

APŽVALGINIS STRAIPSNIS

Trombocitų funkcijos tyrimo galimybės

Aušra Mongirdienė

Kauno medicinos universiteto Kardiologijos institutas, Biochemijos katedra

Raktažodžiai: trombocitų funkcija, kraujavimo laikas, trombocitų agregacija, PFA-100, tėkmės citometrija.

Santrauka. Darbo tikslas. Sudaryti prielaidas lengvesniam trombocitų tyrimo būdų pasirinkimui remiantis jų charakteristikų lyginamąja analize. Dabar trombocitų funkcijai tirti naudojami skirtingais principais veikiantys ir labai nevienodomis galimybėmis pasižymintys aparatai ir jų sistemos. Deja, dėl didelės trombocitų defektų įvairovės nė vieno jų tikslumas nesiekia 100 proc. Norint išvengti klaidų, tenka naudoti kelis tyrimo būdus. Bandoma bent minimaliai apžvelgti kiek galima didesnę kiekį naudojamų ir pradedamų diegti į praktiką trombocitų funkcijos tyrimo būdų, jų galimybes, privalumus bei trūkumus. Trombocitų funkcijos tyrimo analizė pateikiama dviem aspektais: pagal jos tyrimo objektą ir objekto tyrimo metodus bei pagal dažniausiai naudojamus trombocitų funkcijos tyrimo būdus. Svarbiausi kriterijai pateikiami dviejose lentelėse.

Ivadas

Rašytiniuose šaltiniuose žinių apie trombocitus, kaip kraujo ląsteles, dalyvaujančias kraujo krešėjime, randama jau 19 a. (1). Taigi iki šių dienų mūsų supratimas apie trombocitų reikšmę organizmui labai pasikeitė. Dabar jau žinome, kad trombocitai dalyvauja hemostazės ir trombozės procesuose (trombocitų adhezijoje (2), aktyvijoje (3, 4), sekrecijoje (5), agregacijoje (2, 6), krešulio retrakcijoje (7), audinių atsinaujinimo procese (8, 9) ir kt.), smulkiųjų kraujagyslių tonuso palaikyme ir reguliavime (neaktyviems trombocitams išskiriant serotoniną (10), o aktyviems: serotoniną, tromboksaną ir prostaglandinus (4, 11, 12)), uždegiminiuose procesuose (pasireiškiant aterosklerozei (2, 9), alerginei astmai (5), inkstų ligoms (8, 13, 14) ir kt.), apsauginėse organizmo reakcijose (virusų ir bakterijų fagocitozėje/internalizacijoje, žudant bakterijas, superoksidų gamyboje (15) ir kt. (5, 16, 17)), auglių formavimesi (augime, metastazavime (15), naikinime) (5, 17). Dėl to didelis dėmesys skiriamas jų tyrimo metodams. Metodų kūrimą labai suaktyvino naujos žinios apie trombocitų morfologiją ir fiziologiją (1, 4, 7, 9, 18, 19). Šios žinios sudarė naujas prielaidas tobulinti esamus tyrimo būdus ir kurti naujus. Ir dabar atliekama daugybė mokslinių tyrinėjimų šia kryptimi (5, 7, 20–27 ir kt.). Tobulinant trombocitų funkcijos tyrimo metodus, svarbūs darbai,

vadovaujant prof. habil. dr. P. Grybauskui, padaryti ir Kauno kardiologijos institute (9, 28–30), ypač ieškant naujų trombocitų tyrimo būdų, panaudojant ultragarso sklidimo laiko matavimą kraujyje (7, 23). Prie šių darbų daug prisidėjo Kauno technologijos universiteto Ultragarso instituto mokslininkai (31).

Apie trombocitų funkcijos tyrimo metodus literatūroje yra nemažai apžvalgų (5, 6, 32 ir kt.). Tačiau jose nagrinėjama viena ar kita šių metodų grupė. Bendresnio šių metodų aprašymo nepavyko rasti. Esant tokiai situacijai, atsiranda sunkumų pasirenkant vienokią ar kitokią trombocitų tyrimo būdą. Tinkamo būdo parinkimas darosi dar aktualesnis žinant, kad dėl didelės trombocitų defektų įvairovės esami tyrimo metodai nėra jautrūs 100 proc. (5, 33). Todėl naudinga viename straipsnyje bent minimaliai apžvelgti kiek galima daugiau naudojamų ir pradedamų diegti į praktiką trombocitų funkcijos tyrimo būdų, jų galimybes, privalumus bei trūkumus. Visa tai turėtų geriausiai atsiskleisti sugrupavus trombocitų funkcijos tyrimus pagal jos tyrimo objektus.

1. Trombocitų skaičiaus nustatymas

Trombocitų skaičius nustatomas dviem būdais: hematologiniu analizatoriumi arba tiriant kraujo tepinėlį (1 lentelė).

1.1. Trombocitų skaičiaus nustatymas hematolo-

1 lentelė. Trombocitų funkcijos tyrimo būdai ir metodai

Tyrimo objektas	Tyrimo metodas ir aparatūra		Pastabos
1	2		3
Trombocitų skaičius	Antikoaguluotas kraujas vertinamas hematologiniu analizatoriumi (1)		Nustatomas trombocitų skaičius ir vidutinis jų tūris (MPV)
	Trombocitus kraujo tepinėlyje mikroskopu skaičiuoja tyrėjas (34)		Nustatomas trombocitų skaičius
Kraujavimo laikas	Aivo metodas (5)		Daromas pjūvis dilbio odoje
	Rumpel-Lydo metodas (1, 28)		Skaičiuojamos petechijos žemiau manžetės
	Duke metodas (28)		Daromas pjūvis ausies kaušelio odoje
	Aspirino tolerancijos testas (35, 37)		Daromas pjūvis piršto odoje
	Kratzerio metodas (analizatorius PFA-100) (1)		Tiriamas antikoaguluotas kraujas šlyties-trinties sąlygomis naudojant standartinius agregacijos induktorių derinius
Trombocitų agregacija	Turbidimetrinis metodas	„Chrono Log“ sistema (34)	Tiriama specialiai paruošta plazma naudojant įvairius agregacijos induktorių derinius ir jų koncentracijas
		RPFA (1, 6, 40)	Tiriamas antikoaguluotas kraujas naudojant įvairius agregacijos induktorių derinius ir jų koncentracijas
	Impedanso metodas (6, 50)		Tiriamas atskiestas fiziologiniu tirpalu antikoaguluotas kraujas naudojant įvairius agregacijos induktorių derinius ir jų koncentracijas
	Liuminescencinis metodas (5)		Pusiau kiekybinis tyrimas, skirtas trombocitų agregacijai ir ADP išlaisvinimui nustatyti
	Trombocitų agregacijos tyrimo sistema („Platelet works“) (52, 53)		Nustatomas trombocitų skaičius ir agregacija (naudojama ADP arba kolagenas) 1 ml antikoaguluoto kraujo. Galima stebėti gydymą trombocitų aktyvumą slopinamaisiais vaistais
	Lazerinis agregometras PA-200 (5)		Jautrus. Skirtas trombocitų aktyvumui ir mikroagregatų susidarymui vertinti
	Trombocitų agregacijos kūginis analizatorius	CPA (6)	Trombocitų adhezija ir aktyvacija vertinama citruotame kraujyje (pakanka 0,12 ml) pusiau automatinio būdu
		IMPCT (6)	Trombocitų adhezija ir aktyvacija vertinama citruotame kraujyje (pakanka 0,12 ml) automatinio būdu
Trombocitų receptoriai ir iš trombocitų granulių sekretuojamos medžiagos	Tėkmės citometrija (17, 18, 57)		Galima tirti citruotą kraują, plazmą, dirbtinę terpę. Tiriama trombocitų receptoriai ir aktyvacijos žymenys, viduląstelinio signalo perdavimo sistemos. Brangi įranga ir reagentai
	Liuminescencinis metodas (1)		Tiriama ADP sekrecija iš tamsių granulių. Brangūs reagentai
	Radioimuninis metodas (58)		Tiriama trombocitų 4-tojo faktoriaus ir β -tromboglobulino (α granulių junginių) koncentracija plazmoje. Brangūs reagentai
	Imunofermentinis (6)		Tiriamas arachidono rūgšties ir tromboksano B2 susidarymas
	Elektroninės mikroskopijos metodas (18)		Tiriama trombocitų ultrastruktūra, pavyzdžiui, jų tamsių granulių defektai. Brangi įranga
	Elektroforezės metodas (5)		Paprastas. Nustatomi kai kurių glikoproteinų defektai
Krešulio retrakcija	Tromboelastografija (60)		Nustatomas krešulio elastingumas, kraujo krešėjimo fazių trukmė natyviame kraujyje
	HAS (63)		Nustatomas krešulio elastingumas, trombocitų kontraktilinės jėgos, trombino susidarymo laikas. Pakanka 700 μ l citruoto kraujo
	Naudojant mėgintuvėlį (7, 28, 38, 35)		Stebima, kada pradeda retraguoti natyvinis kraujas ir kiek serumo išsiskiria iš krešulio

