

Роль оценки морфофункционального статуса тромбоцитов у больных с тромбоцитопенией в прогнозировании геморрагического синдрома

А.И. Костин¹, М.С. Макаров², В.Б. Хватов², Е.Н. Кобзева²

¹ГБУЗ Городская клиническая больница им. С.П. Боткина; ²ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

Введение. Рациональность показаний к назначению трансфузий концентратов тромбоцитов и профилактика геморрагических осложнений у больных гемобластозами и депрессиями кроветворения базируются на определении у пациента риска развития значительного геморрагического синдрома (ГС), который нельзя прогнозировать, ориентируясь только на количество тромбоцитов. Цель работы – оценка морфофункционального статуса тромбоцитов у пациентов с тромбоцитопенией и изучить связь его изменений с выраженностью геморрагического синдрома.

Материалы и методы. Предложен новый способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов на основе их витального окрашивания флюорохромами. Он позволяет определить содержание тромбоцитов с гранулами (Дтр.гр, %), концентрацию тромбоцитов с гранулами (Стр.гр, $\times 10^9/\text{л}$), адгезивную активность тромбоцитов (ААТ, %) с последующим расчетом морфофункционального статуса тромбоцитов (МФСТ, баллы). Проведен анализ выраженности геморрагического синдрома и изменений в морфофункциональном статусе тромбоцитов у 60 больных гемобластозами и депрессиями кроветворения с тромбоцитопенией ($2\text{--}50 \times 10^9/\text{л}$).

Результаты и обсуждение. Геморрагии редко возникали при количестве тромбоцитов более $9 \times 10^9/\text{л}$, однако по глубине тромбоцитопении нельзя было предположить, какова будет выраженность ГС (от простых петехий до тяжелых кровотечений), так как по количеству тромбоцитов пациенты с разной степенью выраженности геморрагического синдрома не имели отличий ($p > 0,05$). Было отмечено, что клинические признаки выраженного ГС наблюдаются при Дтр.гр $\leq 9\text{--}10\%$, Стр.гр $\leq 3 \times 10^9/\text{л}$, ААТ $\leq 10\%$. Оценка МФСТ показала, что у больных с геморрагическим синдромом значения МФСТ составляют 10–30 баллов, тогда как у больных без геморрагического синдрома – 40–100 баллов ($p < 0,05$). При наличии геморрагического синдрома в некоторых случаях отмечено увеличение содержания больших тромбоцитов (диаметр 5,1–5,5 мкм) округлой или овальной формы, которые не содержат гранул и имеют заметные повреждения цитоплазмы.

Заключение. Предложенный способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов может быть использован для прогнозирования геморрагического синдрома у гематологических больных с тромбоцитопенией.

Метод определения аллельных вариантов полиморфизма фактора V Лейден с использованием биолюминесцентных репортеров

В.В. Красицкая¹, Л.П. Буракова¹, Л.А. Франк¹, И.А. Ольховский², Т.Н. Субботина³

¹Институт биофизики СО РАН; ²Красноярский филиал ФГБУЗ Гематологического научного центра Минздравсоцразвития России;

³Сибирский федеральный университет, Красноярск

Введение. Врожденные тромбофилии значительно повышают риск развития тромбозов глубоких вен, тромбоэмболии легочной артерии, тромботических осложнений беременности. В соответствии с медицинским критериям ВОЗ по приемлемости использования методов контрацепции http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241562668_rus.pdf, тромбогенные мутации являются абсолютным противопоказанием использования контрацептивных гормональных препаратов. Это подтверждает рациональность скрининга на врожденные тромбофилии женщин использующих гормональные контрацептивы или планирующих беременность. При этом актуальной задачей является разработка эффективных методов генотипирования – быстрых, надежных и недорогих.

Материалы и методы. Предложен метод определения однонуклеотидного полиморфизма на основе реакции ферментативного удлинения аллель-специфичного праймера (PEXT) с последующим биолюминесцентным твердофазным микроанализом продуктов. В качестве репортеров использовали Ca^{2+} -регулируемый фотопротейин обелина и целентеразинзависимую люциферазу *Renilla muelleri*. Геномную ДНК амплифицировали полимеразной цепной реакцией (ПЦР), используя праймеры, фланкирующие полиморфный сайт (dbSNP: rs6025). Продукты ПЦР использовали как матрицы для двух PEXT-реакций с праймерами, 3'-концевые нуклеотиды которых комплементарны нормальному либо мутантному аллелям. При полной комплементарности матрицы и аллельспецифичного праймера происходило его удлинение ДНК-полимеразой, а полученный продукт содержал биотин, благодаря наличию в реакционной смеси биотинилированного производного дезоксиуридинтрифосфата (Bio-dUTP). Анализ продуктов

проводили с использованием химических конъюгатов обелина и стрептавидина.

Результаты и обсуждение. Генотип каждого из образцов геномной ДНК определяли по соотношению биолюминесцентного сигнала от удлинения N-праймера (G-аллель) и сигнала от удлинения M-праймера (A-аллель) (дискриминационный фактор –DF). В случае наличия обоих аллелей (G/A генотип) DF равен ~1. При наличии только одного вида аллелей (G/G или A/A генотип) DF отличаются более чем на порядок. Среди проанализированных нами образцов 4 оказались нормальными по обоим аллелям (G/G), а 9 – обладали гетерозиготной мутацией (G/A). Полученные результаты совпали с данными ПЦР-анализа в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов ООО "НПФ Литех" для тех же образцов ДНК. Коэффициент вариации DF, составил 14,1 % для гетерозиготного варианта G/A и 19,8 % для нормального генотипа G/G.

Для минимизации стадий и повышения производительности генотипирования разработан метод одновременного выявления аллелей в одной лунке с использованием двух биолюминесцентных репортеров: фотопротейина обелина и целентеразин-зависимой люциферазы *Renilla muelleri*. Биолюминесцентный сигнал обелина свидетельствует о наличии нормального аллеля, а биолюминесцентный сигнал люциферазы – о наличии мутантного аллеля. Соотношение сигналов обелина и люциферазы определяет генотип образца.

Заключение. Использование двух биолюминесцентных репортеров позволяет проводить анализ SNP выявлением обоих аллелей в одной лунке, и таким образом удвоить количество образцов, анализируемых на одном планшете, а применение СВР вместо свободного целентеразина для запуска биолюминесценции люциферазы существенно упрощает процедуру анализа.