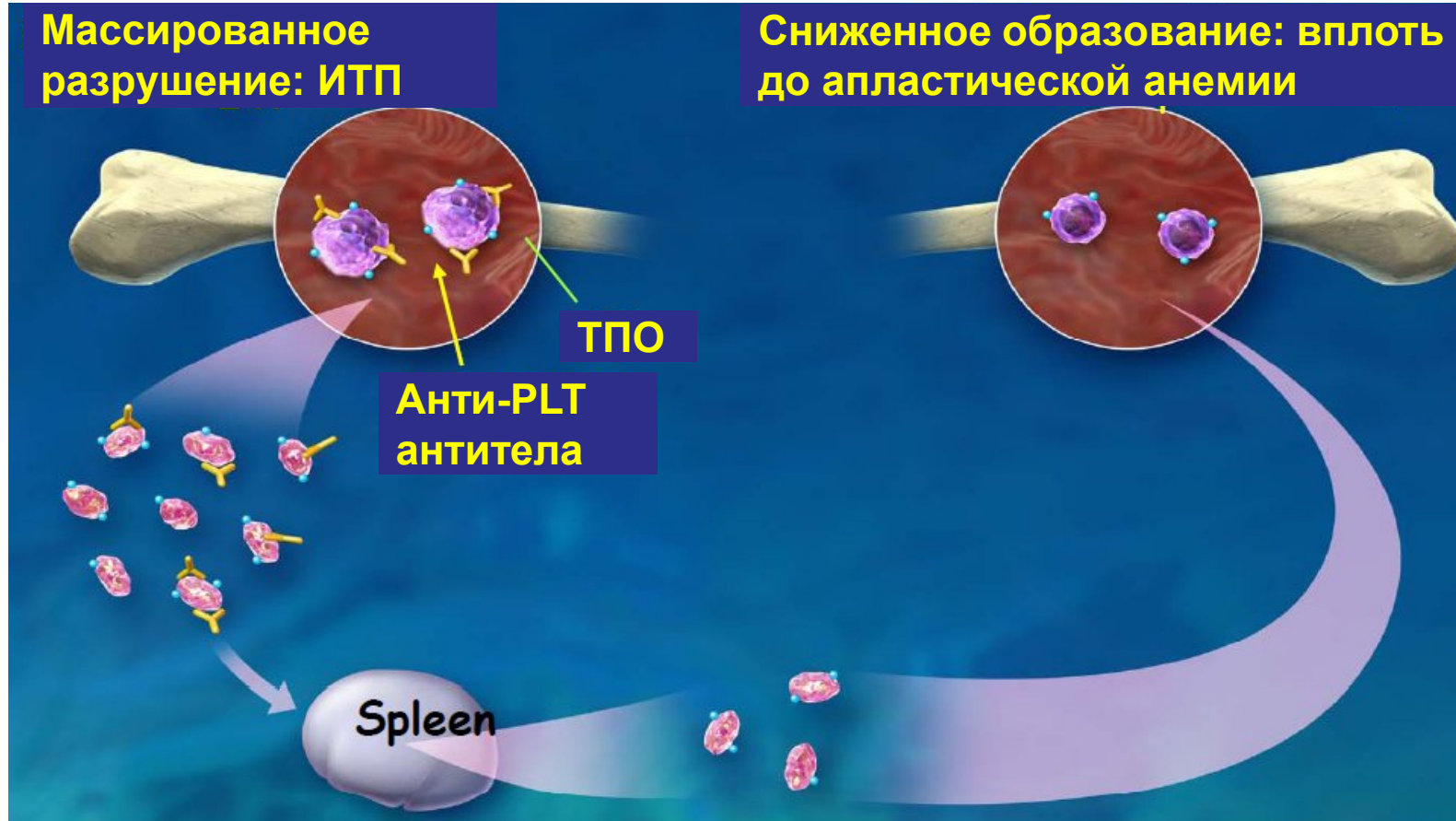


- *In vivo*: Состояние тромбоцитов отражает состояние сосудистой стенки. Но! В связи с чрезвычайной реактивностью тромбоцитов и скоротечностью процессов активации и «инактивации» применение различных аналитических подходов даёт различные результаты.
- *in vitro*: исследование процессов реакции на агонисты. Требует стандартизации условий эксперимента.