1 lentelės tęsinys

1	2	3
Kraujo hemostazė	Ultragarsinė koagulometrija (7)	Krešėjimo procesas tiriamas natyviniame kraujyje
	CSA (5)	Krešėjimo procesas tiriamas antikoaguliuotame kraujyje šlyties-trinties sąlygomis
	Hemostazės tyrimo įrenginys (61)	Tiriamas trombocitų aktyvumas. Nejaudrus aspirinui ir receptoriaus GP Ib receptoriaus defektams
	Gorog trombozės testas (5)	Trombocitų funkcija ir kraujo krešėjimo procesas tiriamas šlyties-trinties sąlygomis
Šlytis-trintis	Trombocitų būklės analizatorius (TSA) (5)	Trombocitų funkcija tiriami šlyties-trinties sąlygomis. Paprastas
Trombocitų adhezija	Platelet-Stat (61)	Nustatoma trombocitų adhezija prie kolageno membranos. Paprastas
	Trombocitų agregacijos kūginis analizatorius	CPA (6) Žr. trombocitų agregacija
		IMPCT (6) Žr. trombocitų agregacija
Trombocitų genetinės savybės	Trombocitų genomo tyrimai (5)	Nustatoma visa mRNR naudojant mikromatricių technologiją. Trūkumas, kad paruošta mRNR yra nepastovi
	Trombocitų baltymų tyrimai (61)	Yra galimybė tirti visus baltymus. Jautrus, bet tyrimo metu pametami kai kurie membranos baltymai. Iki šiol dar nežinomi visi trombocitų baltymai

giniu analizatoriumi. Žinoma, kad, esant pirminės hemostazės sutrikimo klinikai (kraujavimui iš gleivinių, petechijoms, menoragijai, po sužeidimo, kai kraujavimo intensyvumas neatitinka traumos dydžio (4)), pirmausia reikia ištirti trombocitų skaičių. Paprastai jis nustatomas tiriant antikoaguliuotą kraują hematologiniu analizatoriumi.

Normalus trombocitų skaičius – nuo 150 iki $300 \times 10^9/l$ (1). Mažesnis ar didesnis jų skaičius laikomas nenormaliu. Toks jis gali būti iš tiesų, bet gali būti ir netinkamai atliktas skaičiavimas. Klaidingai mažas trombocitų skaičius gali būti dėl EDTA sukeltos trombocitų agliutinacijos (pseudotrombocitopenija) arba dėl trombocitų sulipimo su neutrofilų plazminine membrana dėl IgG- ir IgM-trombocitinių agliutininų veiklos. Klaidingai per didelis trombocitų skaičius gali būti tada, kai kraujyje yra nedidelių netrombocitinių ląstelių fragmentų (pvz., esant ūminei leukemijai, kraujotakoje cirkuliuojantys blastai gali išskirti citoplazmines pūsles, o eritrocitams būdinga mikrosferocitozė) (34). Todėl būtinas papildomas tyrimas. Toks tyrimas yra kraujo tepinėlio tyrimas.

1.2. *Kraujo tepinėlio įvertinimas.* Trombocitus kraujo tepinėlyje mikroskopu skaičiuoja tyrėjas. Todėl išvengiama klaidų, kurias kartais padaro hematologinis analizatorius.

2. Kraujavimo laiko nustatymas

Esant normaliam trombocitų skaičiui, jų funkcijos

sutrikimams nustatyti naudojamas kraujavimo laiko tyrimas (1 lentelė). Jis gali būti atliekamas keliais būdais: Aivo, Rumpel-Lydo (dar kitaip vadinamas Heso arba Turniketo), Duke ir Kratzerio bei atliekant aspirino tolerancijos testą (1, 5, 18, 28). Šiais atvejais tiriamasis 10 dienų iki tyrimo negali vartoti trombocitų funkciją veikiančių vaistų (jei tyrimo tikslas – ne vaisto poveikio įvertinimas). Taip pat tiriamasis 24 val. iki tyrimo neturi būti vartojęs kofeino turinčio maisto (35) arba česnako, 1 sav. nevartojęs alkoholinių gėrimų.

2.1. *Aivo metodas.* Tiriant šiuo metodu, ant žasto juosiamą kraujospūdžio matavimo manžetė ir palai-komas 40 mmHg slėgis. Žemiau manžetės specialia adata odoje padaroma 10 mm ilgio ir 1 mm gylio žaizda. Iš jos besisunkiantis kraujas sugeriamas filtriniu popierėliu kas 30 sekundžių. Jei kraujavimas sustoja po 7 ± 2 min., tai rodmenys yra normalūs (1, 5, 36).

Šiuo būdu galima įvertinti trombocitų adheziją (ji nevyksta sergant Bernaro-Souljerio sindromu ir vWF liga), išlaisvinimo reakcijas (esant sekrecijos sutrikimams, nevyksta negrįžtamoji agregacija), agregaciją (ji sutrinka esant GPIIb-IIIa receptorių defektui), natūralią pirminę hemostazę, kur dalyvauja ir kraujagyslės sienelė (1). Šis metodas gali būti naudojamas vertinant aspirino, tienopiridinų, GPIIb-IIIa receptorių blokatorių poveikį tais atvejais, kai tyrimų galimybės nėra (5).

Šis metodas turi keletą trūkumų. Yra silpnas ryšys tarp vaistų sukeltų agregacijos pokyčių ir ilgos krauja-

vimo trukmės. Sudėtinga ši tyrimo būdą standartizuoti, nes rezultatai priklauso nuo atlikėjo igudimo (pjūvio ilgio ir gylio), odos temperatūros, kraujospūdžio venose, nuo klinikinių būklių (uremijos, kepenų nepakankamumo, mielominės ligos (6)), trombocitų skaičiaus (1, 6).

