

- Orfao A.* Comparative analysis of different flow cytometry- based immunophenotypic methods for the analysis of CD59 and CD55 expression on major peripheral blood cell subsets. *Cytometry*. 2002; 50: 191–201.
7. *Brodsky R.A., Mukhina G.L., Li S., Nelson K.L., Chiurazzi P.L., Buckley J.T., Borowitz M.J.* Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; Sep; 114(3): 459–66.
8. *Sutherland D.R., Keeney M., Illingworth A.* Practical Guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) clones by flow cytometry. *Cytometry Part B*. 2012; 82B: 195–208.
9. *Yeongsic Kim, Jihyang Lim, Myungshin Kim, Yonggoo Kim, Jong-Wook Lee, Kyungja Han.* Quantitation of CD55 and CD59 Expression on Reticulocytes and Mature Erythrocytes in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, Aplastic Anemia, and Healthy Control-Subjects. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2010; 40(3).

Поступила 05.03.13

КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.155.25-091-073.537

В.Б. Хватов, М.С. Макаров, Н.В. Боровкова

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ВИТАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, 129010, Москва

Предложена морфологическая оценка адгезивной активности тромбоцитов (ААТ) человека, основанная на витальном окрашивании клеток и регистрации процесса адгезии с помощью флуоресцентного микроскопа. Установлена регрессионная зависимость ($R^2 = 0,916$) между ААТ и морфофункциональной и агрегационной активностью тромбоцитов. Исследована кровь 100 доноров крови, 100 гематологических больных, 110 пациентов травматологического и хирургического профиля, 50 пациентов с острыми экзогенными отравлениями, 20 пациентов с хроническими трофическими язвами. Выявлено резкое снижение ААТ и количества адгезивно активных тромбоцитов (КААТ) в циркулирующей крови у больных с кровотечениями различной этиологии, у гематологических больных и заметное повышение ААТ и КААТ у больных с тромбозами. Морфологическая оценка качества тромбоцитов эффективна для определения биологической полноценности всей популяции циркулирующих клеток.

Ключевые слова: тромбоциты, витальное окрашивание, гранулы, адгезия

V.B. Khvatov, M.S. Makarov, N.V. Borovkova

THE MORPHOLOGIC EVALUATION OF ADHESIVE ACTIVITY OF HUMAN THROMBOCYTES USING VITAL DYE

The N.V. Sklifosofskiy research institute of emergency medical care, 129010 Moscow, Russia

The morphologic evaluation of adhesive activity of human thrombocytes using both vital dye of cells and registration of adhesion process with fluorescent microscope is proposed. The regression dependence between adhesive activity of human thrombocytes and morpho-functional and aggregative activity of thrombocytes is established. The blood samples of 100 blood donors, 100 patients with hematologic pathology, 110 patients of traumatology, 50 patients with acute exogenous intoxications and 20 patients with chronic trophic ulcers were analyzed. The drastic decrease of adhesive activity of human thrombocytes and number of adhesively active thrombocytes was established in circulating blood of patients with bleedings of various etiology and hematologic patients. The significant increase of adhesive activity of human thrombocytes and number of adhesively active thrombocytes in patients with thrombosis is established. The morphologic evaluation of quality of thrombocytes is effective in case of analysis of biologic value of all population of circulating cells.

Key words: thrombocytes, vital dye, granule, adhesion

Оценка биологической полноценности тромбоцитов человека имеет важное значение в клинико-лабораторной практике [4], гематологии, трансфузиологии, реаниматологии [2, 3, 5]. Существует множество методов анализа свойств тромбоцитов [3–5, 14], однако до сих пор не выработано четких критериев биологической полноценности этих клеток. Уста-

новлено, что адгезивная активность является неотъемлемым свойством функционально полноценных тромбоцитов, играющих определенную роль в клеточном звене гемостаза человека [1, 2, 5]. Исследование адгезивной активности тромбоцитов (ААТ) проводят путем простого пропускания крови или плазмы через колонку, заполненную стеклянными бусинами диаметром 1–2 мм, с дальнейшим подсчетом числа оставшихся клеток в пробе [12]. При этом полученные данные существенно варьируют в зависимости от концентрации тромбоцитов в анализируемом образце. Такой метод исследования не отражает динамических изменений морфологии исследуемых тромбоцитов, что снижает достоверность анализа. Более эффективной является оценка содержания адгезивировавших тромбоцитов с помощью методов

