

ОЦЕНКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРОЙ МЕТОДОМ ВИТАЛЬНОЙ КОМПЬЮТЕРНОЙ МОРФОМЕТРИИ

Екатерина Николаевна КОЛОСОВА, Ирина Анатольевна ВАСИЛЕНКО, Лидия Григорьевна КОВАЛЕВА

Гематологический научный центр Росздрава
125167, г. Москва, Новый Зыковский пр., 4а

У обследованных пациентов с диагнозом идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) выявлено изменение морфологического состава популяции тромбоцитов в виде снижения количества дискоцитов (клеток покоя). Обнаружено, что при снижении фазовой высоты тромбоцитов прогрессирует увеличение средних значений их диаметра, периметра, площади. Использование глюкокортикостероидной терапии, спленэктомии и плазмафереза не вызвало значительных положительных сдвигов в морфофункциональном статусе тромбоцитов. Наилучший результат лечения был получен на фоне использования иммуноглобулина. Установлено, что тяжесть состояния пациентов сопряжена с изменением размерных параметров тромбоцитов: увеличением диаметра, периметра, площади и уменьшением фазовой высоты клеток.

Ключевые слова: идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, витальная компьютерная морфометрия, преднизолон, спленэктомия, иммуноглобулин, плазмаферез.

Введение

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) представляет собой заболевание аутоиммунной природы, вызываемое антитромбоцитарными антителами, воздействующими на мембранные гликопротеиновые комплексы тромбоцитов, что приводит к их разрушению клетками ретикулоэндотелиальной системы [1].

Диагностика ИТП основывается на установленных лабораторных критериях, отражающих повышенную продукцию и усиленный распад тромбоцитов. Они включают изолированную тромбоцитопению периферической крови, неизмененный костный мозг с нормальным или увеличенным количеством мегакариоцитов, наличие свободных или связанных антитромбоцитарных антител [2–4].

Дефицит тромбоцитов приводит к нарушению трофики эндотелиальной выстилки сосудов, что влечет за собой нарушение и сосудистого звена системы свертывания крови. Изолированное снижение количества тромбоцитов в периферической крови при ИТП происходит вследствие их повышенного разрушения, обусловленного выработкой аутоантител к антигенам цитоплазматической мембраны тромбоцитов [5–7]. Причиной кровоточивости почти в 80 % случаев являются патологические изменения тромбоцитов (их функциональная несостоятельность и количественный дефицит). Поэтому у больных данной категории очень важно, наряду с подсчетом количества тромбоцитов,

определять и качественный состав циркулирующей тромбоцитарной популяции [8].

Для определения количества и функциональной активности тромбоцитов разработаны различные приборы и тесты, тогда как исследование их структурной архитектоники до последнего времени осуществлялось в основном методами, которые относили к разряду наиболее трудоемких и непопулярных в клинико-диагностических лабораториях [9–12]. С появлением современных компьютерных технологий принципиальным образом расширились возможности изучения функций тромбоцитов.

Материал и методы

Настоящая работа была посвящена исследованию особенностей витального морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови при ИТП с использованием метода компьютерной фазометрии (КФМ) [13].

Морфофункциональное состояние циркулирующих тромбоцитов *in situ* оценивали экспресс-методом витальной компьютерной морфометрии на основе отечественного компьютерного фазово-интерференционного микроскопа «Цитоскан» (МИРЭА, Москва) [14–16].

При исследовании использовали венозную кровь, заготавливаемую в пробирку из ареактивного пластика («Sarstedt Monovette», Германия) с антикоагулянтом (ЭДТА, цитрат натрия). Для приготовления плазмы, обогащенной тромбоцитами, кровь центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5–7 минут.