2.2. *Rumpel-Lydo* metodas. Tiriant kraujavimo laiką Heso arba Rumpel-Lydo būdu, ant žasto viršutinės dalies juosiamą kraujospūdžio matavimo manžetė. Vidutinis slėgis tarp sistolinio ir diastolinio AKS laikomas 5 min. Po to žemiau manžetės skaičiuojamos petechijos. Jei tyrimo rodmenys normalūs, matomos tik pavienės petechijos. Atsiradus daugiau kaip penkioms petechijoms (28), galima įtarti trombocitopatiją arba vaskulopatiją (1). Šis tyrimo būdas dėl mažo tikslumo dabar beveik nenaudojamas (5).

2.3. *Duke* metodas. Ausies kaušelio odoje padaromas tam tikro ilgio ir gylio pjūvis. Filtriniu popieriumi kas 30 sekundžių sugeriamas besisunkiantis kraujas, kol nustoja kraujuoti. Norma – 1–3 min. (28). Šis tyrimo būdas dėl mažo tikslumo taip pat beveik nenaudojamas (33).

2.4. *Aspirino tolerancijos* testas. Norint nustatyti, ar ligonio organizmas nėra nejautrus aspirinui ir nesant kitų galimybių, galima naudoti aspirino tolerancijos testą. Naudojant šį testą, pirmiausia nustatomas kraujavimo laikas Aivo metodu iš vienos rankos piršto. Po to ligonis suvartoja 600 mg aspirino ir po 2 val. vėl nustatomas kraujavimo laikas iš kitos rankos piršto. Jei pokyčių nėra, suvartojus aspirino, kraujavimo laikas neturėtų būti ilgesnis kaip 2–3 min. už kraujavimo laiką nevartojus aspirino (35). Žinoma, kad į aspiriną patologiškai reaguoja 15 proc. asmenų. Jiems kraujavimo laikas, suvartojus aspirino, ilgesnis. Kai kuriems asmenims aspirinas neveikia trombocitų funkcijos (37). Jiems kraujavimo laikas po aspirino suvartojimo pailgėja mažiau. Pagrindinis tyrimo trūkumas – sudėtinga standartizuoti kaip ir kitus *in vivo* kraujavimo laiko tyrimus.

Aprašyti kraujavimo laiko nustatymo būdai *in vivo* dabar trombocitų funkcijai tirti nerekomenduojami (32). Tačiau jų nereikėtų pamiršti naudoti tais atvejais, jei nėra kitos galimybės įvertinti pirminės hemostazės sutrikimų.

2.5. *Kratzerio ir Borno* metodas. Jis atliekamas *in vitro* PFA-100 trombocitų funkcijos analizatoriumi. Šis metodas sąlyginai paprastas. Jame imituojama kraujotakos srovė, todėl tyrimas atliekamas šlyties trinties sąlygomis. Citruotas kraujas kapiliaru traukiamas veikiant neigiamam slėgiui per 147 μ m dydžio ertmę membranoje, kuri yra specialioje plokštelėje (5, 35). Membrana padengta tam tikrais induktorių deri-

niais: kolagenas/adrenalinas arba kolagenas/ADP. Šių induktorių bei kraujo srovės veikiami trombocitai agreguoja ir užkemša ertmę membranoje. Analizatorius matuoja laiką, per kurį užsikemša ertmė membranoje. Tyrimas greitas (trunka iki 300 sek.), lengvai atliekamas, pakanka 0,8 ml citruoto kraujo vienam tyrimui. Tyrimą galima atlikti praėjus net 4 val. nuo kraujo paėmimo (38).

Lyginant tyrimų duomenis, būtina atkreipti dėmesį į citrato kiekį, kuris buvo mėgintuvėliuose ruošiant antikoaguliuotą kraują. Ar jis sudarė 3,8 proc. (0,129 M), ar 3,2 proc. (0,105 M). Pavyzdžiui, jei mėgintuvėlyje su antikoaguliotu krauju yra 3,2 proc. natrio citrato, tai, naudojant kolageną/ADP, normaliu laikomas 55–112 sek. trunkantis kraujavimas, o naudojant kolageną/ADR – 79–164 sek. (6).

Kratzerio ir Borno metodas rekomenduojamas naudoti atrenkant ligonius (1, 37, 38). Juo galima įvertinti GPIb, vWF receptorių būklę. Bet tam būtini specialūs antagonistai. Taip pat šiuo metodu galima įvertinti aspirino bei tienopiridinų poveikį trombocitams. Tai žymiai jautresnis tyrimo metodas už aukščiau aprašytus kraujavimo laiko tyrimo metodus (1).

Metodas turi trūkumų. Pirmiausia, jis jautrus daugeliui veiksnių, lemiančių trombocitų funkciją: trombocitų skaičiui, hematokritui, vaistams, maistui, trombocitų receptorių, vWF, išlaisvinimo ir granulių defektams (39, 33). Antra, kai jis rekomenduojamas naudoti nustatant trombocitų jautrumą aspirinui (5, 8), pabrėžiama, kad galimas neteisingas neigiamas rezultatas esant granulių saugojimo ir sekrecijos defektams, Hermanskio-Pudlako, Kvebeko sindromui, I tipo von Willebrando ligai (5, 39). Todėl, esant ribinėms arba didesnėms už normalias kraujavimo laiko reikšmėms, būtini papildomi tyrimai (33).

3. Trombocitų agregacijos tyrimai

Trombocitų agregacija gali būti tiriama kraujyje ir plazmoje (1 lentelė). Kraujyje atliekami tyrimai yra fiziologiškesni nei plazmoje, nes trombocitai, būdami kraujyje, sąveikauja ne tik tarpusavyje, bet ir su kitomis kraujo ląstelėmis.

Trombocitų agregacijos tyrimo būdai kraujyje: trombocitų agregacijos tyrimas turbidimetriniu (prietais RPFA), impedansiniu (viso kraujo agregometru „Chrono-Log“) ir trombocitų agregacijos tyrimo sistema („Plateletworks“), liuminescenciniu („Chrono-Log Liumi“ agregometru) metodais, lazeriniu agregometru (prietais PA-200), trombocitų agregacijos kūgininiu analizatoriumi (CPA ar IMPCT).

Trombocitų agregacijos tyrimo būdai plazmoje: liuminescencinis („Chrono-Log Liumi“ agregometru),

turbidimetrisinis arba optinis („Chrono-Log“ sistema).

3.1. *Trombocitų agregacijos tyrimas turbidimetrinio metodu* atliekamas kraujyje arba plazmoje. Kai jis atliekamas kraujyje, naudojamas prietaisas RPFA, o kai plazmoje – „Chrono-Log“.

3.1.1. *Trombocitų agregacijos tyrimas turbidimetrinio metodu* kraujyje atliekamas prietaisu RPFA („Ultegra Rapid Platelet Function Assay“) (1, 6, 40). Tai automatizuotas tyrimas, skirtas įvertinti aktyvuotų trombocitų gebą surišti fibrinogeną. Į tam tikras kasetes, padengtas fibrinogenu, pilama 0,16 ml citruoto kraujo (6). Siekiant pagreitinti trombocitų agregaciją, plieniniais rutuliukais 70 sek. kraujas maišomas su trombino receptorių aktyvuojančiu peptidu SFLLRN, ADP arba TRAP (1). Tada matuojamas kraujo šviesos pralaidumas. Agregavę trombocitai nusėda – tai didina šviesos pralaidumą (41). Agregacijos greitis ir intensyvumas perskaičiuojami į trombocitų agregacijos vienetus (Platelet Aggregation Unit – PAU) (42). Yra tiesioginė priklausomybė tarp neužblokuotų GPIIb/IIIa receptorių skaičiaus aktyvuotuose trombocituose ir trombocitų agregacijos (43).