Для корреспонденции:

Хватов Валерий Борисович, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. трансфузиологии, консервирования тканей и искусственного питания
Адрес: 123056, Москва, ул. Васильевская, 9/36
Телефон: 8-495-903-260-39-69
E-mail: khvatov@yandex.ru

спектроскопии [8, 14], основанных на окрашивании тромбоцитов флуоресцентными красителями [8, 11], или определения содержания в них определенных ферментов, например, лактатдегидрогеназы [13]. Однако эти методы основаны на исследовании фиксированных тромбоцитов или клеточного материала, выделенного из разрушенных тромбоцитов, что не позволяет достоверно оценить исходную структурную и функциональную полноценность исследуемых клеток.

Тромбоциты человека обладают способностью к адгезии на поверхности коллагена, фибрина, полистерина, полипропилена [9, 10, 13], на стекле [7, 11]. Морфологические изменения тромбоцитов, адгезирующих на стекле, можно наблюдать в световом микроскопе с использованием фазового контраста [3].

Витальное окрашивание лежит в основе разработанного нами метода динамической оценки ААТ путем исследования их морфологии с помощью флуоресцентного микроскопа [6]. Такой подход позволяет охарактеризовать всю популяцию исследуемых тромбоцитов с учетом их структурной целостности и адгезивной активности.

Цель настоящей работы – провести морфологическую оценку ААТ человека с помощью предложенного витального окрашивания клеток у доноров крови, мультиорганных доноров и пациентов с разными патологическими состояниями.

Материалы и методы. Оценку ААТ проводили следующим образом: пробу с клетками окрашивали витальными флуорохромными красителями на основе триафлавина и акридинового оранжевого («Пан-Эко», Россия), затем окрашенные тромбоциты переносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и помещали на 10–15 мин в термостат при 37°C, после чего с помощью флуоресцентного микроскопа определяли количество адгезировавших тромбоцитов в расчете на 100–150 анализируемых клеток. Активность выражали в количестве (в %) адгезировавших тромбоцитов от общего числа исследованных клеток или в баллах – 1% ААТ соответствует 1 баллу [6].

Анализировали ААТ и морфофункциональную активность тромбоцитов (МФАТ) консервированной крови (СРД 1:7) 100 доноров крови, 15 мультиорганных доноров, 50 пациентов с острыми экзогенными отравлениями, 40 пациентов с изолированными переломами костей нижних конечностей, 20 пациентов с хроническими трофическими язвами венозной и смешанной этиологии, 10 реципиентов почки на 21-е сутки после трансплантации, 20 пациентов с абдоминальной травмой на высоте массивной кровопотери и тех же пациентов непосредственно после проведения им целенаправленной трансфузионной терапии; 10 больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и 20 – с пороками клапанов сердца через 2 ч после оперативного вмешательства; 100 гематологических больных острым миелоидным лейкозом, из них 60 больных без геморрагического синдрома (ГС) и 40 – с тромбоцитопеническим ГС II–III степени; 10 больных с тромбозами вен печени. В крови определяли следующие параметры: C_{tr} – концентрацию тромбоцитов (в тыс/мкл); МФАТ (в баллах), отражающую структурную целостность клеток и определяемую по интенсивности их свечения; ААТ на стекле (в баллах); КААТ – концентрацию адгезивно активных тромбоцитов (тыс/мкл), которая рассчитывается по формуле: $КААТ = Стр \cdot ААТ/100$. Для сравнения исследовали агрегационную активность тромбоцитов в консервированной крови с помощью импедансного агрегометра CHRONO-

LOG 590-9D (CHRONO-LOG, США). В качестве индуктора агрегации использовали коллаген (CHRONO-LOG, США) в концентрации 2 мг на 1 мл исследуемой крови. Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel 2000. Вычисляли средние арифметические значения (М), среднеквадратичные отклонения (σ), уравнения регрессионной зависимости. Различия значений считали достоверными при уровне значимости более 99% ($p < 0,01$).