Колосова Е.Н. — аспирант отделения стандартизации методов терапии заболеваний системы крови, e-mail: katja.27@mail.ru

Василенко И.А. — гл.н.с., д.м.н., проф., e-mail: katja.27@mail.ru

Ковалева Л.Г. — д.м.н., проф., руководитель отделения стандартизации методов терапии заболеваний системы крови, e-mail: katja.27@mail.ru

Тромбоциты являются примером единства структуры и функции. Активация тромбоцитов наступает после совокупности многоступенчатых реакций, приводящих к изменению их формы, размеров и внутренней структуры. В процессе исследования морфофункционального состояния циркулирующих тромбоцитов методом витальной компьютерной фазовой морфометрии идентифицируют 4 основных морфологических типа живых тромбоцитов, характеризующих ту или иную степень их активации. Основой для дискриминации структурно измененных клеток служили различные варианты их формы, характера рельефа поверхности, наличие псевдоподий, их количество и величина.

Важно учитывать, что параметры фазового изображения содержат информацию не только о пространственно-объемных характеристиках живой клетки, но и о ее оптических свойствах, в частности внутриклеточной анизотропии. Величина показателя преломления, измеряемая в каждой точке цитообъекта, непосредственно зависит от концентрации, химического состава, агрегатного состояния внутриклеточного вещества, наличия или отсутствия органелл и включений. Изменение любого из указанных условий находит отражение в характерных локальных трансформациях фазового изображения клетки [13].

В условиях физиологической нормы подавляющее большинство тромбоцитов представлено плоскими, округлыми клетками с гладкой или складчатой поверхностью — гладкими и рифлеными дискоцитами, соответствующими I типу.

Ко II морфологическому типу тромбоцитов были отнесены клетки округлой или неправильной формы с гладкой или складчатой поверхностью и 1–3 короткими (меньше диаметра клетки) отростками-псевдоподиями, являющимися выростами поверхностной мембраны, — эхиноциты I класса.

Клетки, имеющие около 2–5 длинных (больше диаметра клетки) отростков-«антенн», представляли III тип и отличались большим многообразием форм: от плоских дисков до клеток неправильной причудливой формы — эхиноциты 2 класса.

Тромбоциты неправильной формы с неровной бугристой поверхностью, большим количеством отростков различной длины и многочисленными вакуолями были отнесены к IV морфологическому типу — дегенеративно-измененным клеткам.

Следует отметить, что гладкие и рифленые дискоциты являются так называемыми формами «покоя». Тромбоциты II–III типов, отличающиеся появлением отростков различного числа и длины, а также изменением их формы, связанной с перестройкой цитоскелета и структуры грануломера, проявляют внешние признаки функциональной активности. Клетки IV типа — тромбоциты, исчерпавшие свой функциональный потенциал.

Установлено, что у практически здоровых лиц молодого возраста 63 % тромбоцитов представлены

клетками «покоя», 21 % — тромбоцитами с низким уровнем активации (II тип). Количество клеток с длинными отростками-«антеннами» (высоко активированные тромбоциты) составляет 12 % (III тип), а дегенеративно-измененных (IV тип) — всего 4 %.

Для объективной количественной оценки динамики морфофункционального состояния тромбоцитов в группах больных, получавших различные виды лечения, были проанализированы средние в циркулирующей популяции морфометрические параметры клеток: диаметр, периметр, высота, площадь и объем.

Контрольную группу составили 30 соматически здоровых лиц, у которых определялись средние размерные показатели тромбоцитов периферической крови.

В группу обследования вошли 76 пациентов отделения стандартизации методов химиотерапии Гематологического научного центра с диагнозом ИТП на фоне различных терапевтических программ для устранения основного проявления заболевания (геморрагического синдрома), получавших терапию гормональными препаратами (преднизолон), плазмаферез, спленэктомию, иммуноглобулин [17, 18]. Возраст пациентов составил 18–71 год, соотношение мужчин и женщин — 1:10. Из исследования были исключены пациенты с тромбоцитопениями, обусловленными ВИЧ-инфекцией, вирусными гепатитами, ревматологическими и онкологическими заболеваниями, с наличием признаков острого воспалительного процесса, а также беременные. Критерием включения в группу исследования было наличие подтвержденного диагноза ИТП (данные гемограммы, миелограммы, уровня антитромбоцитарных антител, геморрагического синдрома).

