© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.155.294-076.5-073.537.1/.2

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ НА ОСНОВЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ТРОМБОЦИТОВ

В.Б. Хватов, доктор медицинских наук, профессор, **М.С. Макаров**, **А.И. Костин**, кандидат медицинских наук, **Е.Н. Кобзева**, кандидат медицинских наук, **Н.В. Боровкова**, доктор медицинских наук

ГБУЗ Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, Москва, Россия

E-mail: khvatov@yandex.ru

Проведено морфофункциональное исследование тромбоцитов, окрашенных витальными флюорохромными красителями, в крови 100 доноров и 100 гематологических больных с тромбоцитопенией. У гематологических больных с клинически выраженным геморрагическим синдромом (ГС) интенсивность свечения окрашенных тромбоцитов была достоверно ниже, чем у гематологических больных и доноров. При этом у гематологических больных с ГС отмечено резкое падение значений всех морфофункциональных тромбоцитов, тогда как у гематологических больных без ГС оно было менее выраженным. Предложены параметры для прогнозирования развития выраженного геморрагического синдрома: адгезивная активность тромбоцитов, относительное содержание тромбоцитов с гранулами при общей концентрации клеток от 2 до 50 • 10^9/л и морфофункциональный статус тромбоцитов. Использование этих параметров позволяет в 90–97,7% случаев объективизировать возможность развития выраженного кровотечения на фоне тромбоцитопении.

Ключевые слова: *тромбоциты, геморрагический синдром, витальное окрашивание, интенсивность свечения*

PREDICTION OF HEMORRHAGIC SYNDROME IN HEMATOLOGICAL PATIENTS ON THE BASIS OF FLUORESCENCE ANALYSIS OF MORPHO-FUNCTIONAL STATUS OF PLATELETS

V.B. Khvatov, M.S. Makarov, A.I. Kostin, E.N. Kobzeva, N.V. Borovkova

Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine, Moscow

The morphological and functional study of platelets stained with vital fluorochrome dyes has been performed in the blood of 100 donors and 100 hematological patients with thrombocytopenia. In hematologic patients with clinically pronounced hemorrhagic syndrome (PHS), the intensity of stained platelets luminescence was significantly lower than that in patients without PHS and donors. Herewith in PHS hematological patients there was noted a sharp fall in the values of all the morphological and functional parameters of platelets, whereas in hematological patients without HS this fall was less pronounced. There have been proposed indicators for predicting the development of PHS: adhesive activity of platelets, relative level of platelets with the granules at total cell concentration of 2 to 50 • 10^9/l and morpho-functional status of platelets. The use of these parameters permits to prognose significant bleeding development due to thrombocytopenia in 90–97,7% of cases.

Key words: *platelets, hemorrhagic syndrome, vital staining, luminescence intensity*

Геморрагический синдром (ГС) – частая причина смерти гематологических больных с тромбоцитопенией [2, 7]. Адекватность показаний к трансфузии концентратов тромбоцитов таким больным базируется на определении риска развития выраженного кровотечения [3, 6]. Считается, что вероятность развития ГС значительно возрастает при снижении концентрации тромбоцитов в крови больного <20 • 10^9/л [9]. В этой связи прогнозирование ГС проводят на основе суммарной оценки количества тромбоцитов и активности факторов протромбинового комплекса в крови [2, 10], а также балльной оценки полиорганной дисфункции [1, 3]. Однако при таком подходе не учитывают морфофункциональные свойства циркулирующих тромбоцитов больного. Доказано, что нарушение структуры и функций тромбоцитов является одной из основных причин развития ГС у пациентов с тромбоцитопенией [1, 5, 8, 10], что обосновывает необходимость исследования качества тромбоцитов. Нами предложен способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека, основанный на окрашивании клеток витальными флюорохромными красителями с дальнейшим анализом их свечения во флюоресцентном микроскопе [4]. Такой подход позволяет оценить структуру и функции исследуемых тромбоцитов независимо от их концентрации в пробе.