Результаты и обсуждение. С помощью предложенного метода витального окрашивания тромбоциты человека отчетливо визуализируются во флуоресцентном микроскопе. В ходе адгезии тромбоциты претерпевали следующие изменения: из дисковидных они становились уплощенными, что сопровождалось увеличением их диаметра в 1,5–2 раза и образованием крупных выпячиваний мембраны (ламеллоподий), а затем формировали многочисленные отростки (рис. 1). При этом ААТ на стекле проявляли лишь клетки, содержавшие гранулы. Одновременно с изменением формы у адгезирующих тромбоцитов наблюдалось постепенное смещение тромбоцитарных гранул к клеточным границам с последующим выходом гранул за пределы тромбоцитов (см. рис. 1). Установлена регрессионная зависимость ($R^2 = 0,924$, $y = 0,0059x^3 + 0,1363x^2 + 1,0936x - 2,518$) между ААТ и МФАТ, что указывает на адекватность оценки биологической полноценности тромбоцитов с помощью предложенного метода. Выявлена регрессионная зависимость между ААТ и КААТ в крови ($R^2 = 0,915$, $y = -4E-09x^5 + 2e-06x^4 - 0,0006x^3 + 0,0842x^2 - 4,8091x + 127,53$), что позволяет использовать этот параметр для интегральной оценки функциональной

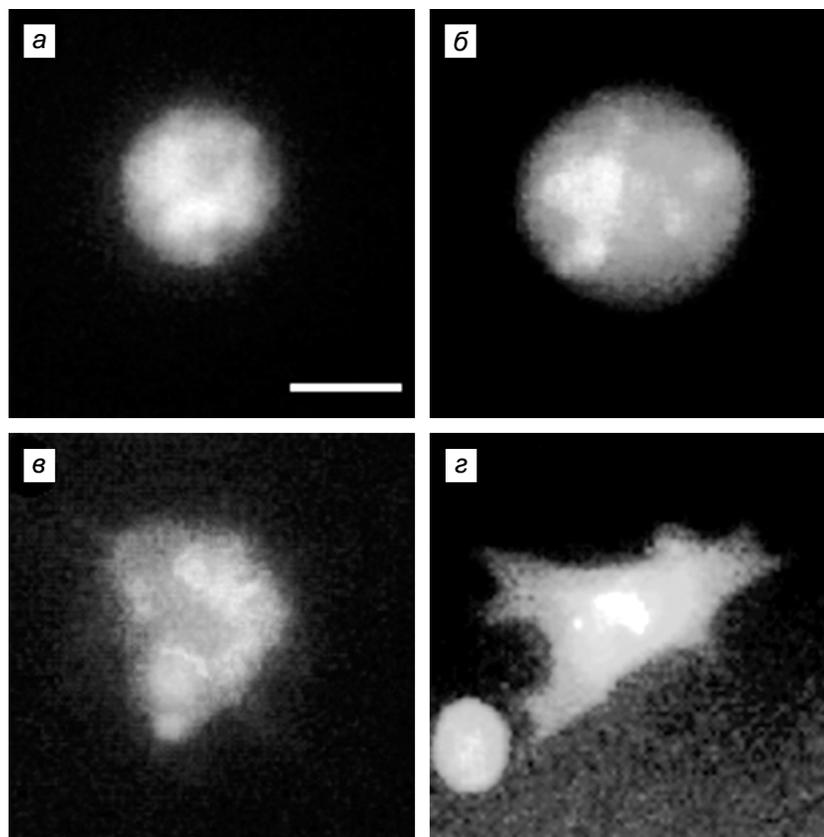


Рис. 1. Морфологические изменения витально окрашенных тромбоцитов с гранулами в ходе адгезии на стекле.

a – исходный тромбоцит; *b* – распластывание тромбоцита на стекле; *v* – выход гранул за пределы тромбоцита; *z* – образование тромбоцитом отростков.

Окраска триафлавином-акридиновым оранжевым. Масштабная линия – 2 мкм.