# Дифференцировка тромбоцитопений



Некоторые частные приложения клинической проточной цитометрии, М. Токар



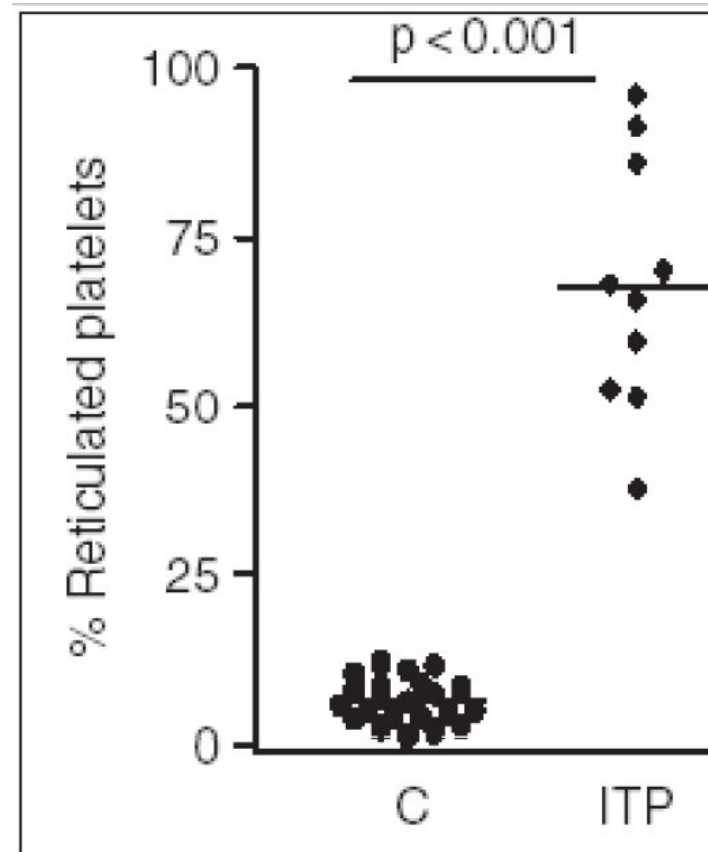


## Ретикулированные тромбоциты

- Молодые содержащие мРНК
- «Время жизни» 1 день
- Более крупные
- В норме <10%

повышенное или нормальное содержание мегакариоцитов:  
ИТП

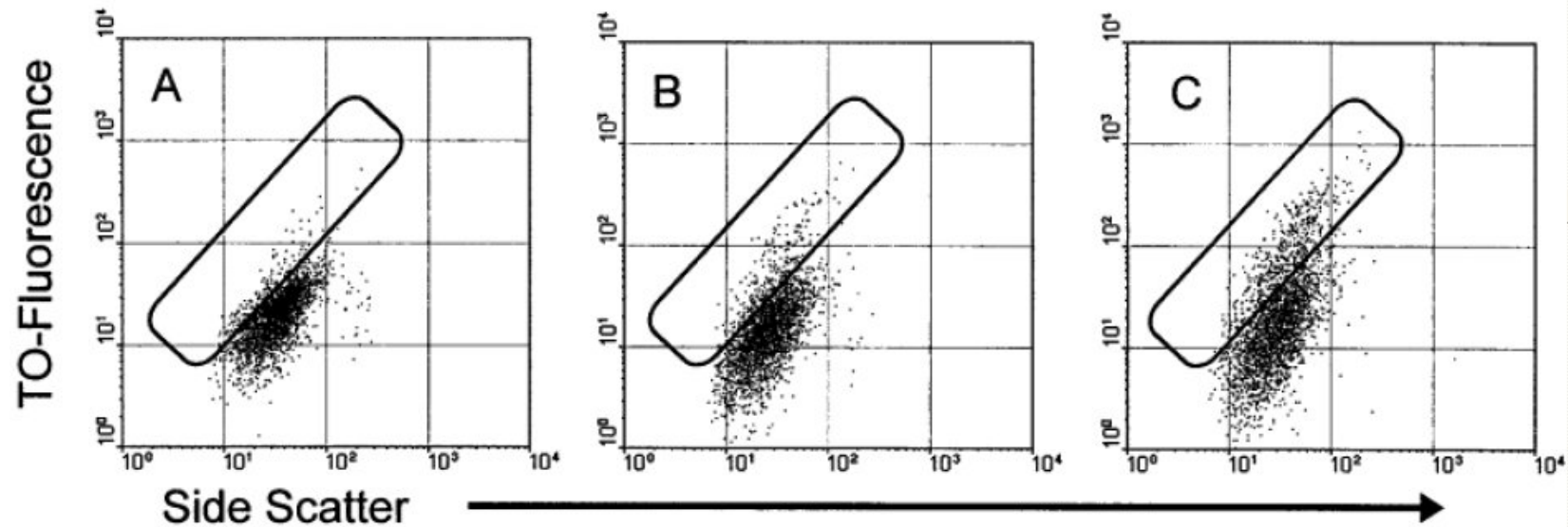
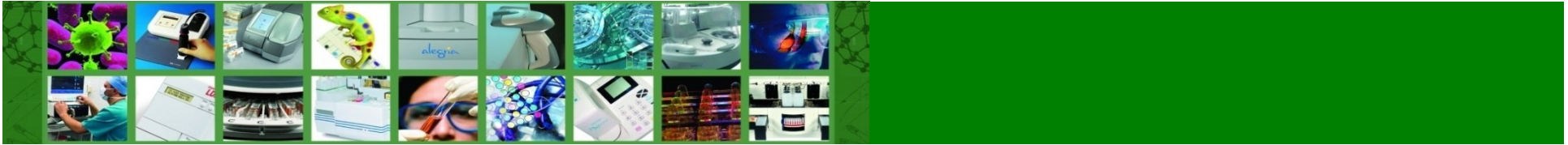
сниженное: недостаточная продукция





## Постановка для проточного цитометра

- Реагенты: Тиазоловый оранжевый (ТО), маточный раствор 1 мг/мл, в метаноле хранить в темноте, (-20°С), рабочее разведение готовить непосредственно перед окрашиванием; CD61-PE.
- Приготовление пробы:
  - 5 мкл цельной периферической крови с ЭДТА.
  - Добавить 5 мкл CD61-PE и 50 мкл 1 мг/мл ТО.
  - Инкубировать 15 минут при комнатной температуре.
  - Фиксировать в 1 мл PBS с 1% формальдегида.
- Негативный контроль: после фиксации внести РНКазу в к. к. 500 U/мл, инкубировать 30 минут.



- А – здоровый донор; В – пациент после химиотерапии, PLT 11 000/мкл; С – тот же пациент через сутки (выход тромбоцитов увеличивается).