Целью настоящей работы была оценка использования анализа морфофункционального статуса тромбоцитов для прогнозирования ГС у гематологических больных с тромбоцитопенией

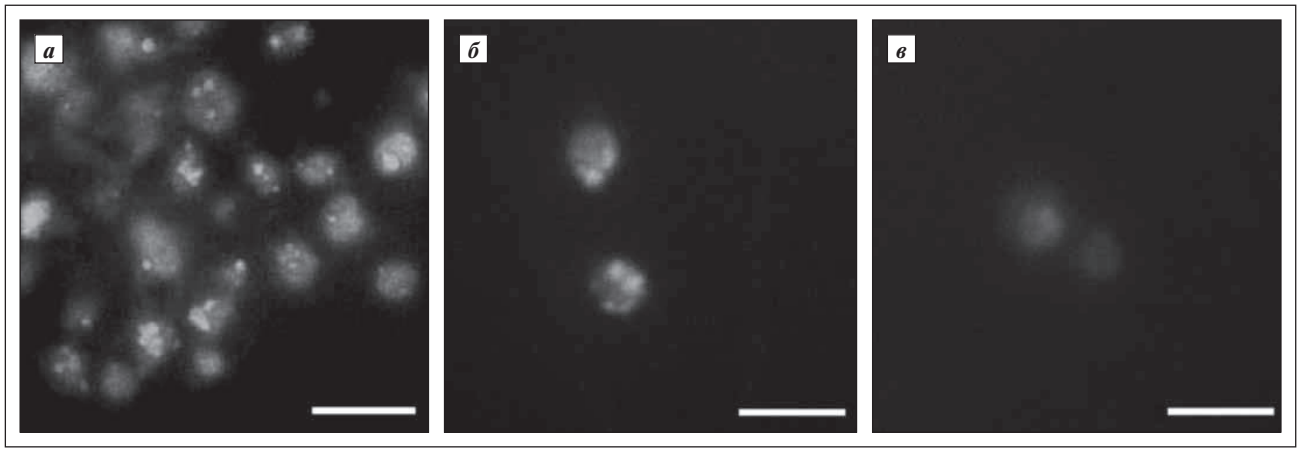
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 100 больных острым миелобласным лейкозом с тромбоцитопенией (2–50 • 10^9/л). Гематологических больных разделили на 2 группы. В одну вошли 45 больных, у которых течение основного заболевания осложнилось развитием геморрагического синдрома (2–3 балла по шкале ВОЗ); в другую – 55 больных без геморрагического синдрома. В качестве контроля исследовали тромбоциты 100 доноров крови.

В крови определяли концентрацию тромбоцитов (Ст) с помощью гематологического анализатора AcTdiff2 («Beckman Coulter», США). Для витального окрашивания тромбоцитов использовали смесь флюорохромных красителей трипафлавина и акридинового оранжевого (АО). Образцы крови окрашивали в микропробирке, затем окрашенные клетки переносили на предметное стекло. С помощью флюоресцентного микроскопа фирмы Nicon (Япония) при ×100 оценивали относительное количество тромбоцитов с гранулами ($D_{т.г}$, %), рассчитывали их концентрацию в пробе ($C_{т.г}$); затем измеряли интенсивность свечения 100–200 витально окрашенных трипафлавином-АО клеток. Определяли среднюю величину интенсивности свечения тромбоцита и на основании этих данных оценивали морфофункциональную активность тромбоцитов (МФАТ, в фут-канделах или баллах), характеризующую их структурную целостность. Затем препарат с витально окрашенными тромбоцитами помещали в термостат при 37°С на 5–10 мин, после чего с помощью флюоресцентного микроскопа подсчитывали относительное содержание в популяции тромбоцитов распластанных клеток с выходящими наружу гранулами и определяли адгезивную активность тромбоцитов на стекле (ААТ, в % или баллах). Затем по сумме морфофункциональной и адгезивной активности (в баллах) оценивали морфофункциональный статус тромбоцитов (МФСТ, в баллах). Показатель МФСТ является интегральной характеристикой биологической полноценности тромбоцитов человека, включая их структурную целостность и функциональную активность. Полученные данные обработаны с помощью методов вариационной статистики с использованием пакета программ «Microsoft Excel 2000». Вычисляли средние арифметические значения (М) и среднеквадратичные отклонения (σ). Различия значений считали достоверными при уровне значимости >99% ($p<0,01$). Взаимосвязь между анализируемыми событиями оценивали по величине коэффициента ранговой корреляции Спирмена (G); значимой признана взаимосвязь для $p<0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлено, что концентрация тромбоцитов в крови доноров варьировала от 180 до 370 • 10^9/л, у гематологических больных без ГС – от 8 до 40 • 10^9/л, у гематологических больных с ГС – от 2 до 50 • 10^9/л. Во всех изученных образцах крови встречались тромбоциты разной формы – дисковидные клетки (дискоциты), округлые, отросчатые, клетки неправильной формы. Витальное окрашивание тромбоцитов трипафлавином-АО позволило наблюдать свечение цитоплазмы исследуемых клеток, а также гранулы в их составе. При этом свечение гранул зарегистрировано только в клетках дисковидной или округлой формы. Подчеркнем, что в крови гематологических больных с ГС преобладающая часть витально окрашенных дискоцитов и больших округлых тромбоцитов не содержала гранул и имела пониженную интенсивность свечения цитоплазмы (см. рисунок).