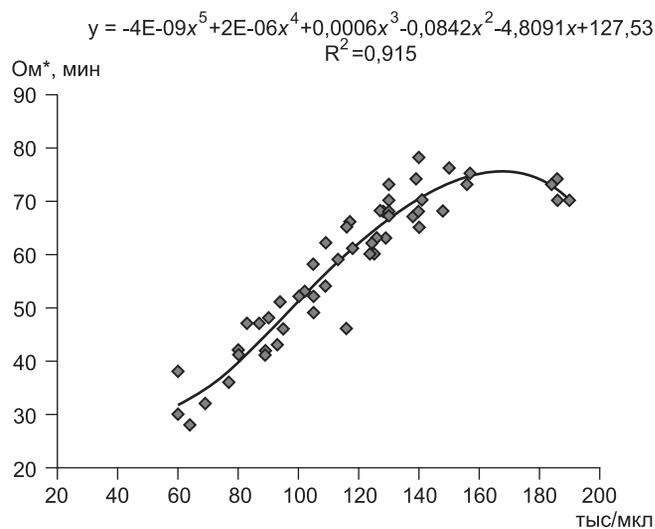


Рис. 2. Взаимосвязь между концентрацией адгезивно активных тромбоцитов (ось абсцисс) и агрегационной активностью тромбоцитов (ось ординат).

активности всей популяции циркулирующих тромбоцитов (рис. 2).

У доноров крови ААТ варьировала от 37 до 75 баллов (в среднем $56,5 \pm 8,7$ баллов), КААТ – от 60 до 190 тыс/мкл (в среднем $110,5 \pm 24,6$ тыс/мкл). В трансплантологии для компенсации глобулярного объема крови реципиентов и иммуномодулирующего воздействия (Патент РФ на изобретение № 2452519 от 10.06.2012) предложено использовать эритроциты и стволовые клетки, полученные из крови доноров органов при мультиорганном заборе. Однако ААТ крови мультиорганных доноров существенно снижена, составляя в среднем $15,5 \pm 10,2$ баллов, а КААТ – лишь $10,6 \pm 4,5$ тыс/мкл. Таким образом, применение тромбоцитов крови мультиорганных доноров для компенсации клеточного звена системы гемостаза реципиента нецелесообразно.

У пациентов с изолированными переломами костей нижних конечностей, с хроническими трофическими язвами венозной и смешанной этиологии, реципиентов почки на 21-й день после трансплантации и больных с пороками клапанов сердца среднее значение ААТ было сходным с аналогичным параметром у доноров крови (см. таблицу).

Значения ААТ по сравнению с таковыми у доноров крови были достоверно снижены ($p < 0,01$) у пациентов с острыми экзогенными отравлениями ($22,4 \pm 8,2$ балла), с абдоминальной травмой на высоте массивной кровопотери ($26,9 \pm 10,2$ балла) и у гематологических больных с острым миелоидным лейкозом без ГС ($33,8 \pm 15,6$ баллов). Следует отметить, что у пациентов с абдоминальной травмой после проведения трансфузионной терапии ААТ увеличивалась (см. таблицу). Наиболее выраженное подавление ААТ отмечено у больных ИБС после оперативного вмешательства (в 10,6 раза) и у гематологических больных с острым миелоидным лейкозом с ГС II–III степени (в 37,7 раза). Подчеркнем, что у 12 из 40 обследованных гематологических больных с ГС II–III степени ААТ на стекле полностью отсутствовала. Таким образом, резкое снижение ААТ позволяет предположить, что переливание концентрата тромбоцитов человека целесообразно. С другой стороны, у больных с тромбозами вен печени выявлено повышение ААТ, которая составила в среднем $87,5 \pm 2,5$ балла ($p < 0,01$).

Сходные с контролем (доноры крови) значения интегрального параметра КААТ в циркулирующей крови отмечены у пациентов с изолированными переломами костей нижних конечностей, с хроническими трофическими язвами венозной и смешанной этиологии, реципиентов почки на 21-е сутки после трансплантации и больных с пороками клапанов сердца (см. таблицу). Снижение КААТ наблюдалось у пациентов с острыми экзогенными отравлениями (в 2,7 раза), с абдоминальной травмой на высоте массивной кровопотери (в 6,5 раза, $p = 0,009$), у больных ИБС после оперативного вмешательства (в 8,9 раза), у гематологических больных острым миелоидным лейкозом без ГС (в 11,6 раза) и у гематологических больных острым миелоидным лейкозом с ГС II–III степени (в 138 раз). Напротив, у больных с тромбозами вен печени значения КААТ были выше, чем у доноров, в 4,5 раза.