Статистический анализ экспериментальных и клинических данных проводили с помощью программ Statistica 5.0 и Exell. По каждой группе для всех исследуемых параметров определяли среднее значение, статистическую ошибку среднего, стандартное отклонение или дисперсию, коэффициент вариации, скошенность и эксцесс. Распределение каждого параметра, а также соответствие стандартным законам распределения оценивали параметрическими и непараметрическими критериями с использованием множественных ранговых сравнений и метода Дана, а также с помощью парного критерия Стьюдента и критерия Манна — Уитни. Для сравнения значимости различий между средними значениями выборок использовали t-критерий для независимых переменных (в случае нормального распределения) и χ^2 (в случае всех остальных типов распределений), а также дисперсионный анализ. Для площади и диаметра тромбоцитов вычисляли десятичные логарифмы их значений с построением гистограмм распределений (нормальное распределение).

Результаты и обсуждение

Оценка тромбоцитарного звена гемостаза с помощью КФМ проводилась исходно до лечения, через 5–7 дней, через 3 мес. после начала какой-либо

терапии. Анализ результатов обследования пациентов с ИТП показал, что данные КФМ их тромбоцитов отличаются от аналогичных показателей у здоровых лиц.

У всех пациентов с ИТП при сравнении с контрольной группой соматически здоровых лиц выявлено изменение морфологического состава популяции тромбоцитов в виде снижения количества дискоцитов (клеток покоя) до 40 % (при нормативных показателях 63–70 %), увеличения количества дискоэхиноцитов, т. е. активированных тромбоцитов I и II порядка до 38 % и 15 % (при норме 21 % и 12 % соответственно) (рис. 1).

При выполнении данного исследования учитывалась и степень тяжести течения ИТП. Критериями для условной оценки степени тяжести течения заболевания явились данные объективного осмотра, клинико-лабораторного обследования пациентов. Под легкой тяжестью течения понималось отсутствие геморрагического синдрома, снижение уровня тромбоцитов до $50 \times 10^9/\text{л}$, под средней тяжестью – наличие кожно-геморрагического синдрома в виде геморрагической сыпи на нижней половине туловища, носовые, десневые кровотечения, а также тромбоцитопения (от 20 до $50 \times 10^9/\text{л}$), при тяжелой степени выражен геморрагический синдром в виде геморрагической сыпи на верхней половине туловища, маточных, желудочно-кишечных кровотечений, профузных носовых кровотечений, жалоб на постоянную головную боль, снижения остроты зрения и/или снижения уровня тромбоцитов менее $20 \times 10^9/\text{л}$.

У больных с легкой степенью ИТП соотношение I, II, III и IV морфологических типов тромбоцитов составило 58, 26, 12 и 4 % соответственно. Наиболее выраженные изменения наблюдались в группе с глубокой тромбоцитопенией – 40, 38, 15 и 7% (рис. 2). Таким образом, очевидно, что у больных с ИТП с нарастанием тромбоцитопении наблюдается повышение активационного статуса циркулирующих тромбоцитов.

Для объективной количественной оценки динамики морфофункционального состояния тромбоцитов в группах больных, получавших различные

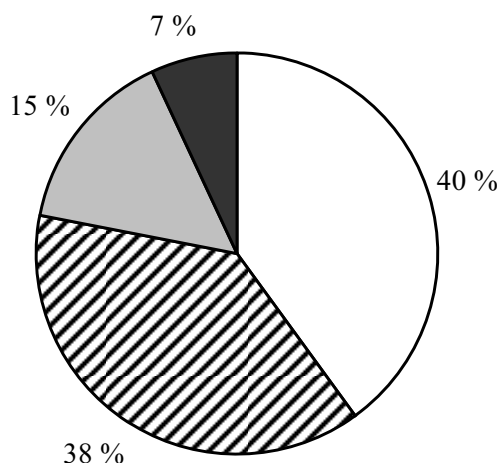


Рис. 1. Морфофункциональное соотношение тромбоцитов у пациентов с ИТП. Здесь и на рис. 2, 3:

- – I морфологический тип,
- ▨ – II морфологический тип,
- – III морфологический тип,
- – IV морфологический тип

виды лечения, были проанализированы средние в циркулирующей популяции морфометрические параметры клеток: диаметр, периметр, высота, площадь и объем.