Тромбоциты крови, витально окрашенные трипафлавином-АО: а – тромбоциты доноров; б – тромбоциты гематологических больных с тромбоцитопенией без геморрагического синдрома; в – тромбоциты гематологических больных с тромбоцитопеническим геморрагическим синдромом II–III степени. Масштабная линия – 10 мкм

ААТ у доноров крови составляла 55,6±10,8 балла, в то время как у гематологических больных с ГС отмечено отсутствие ААТ, что выражалось в неспособности этих клеток к распластыванию на предметном стекле с последующей дегрануляцией и образованием отростков. У гематологических больных без ГС ААТ составила 33,8±10,4 балла, что было в 1,64 раза ниже, чем у доноров.

Значения других морфофункциональных параметров тромбоцитов у гематологических больных с ГС были также значительно ниже, чем у доноров. Так, абсолютное ($C_{т.г}$) и относительное ($D_{т.г}$) содержание тромбоцитов с гранулами было соответственно в 77,8 и 11,5 раза ниже, чем у доноров, а МФАТ и МФСТ – ниже в 2,5 и 5,3 раза (табл. 1). Отметим, что у больных без ГС указанные параметры были понижены в меньшей степени (соответственно в 11,8; 1,6; 1,3; и 1,7 раза). Отметим, что интегральный параметр биологической полноценности тромбоцитов МФСТ у гематологических больных без ГС был в 3,1 раза выше, чем у больных с ГС. В последнем случае практически вся популяция циркулирующих тромбоцитов была представлена клетками с очень низкими значениями интенсивности свечения. Это было вызвано как дефектами цитоплазмы таких клеток, так и отсутствием в них тромбоцитарных гранул. У больных без ГС указанные структурно-функциональные изменения тромбоцитов были выражены гораздо слабее.

Выявлена тесная корреляционная взаимосвязь между наличием ГС с и показателями $D_{т.г}$ (G=0,87), $C_{т.г}$ (G=0,9), ААТ (G=0,9), МФАТ (G=0,91) и МФСТ (G=0,91). В то же время взаимосвязь между наличием ГС и общей концентрацией тромбоцитов в крови ($C_т$) была слабо выраженной (G=0,21). Это указывает на необоснованность использования только показателя концентрации тромбоцитов крови больных в качестве прогнозирующего ГС параметра. Поэтому было проведено ранжирование структурно-функциональных параметров тромбоцитов у гематологических больных для прогнозирования развития выраженного геморрагического синдрома.

Для прогнозирования выбрали следующие основные параметры: (ААТ, $D_{т.г}$, %) при общей концентрации клеток от 2 до 50 • 10^9/л и МФСТ. Результаты исследования отражены в таблице 2. Использование этих параметров позволило в 90–97% случаев объективно оценить возможность развития выраженного кровотечения на фоне тромбоцитопении.

Снижение концентрации тромбоцитов в крови ($C_т$<20 • 10^9/л) в крови больного не всегда приводит к развитию выраженного ГС. Так, из 55 больных без ГС у 16 показатель Ст варьировал от 8 до 19 • 10^9/л. Однако при этом структурно-функциональные параметры циркулирующих клеток у этих больных оставались неизмененными либо были умеренно сниженными (ААТ – 25–60 баллов, $D_{т.г}$ – 30–60%,

