**Классические тесты тромбоцитарного гемостаза: подсчет количества тромбоцитов**

Определение количества тромбоцитов - неотъемлемая часть общего анализа крови. Тромбоциты – безъядерные клетки диаметром 1–5 мкм, которые образуются из мегакариоцитов костного мозга и циркулируют в крови в концентрации 200000– 400000 в мкл. Время циркуляции тромбоцитов в кровотоке составляет 10–12 сут. Установлено, что 2/3 тромбоцитов находится в циркуляторном русле, 1/3 депонируется в селезенке и в других экстраваскулярных тканях. В селезенке секвестрируется большой процент молодых больших тромбоцитов, а также накапливается и разрушается основная масса старых (поврежденных) тромбоцитов. Также тромбоциты разрушаются в печени. У здорового человека разрушение тромбоцитов соответствует их продукции, что составляет в сутки 35 000±4300 клетокна 1 мкл крови. Физиологические изменения количества тромбоцитов в течение суток могут составлять до 10%. У женщин во время менструаций количество тромбоцитов может уменьшиться на 20–30%. Одним из «классических» тестов исследования тромбоцитов является подсчет количества тромбоцитов.

**Подсчет количества тромбоцитов**

 1.Определение количества тромбоцитов на гематологическом анализаторе.

 Исследование возможно в  венозной или капиллярной крови, стабилизированной цитратом натрия или ЭДТА. При исследовании образцов венозной крови используют пластиковые вакуумные пробирки или микроконтейнеры с нанесенным на стенки мелкодисперсным порошком солей ЭДТА. При получении цитратной крови следует точно соблюдать ее разведение цитратом 9:1. Пробирки с кровью необходимо тщательно перемешать переворачиванием, но без встряхивания. Температура при транспортировке образцов крови должна быть комнатной, поскольку при охлаждении происходит активация и агрегация тромбоцитов. Подсчет тромбоцитов необходимо выполнить в течение 4 ч после взятия венозной крови.

В охлажденных образцах крови и при гемолизе возможно занижение количества тромбоцитов. У некоторых пациентов может происходить небольшая спонтанная агрегация тромбоцитов или, реже, ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения иммунного характера, причем эти

явления прогрессируют по мере увеличения времени, прошедшегопосле взятия крови. У  таких пациентов точный подсчет клеток может быть осуществлен при взятии крови с цитратом натрия в качестве антикоагулянта.

Для большинства современных гематологических анализаторов коэффициент вариации показателя не превышает 4%.

 2.Определение количества тромбоцитов в 1 мкл крови методом подсчета в окрашенном мазке крови по Фонио.

 Готовятся мазки на предметных стеклах и окрашиваются по Романовскому—Гимзе в течение 2-3часов.Подсчет кровяных пластинок производят под иммерсионной системой микроскопа с использованием сетчатого окуляра или вкладного окошка. В окрашенном мазкесчитают 1000 эритроцитов и все встретившиеся при этом тромбоциты. Таким образом, получают относительное число, выражаемое промилле (промилле). Для вычисления абсолютного количества тромбоцитов эту величину следует умножить на количество эритроцитов в 1 мкл и разделить на 1000.

Подсчет тромбоцитов и оценка их размера и формы в мазке - важная часть диагностики тромбоцитопений, эссенциальной и полицитемической тромбоцитемии, ДВС-синдрома, тромботической тромбоцитопенической пурпуры и других микротромбоваскулитов, нарушений гемостаза при аутоимунных формах патологии (СКВ, антифосфолипидном синдроме и др.) и при гепатолиенальном синдроме. При наследственных тромбоцитопатиях наблюдаются формы с микроцитозом (синдром Вискотта-Олдрича) и преобладанием гигантских форм кровяных пластинок (аномалии Бернара-Сулье и Мей-Хегглина), а также формы без изменения размеров этих клеточных элементов.

 3. Чаще всего используется метод подсчета тромбоцитов в счетной камере Горяева микроскопией при фазовом контрасте, т.е. с фазово-контрастной приставкой.