Морфофункциональные параметры витально окрашенных тромбоцитов человека ($\bar{X} \pm \sigma$)

Группа обследуемых	Адгезивная активность, баллы	Морфофункциональная активность, баллы	КААТ, тыс/мкл
Доноры крови ($n = 100$)	$56,5 \pm 8,7$	$46,8 \pm 8,1$	$110,5 \pm 24,6$
Мультиорганные доноры ($n = 15$)	$15,5 \pm 10,2^*$	$31,1 \pm 4,3^*$	$10,6 \pm 4,5^*$
Пациенты с изолированными переломами костей конечностей ($n = 40$)	$57,3 \pm 11,2$	$47,3 \pm 9,2$	$112,5 \pm 21,5$
Пациенты с хроническими трофическими язвами венозной и смешанной этиологии ($n = 20$)	$54,1 \pm 9,2$	$46,0 \pm 8,5$	$106,4 \pm 34,1$
Реципиенты почки на 21-е сутки после трансплантации ($n = 10$)	$50,8 \pm 8,7$	$45,3 \pm 8,2$	$100,6 \pm 18,1$
Гематологические больные острым миелоидным лейкозом без ГС ($n = 60$)	$33,8 \pm 15,6^*$	$38,6 \pm 8,1^*$	$9,5 \pm 3,6^*$
Гематологические больные острым миелоидным лейкозом с тромбоцитопеническим ГС II–III степени ($n = 40$)	$1,5 \pm 0,9^*$	$20,1 \pm 2,9^*$	$0,8 \pm 0,13^*$
Пациенты с острыми экзогенными отравлениями ($n = 50$)	$22,4 \pm 8,2^*$	$30,4 \pm 6,8^*$	$40,4 \pm 12,3^*$
Пациенты с абдоминальной травмой на высоте массивной кровопотери ($n = 20$)	$26,9 \pm 10,2^*$	$29,4 \pm 4,5^*$	$16,9 \pm 4,5^*$
Пациенты с абдоминальной травмой непосредственно после проведения трансфузионной терапии ($n = 20$)	$36,4 \pm 12,8^*$	$36,0 \pm 6,3^*$	$41,2 \pm 10,5^*$
Больные ИБС через 2 ч после оперативного вмешательства ($n = 10$)	$5,3 \pm 1,6^*$	$26,1 \pm 2,3^*$	$12,3 \pm 2,6^*$
Больные с пороками клапанов сердца через 2 ч после оперативного вмешательства ($n = 20$)	$51,8 \pm 5,3$	$44,8 \pm 12,1$	$99,7 \pm 20,8$
Больные с тромбозами вен печени ($n = 10$)	$87,5 \pm 2,5^*$	$60,2 \pm 4,5^*$	$503,5 \pm 25,4^*$

Примечание. * – достоверно относительно доноров крови при $p < 0,01$.