Таблица 1

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ТРОМБОЦИТОВ В КРОВИ ДОНОРОВ И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Параметр тромбоцитов	Доноры крови (n=100)	Гематологические больные без ГС (n=55)	Гематологические больные с ГС II–III степени (n=45)
$C_т$, 10^9/л	247,2±21,8	26,8±14,1*	19,5±15,8*
$D_{т.г}$, %	57,5±8,5	35,2±8,1*	5,0±4,8**
$C_{т.г}$,10^9/л	116,8±11,2	9,9±5,4*	1,5±1,2**
МФАТ, баллы	48,6±6,5	38,4±7,6*	19,5±5,2**
ААТ, баллы	55,6±10,8	33,8±10,4*	0**
МФСТ, баллы	102,9±10,8	60,5±10,5*	19,5±5,2**

Примечание. Достоверность различий – p<0,01: * – по сравнению с показателем у доноров, ** – по сравнению с гематологическими больными без ГС.

Таблица 2

ЧАСТОТА РАЗВИТИЯ ГС II–III СТЕПЕНИ У ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С ТРОМБОЦИТОПЕНИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПАРАМЕТРОВ ВИТАЛЬНО ОКРАШЕННЫХ ТРОМБОЦИТОВ

Морфофункциональные параметры тромбоцитов		Частота развития ГС, %
ААТ, баллы	<4	90
*$D_{т.г}$, %	<10	90
МФСТ, баллы	<30	95
∑ параметров		97

Примечание. * Концентрация тромбоцитов в крови варьировала от 2 до 50 • 10^9/л.

МФСТ – 60–90 баллов). С другой стороны, выраженный ГС II–III степени наблюдался у 10 больных с концентрацией тромбоцитов от 35 до $50 \cdot 10^9$/л, при этом морфофункциональные параметры циркулирующих клеток у этих больных имели очень низкие значения ААТ (0 баллов), $D_{т.г}$ (0–5%) и МФСТ (10–30 баллов).

Ранее нами было показано, что при низких значениях ААТ, $D_{т.г}$ и МФСТ проведение трансфузии концентратов тромбоцитов обоснованно даже при отсутствии выраженной тромбоцитопении (Ст>50 тыс./мкл) [4]. Следовательно, развитие геморрагического синдрома в значительной степени связано с нарушением структуры и функций циркулирующих тромбоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный метод прогнозирования развития ГС с помощью морфофункционального флюоресцентного анализа витально окрашенных клеток является адекватным и может быть использован для оценки вероятности развития ГС при тромбоцитопении, а также коррекции проводимой клеточной трансфузионной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Василенко И.А., Кардашова Д.З., Тычинский В.П., Вишенская Т.В., Лифенко Р.А., Валов А.Л., Иванюта И.В., Агаджанян Б.Я. Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии // Вестник последипломного медицинского образования. – 2009; 3–4: 64–8.
2. Дмитриев В.В., Дунаев И.А. Прогнозирование геморрагических осложнений на этапах программного лечения детей со злокачественными новообразованиями и гемобластозами // Онкогематология. – 2012; 1: 15–21.
3. Левит А.Л., Константинова Т.С., Костин А.И. Прогнозирование геморрагического синдрома и оптимизации показаний для профилактических трансфузий концентратов тромбоцитов у больных с амегакариоцитарной тромбоцитопенией // Проблемы гематологии и переливания крови. – 2005; 4: 7–16.
4. Макаров М.С., Боровкова Н.В., Высочин И.В., Кобзева Е.Н., Хватов В.Б. Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека и его применение в клинической практике. Медицинский Алфавит. Современная лаборатория. – 2012; 3: 32–4.
5. Мининкова А. И. Исследование тромбоцитов методом проточной цитофлюорометрии (обзор литературы). II часть // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011; 4: 25–30.
6. Руководство по гематологии // Под ред. Воробьева А.И. В 3 томах. Т. 1. – М.: Ньюдиамед, 2002.
7. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Самочатова Е.В. Сопроводительная терапия и контроль инфекций при гематологических и онкологических заболеваниях. – М.: Медпрактика-М, 2006.
8. Шитикова А. С. Тромбоцитарный гемостаз. – СПб, СПб ГМУ, 2000.
9. Beutler E. Platelet transfusions: the 20,000/microL trigger // Blood. – 1993; 81 (6): 1411–3.
10. Hemker H., Dieri R., Smedt E., Beguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system // Thromb. Hemost. – 2006; 96: 553–61.