Tyrimas naudojamas stebint gydymą GPIIb/IIIa receptorių blokatoriais (abcichimabu, tirofibanu, eptifibatidu ir orofibanu) (38, 44). Tikimasi, kad, parinkus tinkamus induktorių, šiuo būdu bus galima tirti aspirino bei klopidoirelio poveikį trombocitams (45). Tiriant tą patį mėginį RPFA prietaisu, rezultatai atskleidžia geriau nei „Chrono-Log“ prietaisu (22). Tačiau jie koreliuoja tarp plazmoje tirtos agregacijos ir kraujyje tirtos agregacijos (46). Tai greitas, nereikalaujantis specialaus kraujo paruošimo, lengvai atliekamas tyrimas (5).

3.1.2. *Trombocitų agregacijos tyrimas turbidimetrinio metodu* plazmoje „Chrono-Log“ sistema. Nesudėtingas ir gana informatyvus tyrimas. Naudojamas nuo 1960 m. (5, 32, 47).

Pirmiausia tyrimui gaunama turtinga trombocitų plazma. Antikoaguliuotas kraujas centrifuguojamas 15 min. (100 g) greičiu. Po to centrifuguojant trombocitų plazmą 30 min. (1000 g) greičiu, gaunama plazma be trombocitų (38).

Kiekviena plazma pilama į skirtingas skaidrias kiuvetes. Jos statomos į prietaisą ir inkubuojamos 2 min. 37°C temperatūroje. Prietaise šviesos pralaidumas plazmoje be trombocitų (PPP) (ji yra skaidri) prilyginamas 100 proc., o trombocitų plazmoje (PRP) (ji drumsta) – 0 proc. (34). Po 2 min. inkubacijos į trombocitų plazmą pilama norimos koncentracijos induktoriaus. Toliau tyrimo metu kiuvetės turinys maišomas maišykle. Trombocitams pradėjus agreguoti, šviesos pralaidumas per ją kinta (gerėja). Kintantis šviesos

pralaidumas trombocitų plazmoje yra rodomas kreivės pavidalo prietaiso kompiuterio monitoriuje. Vienoje koordinatinių ašyje žymimas laikas (min.), kitoje – pralaidumas šviesai (išreikštas proc.) (21).

Dažniausiai vartojami trombocitų agregacijos induktoriai: adenosindifosfatas (ADP), adrenalinas (ADR), kolagenas, tromboksano A₂ (TxA₂) analogas U46619, arachidono rūgštis, ristocetinas arba trombocitų receptorių aktyvuojantis peptidas (TRAP) SFLLRN (1, 35). Naudojant skirtingas induktorių koncentracijas, galima sukelti grįžtamąją arba negrįžtamąją agregaciją (6).

Naudojant šį testą, galima nustatyti trombocitų funkciją, atskirti Von Willebrando, Glandzmano ligas, Bernardo-Souljerio sindromą, stebėti medikamentinį gydymą (35). Skirtingi trombocitų agregacijos induktoriai yra specifiški tam tikroms krešėjimo patologijoms. Pavyzdžiui, vartojant ristocetiną galima diagnozuoti Von Willebrando ligą (47). Agregacija, indukuota ADP, kolagenu, ADR būna sumažėjusi sergant imunine trombocitopenine purpura (ITP) (35). Agregacija, indukuota ADP, ADR ir ristocetinu, sumažėja gydant aspirinu. Jo sukeltas veikimas išlieka dar 7–10 dienų nutraukus vaisto vartojimą (38). Arachidono rūgštis vartojama įvertinti trombocitų atsparumą aspirinui (32, 38).

Yra nemažai vaistų, mažinančių trombocitų agregaciją: aspirinas, antihistaminai, chlordiazepoksidas, klofibratas, kokainas, kortikosteroidai, diazepamai, dipiridamolas, furozemidas, gentamicinas, ibuprofenas, indometacinas, marichuana, fenotiazinai, fenilbutazonas, propranololis, pirimidino dariniai, sulfipirazonas, teofilinas, tricikliai antidepresantai (35) ir β-laktaminiai antibiotikai (33). Trombocitų agregacija padidėja insulino streso metu (sumažėjus gliukozei kraujyje), esant kortizolio, STH, prolaktino koncentracijų pokyčiams (adrenalino atpalaidavimo klinikiniai požymiai, nekoreliuojantys su laboratorinių tyrimų rodmenimis). Trombocitų agregacija sumažėja vartojant minėtus vaistus, sergant ITP, mielomine liga, makroglobulinemija, įgimtomis trombocitopatijomis, esant uremijai (8). Tyrimas neinformatyvus, jei trombocitų skaičius yra mažesnis nei 100×10^9 l arba plazma yra labai lipeminė (6).

Šis tyrimo būdas turi keletą trūkumų: galima nustatyti ne visus trombocitų funkcijos sutrikimus, nefiziologiškas, nes tiriama specialiai paruošta plazma, o ne kraujas, ilgai trunka plazmos paruošimas (45 min.) ir tyrimo atlikimas (apie 15 min.) (32). Nepaisant šių trūkumų, svarbūs jo privalumai: tyrimo būdas yra pakankamai jautrus bei specifiškas, vartojami reagentai yra pigūs, tinka stebėti gydymą aspirinu, klopi-

dogreliu. Todėl šis tyrimo būdas sėkmingai naudojamas tiek Lietuvos, tiek kitų šalių mokslo ir gydymo įstaigose (37, 38, 48, 49 ir kt.).

3.2. *Trombocitų agregacijos tyrimas impedansiniu metodu* („Chrono-Log“ agregometru) atliekamas atskiestame 1:1 fiziologiniu tirpalu antikoaguliuotame 37°C temperatūros kraujyje. Jame matuojama trombocitų agregatų sankaupos varža, kuri susidaro įpylus induktoriaus. Jo pilama po 1 min. trukusios inkubacijos (6).

Metodo privalumai: nereikia specialiai ruošti plazmos, fiziologiškesnis, išvengiama lipemijos įtakos. Tačiau jis yra nepakankamai tikslus, priklauso nuo trombocitų skaičiaus (50).

3.3. *Trombocitų agregacijos tyrimas liuminescenciniu metodu*. Juo nustatoma trombocitų agregacija (43) ir ADP išlaisvinimas (51). Metodas pusiau kiekybinis.

3.4. *Trombocitų agregacijos tyrimo sistema* („Platelet works“) nustatomas trombocitų skaičius ir agregacija (vartojama ADP arba kolagenas (32)) 1 ml antikoagulioto kraujo. Galima stebėti gydymą trombocitų aktyvumą slopinamaisiais vaistais (52, 53). Gauti rezultatai gerai koreliuoja su rezultatais, gautais *turbidimetriniu metodu* tiriant plazmą (32). Trombocitų agregacijos tyrimo sistema rekomenduojama naudoti skubios pagalbos atvejais (43).