Обращает на себя внимание, что у пациентов с ИТП отмечается прогрессирующее увеличение диаметра, периметра, площади тромбоцитов при снижении их фазовой высоты при сравнении с контрольной группой соматически здоровых лиц. Следует отметить, что такие морфометрические параметры как диаметр, периметр и площадь клеток преимущественно указывают на их реальные геометрические размеры, в то время как высота и объем являются в большей степени оптическими показателями, которые отражают оптическую плотность внутриклеточного вещества тромбоцита и зависят от состояния его гранулярного аппарата. Поэтому увеличение средних геометрических размеров тромбоцитов свидетельствует о появлении в циркуляции более высокого процента активных тромбоцитов, а

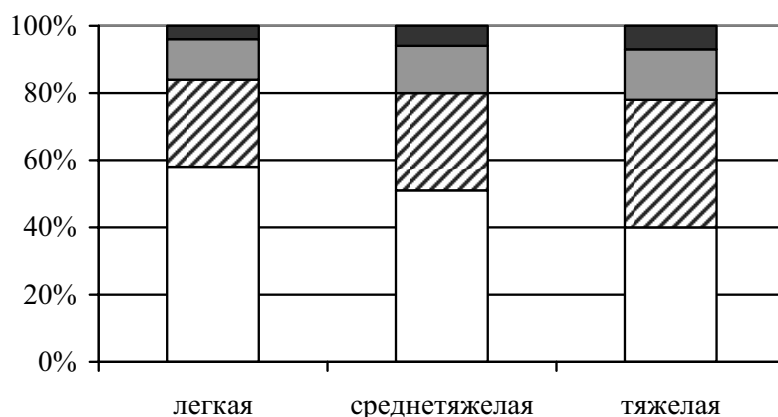


Рис. 2. Соотношение морфологических типов тромбоцитов периферической крови у пациентов с ИТП в зависимости от глубины тромбоцитопении (%)