Проведенный анализ показал, что исследование адгезивной активности витально окрашенных тромбоцитов позволяет оценить как структурную целостность, так и функциональную активность этих клеток. Можно заключить, что адгезивная активность витально окрашенных тромбоцитов на стекле отражает их биологическую полноценность. Кроме того, анализ КААТ позволяет провести интегральную оценку функциональной активности всей популяции тромбоцитов. Поэтому предложенные параметры ААТ и КААТ могут быть рекомендованы для оценки клеточного звена гемостаза у больных, особенно при тромбоцитопении и тромбоцитозах, при гепарино- и тромболитической терапии, для характеристики функциональной активности тромбоконцентратов, используемых в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быков В.Л. Частная гистология человека. СПб.: Сотис; 1999.
2. Заболотских И.Б., Синьков С.В., Шапошников С.А. Диагностика и коррекция расстройств системы гемостаза: руководство для врачей. М.; Практическая медицина; 2008.
3. Колосова Е.И., Василенко И.А., Ковалева Л.Г. Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой методом витальной компьютерной морфометрии. Бюллетень СО РАМН. 2011; 31(2): 58–63.
4. Льюис С.М., Бэйн Б., Бэйтс И. Практическая и лабораторная гематология. Пер. с англ. под ред. А.Г. Румянцев. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
5. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтера, 2011.
6. 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.
7. Egidi M.G., D'Alessandro A., Mandarello G., Zolla L. Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics. Blood Transfus. 2010; 8(Suppl. 3): S73–81.
8. Goodman S.L., Tweden K.S., Albrecht R.M. Platelet interaction with pyrolytic carbon heart-valve leaflets. J. Biomed. Mater. Res. 1996; 32(2): 249–58.
9. Kikuchi L., Park J.Y., Victor C., Davies J.E. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. Biomaterials. 2005; 26(26): 5285–95.
10. Park J.Y., Gemmell C.H., Davies J.E. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. Biomaterials. 2001; 22(19): 2671–82.
11. Suggs L.J., West J.L., Mikos A.G. Platelet adhesion on a bioresorbable poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol) copolymer. Biomaterials. 1999; 20(7): 683–90.
12. Tamada Y., Kulik E.A., Ikada Y. Simple method for platelet counting. Biomaterials. 1995; 16(3): 259–61.
13. Tsai W.B., Grunkemeier J.M., Horbett T.A. Variations in the ability of adsorbed fibrinogen to mediate platelet adhesion to polystyrene-based materials: a multivariate statistical analysis of antibody binding to the platelet binding sites of fibrinogen. J. Biomed. Mater. Res. A. 2003; 67(4): 1255–68.
14. Yardumian D.A., Mackie I.J., Machin S.J. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. Journal of Clinical Pathology. 1986; 39: 701–12.

REFERENCES

1. Bykov V.L. Private histology of the person. St/Pb; 1999 (in Russian).
2. Zabolotsky I.B., Sinkov S.V., Shaposhnikov S.A. Diagnostics and correction of frustration of hemostasis system: the management for doctors. Moscow; 2008 (in Russian).
3. Kolosova E.I., Vasilenko I.A., Kivalyova L.G. Assessment of a morphofunctional condition of platelets from idiopathic thrombocytopenic purpura patients using method of a vital computer morphometry. The Bulletin of Russian Academy of Medical Science. 2011; 31(2): 58–63 (in Russian).
4. Lewis S.M., Beyn B., Bates I. Practical and laboratory hematology. Ed. of A.G. Romyantsev. Moscow; 2009 (in Russian).
5. Mazurov A.V. Physiology and pathology of platelets. Moscow; 2011 (in Russian).
6. Makarov M.S., Borovkova N.V., Vysochin I.V., Kobzeva E.N., Khvatov V.B. Assessment of the human platelets morphofunctional status and his application in clinical practice. Medical Alphabet. Modern laboratory. 2012; 3: 32–4 (in Russian).
7. Egidi M.G., D'Alessandro A., Mandarello G., Zolla L. Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics. Blood Transfus. 2010; 8(Suppl. 3): S73–81.
8. Goodman S.L., Tweden K.S., Albrecht R.M. Platelet interaction with pyrolytic carbon heart-valve leaflets. J. Biomed. Mater. Res. 1996; 32(2): 249–58.
9. Kikuchi L., Park J.Y., Victor C., Davies J.E. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. Biomaterials. 2005; 26(26): 5285–95.
10. Park J.Y., Gemmell C.H., Davies J.E. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. Biomaterials. 2001; 22(19): 2671–82.
11. Suggs L.J., West J.L., Mikos A.G. Platelet adhesion on a bioresorbable poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol) copolymer. Biomaterials. 1999; 20(7): 683–90.
12. Tamada Y., Kulik E.A., Ikada Y. Simple method for platelet counting. Biomaterials. 1995; 16(3): 259–61.
13. Tsai W.B., Grunkemeier J.M., Horbett T.A. Variations in the ability of adsorbed fibrinogen to mediate platelet adhesion to polystyrene-based materials: a multivariate statistical analysis of antibody binding to the platelet binding sites of fibrinogen. J. Biomed. Mater. Res. A. 2003; 67(4): 1255–68.
14. Yardumian D.A., Mackie I.J., Machin S.J. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. Journal of Clinical Pathology. 1986; 39: 701–12.

Поступила 28.02.13