3.5. *Trombocitų agregacijos tyrimas lazeriniu agregometru PA-200*. Tyrimas yra jautrus. Skirtas trombocitų aktyvumui ir mikroagregatų susidarymui įvertinti (5).

3.6. *Trombocitų agregacijos tyrimas kūginiu trombocitų analizatoriumi*. Trombocitų agregacijos tyrimui sukurti dviejų rūšių kūginiai analizatoriai: pusiau automatini (CPA) ir automatini (IMPCT).

3.6.1. *Trombocitų agregacijos tyrimas kūginiu pusiau automatiniu (CPA) trombocitų analizatoriumi* („Cone and Platelet Analyser“). Tyrimui naudojama 0,2 ml antikoagulioto kraujo, kuris pilamas į polistireno lėkšteles. Analizatoriuje yra viskozimetras, kuriuo matuojama trombocitų adhezija ir agregacija kraujo tėkmės sąlygomis (54). Trombocitų agregaciją vertina vaizdo analizatorius pagal tai, kiek polistireno lėkštelių paviršiaus padengė adhezavę trombocitai (55). Trombocitų adhezija prie šių lėkštelių priklauso nuo receptorių vWF, fibrinogenui, GPIIb/IIIa, GPIb/IX/X ir trombocitų aktyvumo (6). Todėl šis tyrimo būdas gali būti naudingas norint greitai nustatyti su šiomis struktūromis susijusius trombocitų defektus padidėjus trombocitų aktyvumui bei stebint gydymą trombocitų aktyvumą slopinamaisiais vaistais (56). Tai greitas ir paprastas tyrimas. Jo galimybės dar turi būti moks-

liškai patvirtintos (32).

3.6.2. *Trombocitų agregacijos tyrimas kūginiu automatiniu (IMPCT) analizatoriumi*. Veikimo principas toks pat kaip ir CPA, tačiau tyrimo procesas visiškai automatizuotas. Įvertinti trombocitų adhezijai ir aktyvacijai pakanka 0,12 ml antikoagulioto kraujo. Mažai paplitęs (6).

4. Trombocitų receptorių ir iš trombocitų granulių sekretuojamų junginių tyrimai

Trombocitų receptorių ir iš trombocitų granulių sekretuojamų medžiagų tyrimams atlikti naudojami tėkmės citometrijos, liuminescencinis, imunofermentinis, radioimuninis, elektroninės mikroskopijos, elektroforezės metodai (5, 6, 57, 58) (1 lentelė). Tėkmės citometru galima ištirti daugiausia trombocitų funkcijų atspindinčių rodiklių. Tuo tarpu kitų minėtų metodų galimybės šiuo atžvilgiu ribotos, todėl tėkmės citometrija yra aprašoma atskirai, o kiti metodai bendrai.

4.1. *Tėkmės citometrija*. Tai dalelių, judančių viena paskui kitą skysčio srovėje, matavimas. Šiuo prietaisu galima tirti antikoaguliotą kraują, trombocitinę plazmą arba dirbtinę terpę (1). Galima įvertinti 500–4000 ląstelių per sekundę ir nustatyti kelis jų parametrus vienu metu (dydį, skaičių, grūdėtumą, įvairius paviršinius ir viduląstelinius žymenis, taip pat trombocitų kiekvienos receptorių grupės aktyvumą ir skaičių) (59).

Trombocitai pažymimi monokloniniais antikūnais, sujungtais su fluorochromais, „išbarstančiais“ skirtingo spektro šviesą. Antikūnai yra specifiški ieškomiems junginiams (GPIb, GPIIb, PIIIa ar kt.). Jie naudojami išotinančiomis koncentracijomis. Tiriamoji terpė su antikūnais tam tikrą laiką inkubuojama. Tada antikūnų perteklius nuplaunamas ir terpė leidžiama per tėkmės citometrą tam tikru greičiu. Tiriama junginiai nustomi pagal „išbarstytos“ šviesos savybes (57).

Prietaisas gali būti naudojamas: trombocitų aktyvumui tirti (hiperaktyvumui ir hipoaktyvumui); vaistų poveikiui konkreitiems receptoriams tirti; P-selektino tyrimams; heterotipinių agregatų tyrimui (sergantiesiems išemine širdies liga, monocitų-trombocitų ir neutrofilų-trombocitų agregatai geriau atspindi trombocitų aktyvumą negu P-selektinas); trombocitų masės kokybės kontrolei kraujo bankuose (tiriamas P-selektinas, CD63 ir GPIIb/IIIa – jų pokyčiai rodo trombocitų morfologijos pokyčius); įgimtiesiems trombocitų receptorių defektams, saugojimo granulių ligoms, heparino sukeltai trombocitopenijai, trombopoezės greičiui nustatyti (17).

Vienintelis šio tyrimo būdo trūkumas – labai brangi įranga bei reagentai. Nepaisant to, dėl plačiausių tyri-

mo galimybių šis tyrimo būdas užima ypatingą vietą tarp kitų tyrimo būdų (33).

4.2. Kiti trombocitų granulių komponentų tyrimo metodai. *Liuminescenciniu* metodu, naudojant agregometrą, tiriama tamsiosiose granulėse esančio ADP sekrecija. Tam naudojama švytinti liuciferazė (33). ATP koncentracija nustatoma pagal žinomos ATP koncentracijos standartinę kreivę (1). Panašiai matuojama ir serotonino koncentracija.

Radioimuniniu metodu matuojama trombocitų ketvirtinio faktoriaus (PF4) ir β -tromboglobulino (β -TG) (α granulių junginių) koncentracija plazmoje (58). Vertinant tyrimų duomenis, būtina prisiminti, kad pastarųjų junginių koncentracija gali labai svyruoti priklausomai nuo kraujo paėmimo (59). Be to, trombocitų PF4 faktorių nuolat gamina, išskiria ir kaupia endotelis. Heparinas išlaisvina sukauptą PF4. Tai sukelia PF4 padaugėjimą plazmoje, nors trombocitų aktyvumas nepadidėjęs. PF4 ir β -TG gali padaugėti ir esant lėtiniam inkstų nepakankamumui (1). Šiuo arba *imunofermentiniu* metodu nustatoma ir tromboksano B_2 (TxB_2) koncentracija (6). Imunofermentiniu metodu galima nustatyti TxB_2 metabolitų (2,3-dinorprostaglandino) koncentraciją šlapime. Radus šių metabolitų, galima įtarti sisteminį trombocitų aktyvumo padidėjimą (1). α granulių transmembraninio proteino P-selektino koncentracija matuojama tėkmės citometru (6).

Elektroninės mikroskopijos metodu įmanoma tirti trombocitų ultrastruktūrą (33). Pavyzdžiui, jų granulių defektus (60). Tačiau tyrimų skaičių labai riboja brangi įranga.

Kai kurių glikoproteinų defektai nustatomi *elektroforezės metodu*. Tačiau šio paprasto tyrimo galimybės tirti daugelį glikoproteinų yra ribotos (5).

5. Krešulio retrakcijos tyrimai

Krešulio retrakcijos tyrimai atliekami tromboelastografu, hemostazės analizės sistema (HAS) ir naudojant paprastą mėgintuvėlį (1 lentelė).