Производится подсчет тромбоцитов в камере Горяева с применением в качестве разводящей и гемолизирующей жидкости раствора оксалата аммония. При подсчете используют фазово-контрастную микроскопию.

Реактивы: 1% раствор оксалата аммония.

Ход определения. Исследование можно проводить как в крови, полученной из пальца, так и в стабилизированной цитратом венозной крови. В последнем случае полученный при подсчете результат умножают на коэффициент 1,1 (учитывают разведение венозной крови раствором цитрата натрия - 9:1).

Самым удобным и достаточно точным является способ разведения крови в пробирках. Для этого, в пластиковую (полистирол) пробирку пипеткой отмеряют 1,98 мл 1% оксалата аммония и осторожно вносят в нее 0,02 мл крови. В течение 1-2 мин содержимое пробирки тщательно перемешивают без вспенивания. Заполняют две камеры Горяева и на 10-15 мин помещают их для оседания тромбоцитов во влажную камеру (чашку Петри со смоченной фильтровальной бумагой или марлей). В каждой камере подсчитывают тромбоциты в 25 больших квадратах.

Фазово-контрастная микроскопия проводится при помощи обычного микроскопа, осветителя типа ОИ-19 (или аналогичного) и устройства для наблюдения методом фазового контраста КФ-1 или КФ-4.

 На сегодняшний день методом выбора при исследовании тромбоцитов является их определение на автоматическом анализаторе. Автоматические счетчики позволяют получать достаточно надежные результаты при определении количества тромбоцитов. При подсчете тромбоцитов по Фонио коэффициент вариации находится в пределах 20%, в камере Горяева - составляет 7-10%, тогда как автоматический подсчет воспроизводится с точностью до 2-4%.Современные анализаторы сигнализируют о выходе количества тромбоцитов за референтные пределы, наличии агрегатов тромбоцитов, макротромбоцитов или других элементов, сравнимых по объему с тромбоцитами (микроэритроциты), что существенно облегчает трактовку получаемых результатов.

 В то же время следует иметь в виду, что в отличие от ручного подсчета тромбоцитов, где проводится предварительный лизис эритроцитов, автоматические счетчики крови анализируют тромбоциты и эритроциты в одной камере без предварительной обработки. Тромбоциты распознаются по размерам в диапазоне 2-20 фл. Это создает проблему дифференцирования больших форм тромбоцитов (макротромбоцитов) и сравнимых с ними по объему эритроцитов (микроцитов), их фрагментов (шизоцитов), а также отшнуровавшихся фрагментов цитоплазмы лейкоцитов (клеточный дебрис).

 Возможные ошибки при подсчете количества тромбоцитов на гематологическом анализаторе включают:

- ложное завышение: микроцитоз, криоглобулинемия, гемолиз, фрагменты эритроцитов и лейкоцитов;

- ложное занижение: агрегация или агглютинация тромбоцитов, тромбоцитарный сателлизм (прилипание тромбоцитов к лейкоцитам), гигантские тромбоциты, агглютинация эритроцитов, тромбообразование; взятие крови с гепарином; гипертромбоцитоз (более 1000×103/л).

**Клинико-диагностическое значение определения количества**

**тромбоцитов**

У  здорового человека в  периферической крови в  течение суток содержание тромбоцитов колеблется в  референсном диапазоне 150–400 тыс./мкл. Тромбоцитопениями считаются состояния, при которых количество тромбоцитов в  периферической крови составляет менее

150 тыс./мкл, тромбоцитозами  – более 400 тыс./мкл. При сохранении способности к адгезии и агрегации геморрагический синдром развивается лишь при количестве тромбоцитов менее 30 тыс./мкл, а угрожающие жизни спонтанные кровотечения в большинстве клинических случаев возможны при количестве тромбоцитов менее 15 тыс./мкл. Эти значения имеют условный характер, поскольку частота и выраженность геморрагий зависят от фонового заболевания и функциональной способности тромбоцитов.