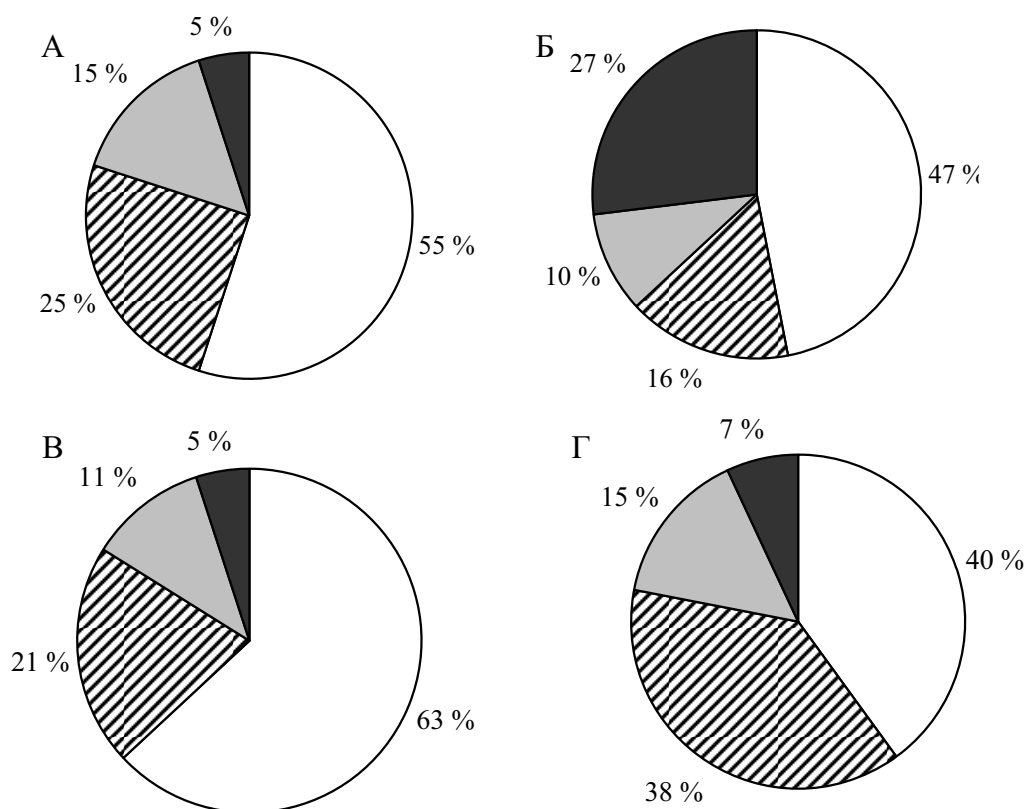


Рис. 3. Соотношение морфологических типов тромбоцитов у пациентов с ИТП на фоне глюкокортикостероидной терапии (А), после спленэктомии (Б), на фоне терапии иммуноглобулином (В) и после проведения сеансов плазмафереза (Г) спустя 1 месяц после начала лечения

снижение оптических параметров — о недостаточности или опустошенности плотных гранул.

После исследования тромбоцитов до использования специфической терапии было изучено влияние различных методов терапии на морфофункциональный статус клеток в динамике (рис. 3). Эффективность проведения различных видов терапии оценивали в динамике на 5–7-е сутки от начала лечения и через 1–3 мес. после начала терапии. Пациенты с ИТП были разделены на 4 группы в зависимости от методов терапии: у 40 человек использовалась глюкокортикостероидная терапия, у 10 — назначение иммуноглобулина, у 8 — плазмаферез, у 14 — спленэктомия.

Гормональная терапия, даже несмотря на значительный подъем уровня тромбоцитов (больше $100 \times 10^9/\text{л}$), не вызвала значительных положительных сдвигов в морфофункциональном статусе тромбоцитов: преобладали диско-эхиноциты I и II порядка, тогда как количество форм покоя составило всего 50 %. Применение гормональных препаратов с целью предупреждения рецидива заболевания в малых дозах (5–10 мг/день) выявило нормализацию морфофункционального статуса лишь к концу 3-го месяца лечения: содержание форм «покоя» (I тип) находилось на нижней границе нормы (55 %), значительно снизилось содержание форм II типа.

У 14 пациентов с ИТП, в лечении которых применялась негормональная терапия (спленэктомия),

через 5–7 суток с момента повышения уровня тромбоцитов (больше $180 \times 10^9/\text{л}$) отмечены значительные изменения морфофункционального состояния тромбоцитов: возрос процент форм IV типа максимально до 27 %, в то время как содержание клеток I типа резко снизилось (максимально до 3 %). Однако через месяц и более при динамическом наблюдении соотношение всех форм постепенно нормализовалось.

Самый лучший результат был получен на фоне использования иммуноглобулина. У всех пациентов, получавших эту терапию, через 5–7 суток от начала лечения отмечены значительные положительные изменения морфофункционального состояния тромбоцитов: увеличилось содержание форм «покоя» — до 70 % (при норме 63–70 %), также нормализовалось соотношение форм II и III порядка. При анализе изменений размеров тромбоцитов установлено, что на фоне этой терапии одной из первых уже через 7 дней от начала лечения нормализуется фазовая высота тромбоцитов.

Использование плазмафереза существенно не повлияло на соотношение форм тромбоцитов как до лечения, так и после, несмотря на хороший клинический эффект у этой группы больных.

Заключение

Морфофункциональный статус тромбоцитов служит объективным критерием исходного состояния тромбоцитарного звена. Установлено,

что тяжесть состояния пациентов сопряжена с изменением размерных параметров тромбоцитов: увеличением диаметра, периметра, площади и уменьшением фазовой высоты клеток. Выявленные изменения клеточного звена гемостаза обладают диагностической и прогностической значимостью.

Прогностически неблагоприятным признаком, свидетельствующим об отсутствии стабильного положительного эффекта проводимой терапии, несмотря на повышение уровня тромбоцитов, является сохранение высокого процента дегенеративно-измененных клеток.

Это свидетельствует о сниженной функциональной потенции тромбоцитов и высокой вероятности повторных рецидивов заболевания, что требует своевременной смены тактики терапии.