5.1. Tromboelastografija. Tai kraujo krešėjimo grafinis registravimas (60), kuris atliekamas tromboelastografu. Jis sudarytas iš kiuvetės ir plūdės, kabančios ant plono plieninio siūlo. Į prietaisą esančią kiuvetę pilama natyvinio kraujo. Jam pradėjus krešėti, plūdė pradeda judėti. Susidarant krešuliui, plūdės judėjimo amplitudė didėja ir pasiekia maksimumą. Po to kurį laiką išlieka vienoda. Vėliau dėl krešulio retrakcijos plūdės judėjimo amplitudė mažėja. Plūdės judesiai registruojami tromboelastogramoje. Šio tyrimo metu galima stebėti visą kraujo krešėjimą, nustatyti jo fazių trukmę, krešulio elastingumą, krešėjimo sutri-

kimus (60). Šio prietaiso pagrindu kuriamas ir labai specifiškas būdas, skirtas trombocitų jautrumui aspirinui nustatyti (26).

5.2. Hemostazės analizės sistema (HAS). Nustatomas krešulio elastingumas, trombocitų kontraktinės jėgos, trombino susidarymo laikas. Pakanka 700 μ l citruoto kraujo. Sistema jautri krešulio struktūros pokyčiams, fibrinogeno koncentracijai, fibrino susidarymo greičiui, trombino inhibitorių poveikiui. Tai greitas visos hemostazės tyrimo būdas, tinkamas prokoagulantų ir antikoagulantų poveikiui stebėti (5).

5.3. Krešulio retrakcijos nustatymas naudojant paprastą mėgintuvėlį. Įpylus į mėgintuvėlį natyvinio kraujo, stebima, kada susidaręs krešulys pradeda trauktis ir kiek išsiskiria iš jo serumo. Retrakcija pradama vertinti praėjus ne daugiau kaip 30–60 min. nuo kraujo paėmimo momento. Normaliai krešulio retrakcija prasideda praėjus 1 val. nuo kraujo paėmimo ir baigiasi po 24 val. (28). Per tą laiką iš jo turi išsiskirti daugiau kaip 40 proc. serumo ir eritrocitų (7). Vertinant krešulio retrakciją, būtina žinoti trombocitų skaičių, fibrinogeno koncentraciją ir hematokritą, nes šie rodikliai gali lemti tyrimo vertes (38). Retrakcijos rodiklio padidėjimas klinikinės reikšmės neturi. Nustčius šio rodiklio sumažėjimą, galima įtarti Glandzmano ligą arba trombocitopeniją. Krešulys gali nesusidaryti DIK sindromo, afibrinogenemijos ir sunkios hemofilijos atvejais (35). Šis tyrimas kaip ir tromboelastografija gydymo įstaigose jau nebenaudojamas dėl nepakankamo specifškumo ir tikslumo. Jis dabar keičiamas trombocitų agregacijos ir adhezijos tyrimais.

6. Kraujo hemostazės tyrimai

Kraujo hemostazė tiriama *ultragarsinės koagulografijos* (7), *hemostazės tyrimo įrenginio* (61), *Gorog trombozės testu* (5) (1 lentelė).

6.1. Ultragarsinė koagulografija. Metodo esmę sudaro ultragarso sklaidimo greičio kitimas krešant natyviniam kraujui. Kraujo krešėjimo procesą galima tirti iki fibrinolizės (7). Tyrimui reikia 0,5 ml kraujo. Jo nereikia specialiai ruošti. Metodas dar nebaigtas kurti.

6.2. Hemostazės tyrimo įrenginys (Hemostatus device) (61). Juo tiriamas trombocitų prokoagulantinis aktyvumas. Nejautrus aspirinui ir receptoriaus GP Ib receptoriaus defektams.

6.3. Gorog trombozės testas. Juo nustatoma trombocitų funkcija ir kraujo krešėjimo procesas. Tyrimai atliekami šlyties-trinties sąlygomis. Paprastas, mažai paplitęs (5).

7. Šlyties-trinties tyrimo būdas

Trombocitų būklės analizatorius (TSA) (5). Trombocitų funkcija tiriama šlyties-trinties sąlygomis (1 lentelė).

8. Trombocitų adhezijos tyrimas

Trombocitų adhezijai tirti vartojami Platelet-Stat (61) ir trombocitų agregacijos kūginiai analizatoriai CPA (6) ir IMPCT (6) (1 lentelė). Išsamiau apie trombocitų agregacijos kūginį analizatorių 3.6 skirsnyje.

9. Trombocitų funkcijos genetiniai tyrimai

Trombocitų funkcijos genetiniai tyrimai atliekami tiriant jų genomą ir baltymus (1 lentelė).

9.1. *Trombocitų geno tyrimai*. Nustatoma visa mRNR naudojant mikromatricų technologiją. Trūkumas – paruošta mRNR yra nepastovi (5).

9.2. *Trombocitų baltymų tyrimai*. Įmanoma tirti visus trombocito ląstelę sudarančius baltymus. Jautrus. Turi nemažą trūkumą – tyrimo metu pametami kai kurie membranos baltymai. Darbą apsunkina ir tai, kad iki šiol nežinomi visi trombocitų baltymai (61).

Apibendrinimas

Straipsnyje trombocitų funkcijos tyrimo analizė

pateikiama dviem aspektais: pagal jos tyrimo objektą ir objekto tyrimo metodus (1 lentelė) bei pagal dažniausiai naudojamus trombocitų funkcijos tyrimo būdus (2 lentelė).

Žinoma, kad įvairių ligų metu atsiradusi pernelyg didelė trombocitų aktyvacija gali sukelti trombozę, o jų funkcijos nepakankamumas – kraujavimą. Todėl, norint numatyti trombozės ir kraujavimo pavojų, būtina įvertinti trombocitų funkciją (62). Tą padaryti būtų idealu molekuliniame (tiriant genetinę informaciją) lygmenyje: būtų galima tiksliai nustatyti susirgimo priežastį arba vaisto poveikį. Esami trombocitų tyrimo būdai dėl trombocitų aktyvacijos mechanizmų sudėtingumo yra sudėtingi (21).

Pateikti duomenys rodo, kad dabar trombocitų funkcijos tyrimams naudojami labai skirtingomis galimybėmis pasižymintys aparatai ir jų sistemos, kurių skirtingi ir veikimo principai (1 lentelė). Vienos jų pateikia informaciją ląstelių lygmenyje, kitos – receptorių, trečios – molekulių. Tačiau dėl didelės trombocitų defektų įvairovės nė vieno jų tikslumas nesiekia 100 proc. (5). Norint išvengti klaidų, tenka naudoti kelis tyrimo būdus.