**Все тромбоцитопении** по патогенетическому признаку можно разделить на четыре большие группы: продуктивная, разведения, распределения и потребления.

К первой группе относят снижение уровня тромбоцитов при апластической анемии, миелодиспластических синдромах, острых лейкозах, лимфомах, цитотоксических (химиотерапия, токсическое воздействие на костный мозг различных химических агентов и токсинов микроорганизмов, алкоголя) и ятрогенных (прием лекарственных препаратов – эстрогенов, тиазидов, нестероидных противовоспалительных средств, антибиотиков и т.д.) воздействиях, лучевой терапии, тяжелом дефиците железа, витамина В12 и фолиевой кислоты.

Тромбоцитопения разведения возникает при массивных кровотечениях, а распределения – при спленомегалии.

Причинами тромбоцитопении потребления являются иммунные тромбоцитопенические и посттрансфузионные пурпуры, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, злокачественные новообразования, эклампсия и HELLP-синдром.

**Тромбоцитоз** с точки зрения патологического процесса подразделяют на первичный и реактивный.
 Реактивный тромбоцитоз возникает вследствие патологического процесса без участия гемопоэтических (кроветворных) стволовых клеток, часто это нормальная реакция на кровотечение. Первичный тромбоцитоз развивается в результате нарушения системы кроветворения и деления стволовых клеток в костном мозге.
**Возможные причины реактивного тромбоцитоза:**

В норме большое количество тромбоцитов может встречаться у новорожденных и у грудных детей. В редких случаях тромбоцитоз сохраняется и во взрослом возрасте.
Патологические механизмы, приводящие к развитию тромбоцитоза, многообразны и требуют дифференциального подхода к диагностике.
 Реактивное повышение количества тромбоцитов наблюдается в следующих случаях:

Инфекционно-воспалительные заболевания - одна из самых частых причин реактивного тромбоцитоза. Количество тромбоцитов в периферической крови увеличивается при пневмонии, сепсисе, остеомиелите, а также после хирургических вмешательств и травм. При системных воспалительных заболеваниях соединительной ткани, например при ревматоидном артрите, повышается уровень цитокинов, которые стимулируют образование тромбоцитов. По мере уменьшения признаков воспаления снижается и количество тромбоцитов.

* Железодефицитная анемия – распространенное заболевание, которое встречается во всех возрастных группах. Если дефицит железа развился на фоне хронической кровопотери, при обследовании выявляется тромбоцитоз.
* Спленэктомия (операция по удалению селезенки) – еще одна причина реактивного тромбоцитоза. Уровень тромбоцитов растет в течение первых 3 недель после оперативного вмешательства.
* Нарушение функции селезенки (аспления), приводящее к тромбоцитозу, может происходить в результате травм, опухолевых процессов в селезенке, при серповидно-клеточной анемии и тромбозах сосудов селезенки.
* Злокачественные новообразования меняют баланс цитокинов (белков, которые вырабатывают клетки иммунной системы при воспалении) с увеличением образования тромбоцитов. Тромбоциты в данном случае участвуют в образовании метастазов, создавая связь между собой и опухолевыми клетками. Наряду с этим механизмом развития тромбоцитоза злокачественные опухоли проходят стадию распада, которая характеризуется кровопотерей и реактивным тромбоцитозом.

**Среди первичных тромбоцитозов** выделяют семейный тромбоцитоз – редкое состояние, которое возникает вследствие мутации гена тромбопоэтина и генов тромбопоэтиновых рецепторов.
 Тромбоцитоз в некоторых случаях ассоциирован с мутациями, характерными для миелопролиферативных заболеваний: истинной полицитемии, идеопатического миелофиброза и эссенциальной полицитемии. В данном случае прослеживается наследственный характер заболевания (у родственников диагностированы миелопролиферативные патологии). В костном мозге активируется деление стволовых клеток вследствие генетического дефекта. Симптомы зависят от основного заболевания и напрямую с ним связаны.