Dabar trombocitams tirti dažniausiai naudojama agregometrija, tėkmės citometrija, kraujavimo laiko

2 lentelė. Dažniausiai naudojami trombocitų funkcijos tyrimo metodai ir jų charakteristika

Tyrimo metodai	Tyrimo objektas	Privalumai	Trūkumai
Aivo, Duke ir Rumpel-Lydo metodai (tarpusavyje panašūs, skiriasi atlikimo būdu)	Kraujavimo laikas	Fiziologiškas (nes atliekamas <i>in vivo</i>), greitas, paprastas. Galima įvertinti trombocitų adheziją, išlaisvinimo reakcijas, agregaciją, aspirino, tienopiridinų, GPIIb/IIIa blokatorių poveikį	Sunku standartizuoti, priklauso nuo atlikėjo įgudimo, odos temperatūros, kraujospūdžio venose, klinikinių būklių (uremijos, kepenų nepakankamumo, mielominės ligos)
Kratzerio metodas (atliekamas PFA-100 prietaisu)	Kraujavimo laikas	Sąlyginai fiziologiškas (nes įvertinamas ir šlyties-trinties poveikis), pakanka nedidelio kraujo kiekio (0,8 ml). Juo greitai ir paprastai atliekamas atrankinis tyrimas arba juo galima įvertinti GPIIb/IIIa receptorių blokatorių poveikį	Sunku diagnozuoti kai kurias ligas, nes naudojami standartiniai induktorių deriniai ir koncentracijos, tyrimui įtakos turi hematokritas. Dažnai reikalingi papildomi tyrimai
Turbidimetrisinis metodas	Trombocitų agregacija	Paprastas, naudojant įvairius induktorius ir jų koncentracijas, galima nustatyti daugelį trombocitopatijų, stebėti gydymą aspirinu, tienopiridiniais, GPIIb/IIIa receptorių blokatoriais	Nefiziologiškas (nes tiriamas ne kraujas, o plazma, neįvertinama šlytis-trintis), ilgai trunka plazmos paruošimas ir tyrimas, jo rezultatai, esant lipeminei plazmai, klaidingi
Impedanso metodas	Trombocitų agregacija	Paprastas, galima naudoti įvairius induktorius ir jų koncentracijas, išvengiama lipemijos įtakos	Nejautrus, nepakankamai tikslus
Imunofluorescencinis metodas (atliekamas tėkmės citometru)	Trombocitų receptoriai ir iš granulių sekretuojamos medžiagos	Įmanoma nustatyti trombocitų receptorių aktyvumą ir jų defektus, iš granulių išskiriamus junginius	Brangus prietaisas, jo eksploatacija ir reagentai. Sudėtinga atlikimo technologija

tyrimai (21). Todėl straipsnyje daugiau dėmesio skirta jų aprašymui ir vertinimui. Apibendrinti jų privalumai ir trūkumai pateikiami atskirai (2 lentelė).

Apskritai kiekviena gydymo ar mokslo įstaiga iš nemažo skaičiaus aptartų prietaisų ar jų sistemų (1 lentelė) gali pasirinkti tą, kuris atitiktų tyrėjų tikslus

ir poreikius. Keičiantis techninėms galimybėms ir tyrimų reikmėms, kuriami ir diegiami vis nauji trombocitų funkcijos tyrimo būdai. Iš tokių ypač paminėtini genetiniai tyrimo būdai, kurie įgalintų dar tiksliau diagnozuoti kraujo hemostazės sutrikimus ir papildyti jau esamus trombocitų funkcijos tyrimo būdus.

Possibilities of platelet function assays

Aušra Mongirdienė

Institute of Cardiology, Department of Biochemistry, Kaunas University of Medicine, Lithuania

Key words: platelet function; bleeding time; platelet aggregation; PFA-100; flow cytometry.

Summary. *The aim of this article* is to review various methods used and started to introduce into practice for determining platelet function, their possibilities, advantages, and disadvantages. Nowadays, in platelet function investigations, devices and their systems with unequal possibilities, operating in different principles, are used. However, because of a wide variety of platelets defects, none of them gives the accuracy of 100%. In order to avoid mistakes, several assays are used. Analysis of platelets function testing is represented in two ways: according to its investigation object and investigation methods and according to the most frequently used platelet function assays. The most important criteria are presented in two different tables.

Correspondence to A. Mongirdienė, Institute of Cardiology, Kaunas University of Medicine, Sukilėlių 17, 50161 Kaunas, Lithuania. E-mail: ausra.mongirdiene@mail.com

Literatūra

1. Gawaz M. Blood platelets. Stuttgart: Thieme; 2001.
2. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* 2004;114(5-6):447-53.
3. Malinin AI, O'Connor CM, Dzhanashvili AI, Sane DC, Serebruany VI. Platelet activation in patients with congestive heart failure: do we have enough evidence to consider clopidogrel? *Am Heart J* 2003;145:397-403.
4. Chin BSP, Chung NAY, Gibbs CR, Blann AD, Lip AYH. Vascular endothelial growth factor and soluble selectin in acute and chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2002;90:1258-70.
5. Harison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews* (2004). Available from: URL: <http://www.elsevierhealth.com/journals/blre>
6. Rand ML, Lcung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci* 2003;28:307-17.
7. Grybauskas P. Kraujo krešėjimo sistemos struktūra ir krešulio susidarymo biologinė esmė. Ultragarstinė koagulometrija. (Blood coagulation system's structure and biological essence of clot formation. Ultrasonic coagulometry). Kaunas; 1998.
8. Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Tantry U. Platelet activation in myocardial ischemic syndromes. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004;2(4):535-45.
9. Grybauskas P. Kraujo krešėjimo sistemos fiziologijos ir patologijos aktualijos. (Topicality of blood clotting system's physiology and pathology.) Lietuvos trombozės-hemostazės žurnalas 2002;(1):9-14.
10. Guicheney P, Léger D, Barrat J, Trévoux R, De Lignières B, Roques P, et al. Platelet serotonin content and plasma tryptophan in peri- and postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1988;18(3):297-304.
11. Black PH, Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res* 2002;52(1):1-23.
12. JS Bennett. Novel platelet inhibitors. *Annu Rev Med* 2001 (52):161-84.
13. Alan D, Michelson MD. How platelets work: platelet function and dysfunction. *Journal of Thrombolysis* 2003;16(1-2):7-12.
14. Gordge P, Faint PW, Rylance PB, Neild GH. Platelet function and the bleeding time in progressive renal failure. *Thromb Haemost* 1988;60(1):83-7.
15. Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature* 1997;386(6625):616-9.
16. PH Black. Stress and the inflammatory response. *Brain, Behavior and Immunity* 2002;16:622-53.
17. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Hemost Thromb* 1999;6(5):342-48.
18. Jacqueline L, editor. The Gale Encyclopedia of Medicine. 2nd ed. Vol. 1-5. San Diego: Academic Press; 2002.
19. Thomas I, Creighton E. The Encyclopedia of Molecular Biology. Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Inc; 1999.
20. Mongirdienė A, Grybauskas P. Kraujo krešėjimo proceso eigos tyrimai ultragarsiniu impulsiniu koagulografu. (Investigation of process of blood coagulation by ultrasonic impulsive coagulograph.) *Ultragaras* 1999;1(31):40-2.
21. Eriksson AC, Whiss PA. Measurement of adhesion of human platelets in plasma to protein surfaces in microplates. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005;52:356-65.
22. Wheeler GL, Braden GA, Steinhubl SR, Kereiakes DJ, Kottke-

- Marchant K, Michelson AD, et al. The Ultegra rapid platelet-function assay: comparison to standard platelet function assays in patients undergoing percutaneous coronary intervention with abciximab therapy. *Am Heart J* 2002;143(4):602-11.
23. Grybauskas P, Mongirdienė A, Cimbolaitytė J. Krešėjimo ir trombocitų agregacijos intensyvumų ryšiai. (The links between blood clotting and platelet aggregation parameters.) Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas 2004(6):406-10.
 24. Moran N, Kierman A, Dunne E, Edwards RJ, Shields DC, Kenny D. Monitoring modulators of platelet aggregation in a microtiter plate assay. *Analytical Biochemistry* 2006;357(1):77-84.
 25. Kaneko M, Takafuta T, Cuyun-Lira O, Satoh K, Arai M, Yatomiy Y, et al. Evaluation of platelet function under high shear condition in the small-sized collagen bead column. *J Lab Clin Med* 2005;146(2):64-75.
 26. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thromboelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(9):1705-9.
 27. Maurer-Spurej E, Dyker K, Gahl WA, Devine DV. A novel immunocytochemical assay for the detection of serotonin in platelets. *Br J Haematol* 2002;116(3):604-14.
 28. Grybauskas P. Kraujo krešėjimo sistemos funkcionavimo ir laboratorinio tyrimo pagrindai. (Function basics of blood coagulation system. Basics of blood coagulation system's function and laboratory testing.) Kaunas; 1995. p. 17.
 29. Kozlovaitė V, Grybauskas P, Cimbolaitytė J, Mongirdienė A, Puodžiukynas A, Šileikis V, et al. Trombocitų agregacijos pokyčiai gydant širdies aritmijas radiodažnine abliacija. (Alterations of platelet aggregation while treating cardiac arrhythmias with radiofrequency ablation.) *Medicina (Kaunas)* 2004;40(9):850-5.
 30. Veikutienė A, Širvinskas E, Grybauskas P, Cimbolaitytė J, Mongirdienė A, Veikutis V. Aspirino ar heparino, vartojamo iki operacijos, įtaka trombocitų funkcijai bei kraujavimo intensyvumo po aortos vainikinių jungčių operacijų. (Influence of preoperative treatment with aspirin or heparin on platelet function and intensity of postoperative bleeding in early period after coronary artery bypass surgery.) *Medicina (Kaunas)* 2005;41(7):577-83.
 31. Voleišienė B, Mongirdienė A, Voleišis A, Šlitteris R. Reference medium for blood coagulation ultrasonic studies. *Ultragarasas* 2000;1(34):20-2.
 32. Michelson AD, Frelinger AL 3rd, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol* 2006;98:4N-10N.
 33. Hassan AA, Kroll MH. Acquired disorders of platelet function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:403-8.
 34. Shifman FD. Patofiziologija krovii. (Pathophysiology of blood.) Moskva: Binom; 2000.
 35. Zaleskis G. Pagrindinių laboratorinių tyrimų žinynas. (Directory of main laboratory assays.) Vilnius: Vaistų žinios; 2002.
 36. Phillips DR, Teng W, Arfsten A, Nannizzi-Alaimo L, White MM, Longhurst C, et al. Effect of Ca^{2+} on GPIIb/IIIa interaction with integrilin of platelet aggregation by reductions in the concentration of ionized calcium in plasma anticoagulated with citrate. *Circulation* 1997;96:1488-94.
 37. Wong S, Appleberg M, Ward CM, Lewis DR. Aspirin resistance in cardiovascular disease: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27:456-65.
 38. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2001;88:230-35.
 39. Favaloro EJ. Clinical application of the PFA-100. *Curr Opin Hematol* 2002;9:407-15.
 40. Ly HQ, Kirtane AJ, Murphy SA, Burows J, Cannon CP, Braunwald E, et al. Association of platelet count on presentation and clinical outcomes in ST-elevated myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2006;98(1):1-5.
 41. Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, et al. Rapid platelet-function assay. An automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation* 1999;99:620-5.
 42. Steinhubl SR, Talley JD, Braden GA, Tchong JE, Casterella PJ, Moliterno DJ, et al. Point-of-care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event following percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2001;103:2572-8.
 43. Ledford-Kraemer M. Laboratory evaluation of platelets. *The Clotting Times* 2004;4:2-9.
 44. Carlappa R, Withite TR, Parvin CA, Luchtman-Jones L. Comparison of PFA-100 and bleeding time testing in pediatric patients with suspected hemorrhagic problems. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25:474-9.
 45. Wang JC, Aucoin-Barry D, Manuelian D, Monbouquette R, Reisman M, Gray W, et al. Incidence of aspirin nonresponsiveness using the Ultegra rapid platelet function assay – ASA. *Am J Cardiol* 2003;92:1492-4.
 46. Kereiakes DJ, Mueller M, Howard W, Lacock P, Anderson LC, Broderick TM, et al. Efficacy of abciximab induced platelet blockade using rapid point of care assay. *J Thromb Thrombolysis* 1999;7:265-76.
 47. Born GV, Dearnley R, Foulks JG, Sharp DE. Quantification of the morphological reaction of platelets to aggregating agents and of its reversal by aggregation inhibitors. *J Physiol* 1978;280:193-212.
 48. Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Int J Clin Lab Res* 1998;28:201-10.
 49. Chirkov YY, Holmes AS, Chirkova LP, Horowitz JD. Nitrate resistance in platelets from patients with stable angina pectoris. *Circulation* 1999;100(2):129.
 50. Ingerman-Woenski C, Smith JB, Silver MJ. Evaluation of electrical aggregometry: comparison with optical aggregometry, secretion of ATP and accumulation of radiolabeled platelets. *J Lab Clin Med* 1983;101:44-52.
 51. Jeske WP, Walenga JM, Szatkowski E, Ero M, Herbert JM, Haas S, et al. Effect of GPIIb/IIIa antagonists on the HIT serum induced activation of platelets. *Thrombosis Research* 1997;88(3):271-81.
 52. Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Haas NF, Taite BB, Szalony JA, Page JD, et al. Assessment of platelet function assays. *Am Heart J* 1998;135:170-8.
 53. Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carroll RC. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterisation. *Am J Cardiol* 2004;93:456-8.
 54. Shenkman B, Savion N, Dardik R, Tamarin I, Varon D. Testing of platelet deposition on polystyrene surface under flow conditions by cone and platelet analyzer. *Thromb Res* 2001;99:353-61.
 55. Varon D, Lashevski I, Brenner B, Beyar R, Lanir N, Tamarin I, et al. Cone and platelet analyzer: monitoring GPIIb/IIIa antagonists and von Willebrand disease replacement therapy by using platelet deposition under flow conditions. *Am Heart*

- J 1998;135:187-93.
56. Osende JI, Fuster V, Lev EI, Shimbo D, Rauch U, Marmur JD, et al. Testing platelet activation with a shear-dependent platelet function test versus aggregation-based test: relevance for monitoring long-term GPIIb/IIIa inhibition. *Circulation* 2001;103:1488-91.
57. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87:4925-36.
58. Kaplan KL, Owen J. Plasma levels of β -thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation *in vivo*. *Blood* 1981;57:199-202.
59. Matuzevičienė R, Kučinskienė Z. Ūminių leukemijų imuno-fenotipavimas tėkmės citometru. (Immunophenotyping of acute leucemias by flow cytometry.) *Laboratorinė medicina* 2002;2(14):35-42.
60. Lietuviška medicinos enciklopedija. (Lithuanian medicine encyclopedia.) Vilnius: Mokslo ir enciklopedijų leidykla; 1993.
61. Harrison P. Progress in the assessment of platelet function. *Br J Haematol* 2000;111:733-44.
62. Rand ML, Kuhle S. Platelets and platelet function testing in children. *Prog Pediatr Cardiol* 2005;21(1):63-9.

Straipsnis gautas 2006 06 07, priimtas 2007 10 12

Received 7 June 2006, accepted 12 October 2007