Список литературы

- Идельсон Л.И. Тромбоцитопении // Руководство по гематологии / Ред. А.И. Воробьев. М., 1985. 190 с.
- Idel'son L.I. Thrombocytopenia // Manual on hematology. Ed. A.I. Vorob'ev A.I. M., 1985. 190 p.
- Алтыбаев У.А. Выявление, методы лечения, диспансеризация и реабилитация больных тромбоцитопенической пурпурой: автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 1984.
- Altybaev U.A. Revealing, treatment methods, prophylactic medical examination and rehabilitation of patients with thrombocytopenic purpura: abstract of thesis. ... doctor of medical sciences. M., 1984.
- George J.N., Woolf S.H., Rascoe G.E. et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology // Blood. 1996. 88. 3–40.
- Климанский В.А., Алтыбаев У.А. Тромбоцитопеническая пурпура (клиника, диагностика, лечение). Ташкент: Медицина, 1984.
- Klimansky V.A., Altybaev U.A. Thrombocytopenia purpura (clinical picture, diagnostics, treatment). Tashkent: Meditsina, 1984.
- Зотиков Е.А., Бабаева А.Г., Головкина Л.Л. Тромбоциты и антитромбоцитарные антитела. М., 2003.
- Zotikov E.A., Babaeva A.G., Golovkina L.L. Platelets and antiplatelet antibodies. M., 2003.
- Hamidpour M., Behrendt M., Griffiths B. et al. The isolation and characterization of antiplatelet antibodies // Eur. J. Hematol. 2006. 76. (4). 331–338.
- Terry G. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: Mechanisms of pathogenesis // Oncologist. 2009. 14. (10). 12–21.
- Баркаган З.С. Патология тромбоцитарного гемостаза. Тромбоцитопении // Руководство по гематологии в 3 т., 3-е изд. Ред. А.И. Воробьев. Т. 3. М.: Ньюдиамед, 2002. 29–35.
- Barkagan Z.S. Pathology of platelets haemostasis. Thrombocytopenia // Manual on hematology. Ed. A.I. Vorob'ev. Vol.3. M.: Newdiamed, 2002. 29–35.
- Тоцкая А.А. Кровяные пластинки в норме, тромбастении, тромбоцитопении (фазово-контрастная и электронная микроскопия): автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1967.
- Totskaya A.A. Blood plates in norm, thrombastenia, thrombocytopenia (phase contrast and electronic microscopy): abstract of thesis. cand. of medical sciences. M., 1967.
- Вашкинел В.К., Петров М.Н. Электронно-микроскопическое исследование функциональных структур тромбоцитов человека. // Функциональные свойства тромбоцитов в норме и при патологических состояниях. Обнинск, 1975. 19.
- Vashkinel V.K., Petrov M.N. Electron microscopic research of human platelet functional structures // Functional properties of platelets in norm and at pathological conditions. Obninsk, 1975. 19.
- Козинец Г.И., Котельников В.М., Погорелов В.М. Применение компьютеров в гематологических цитологических исследованиях // Лаб. дело. 1990. (3). 21–25.
- Kozinets G.I., Kotelnikov V.M., Pogorelov V.M. Application of computers to hematology cytology researches // Lab. delo. 1990. (3). 21–25.
- Погорелов В.М., Медовый В.С., Балабуткин В.А. и др. Методы компьютерной цитологии в гематологических исследованиях // Клин. лаб. диагностика. 1997. (11). 40–44.
- Pogorelov V.M., Medovyi V.S., Balabutkin V.A. et al. Methods of computer cytology in hematology researches // Klin. lab. diagnostika. 1997. (11). 40–44.
- Василенко И.А., Шабалин В.Н., Тычинский В.П. и др. Новая технология прижизненной компьютерной фазовой микроскопии: диагностические возможности и перспективы // Радиоэлектроника в медицинской диагностике (оценка функций и состояния организма). М., 1995. 164–169.
- Vasilenko I.A., Shabalin V.N., Tychinsky V.P. et al. New technology of lifetime computer phase microscopy: diagnostic possibilities and prospects // Radio electronics in medical diagnostics (an estimation of functions and organism condition). M., 1995. 164–169.
- Тычинский В.П. Компьютерный фазовый микроскоп. М.: Знание, 1989. 64 с.
- Tychinsky V.P. A computer phase microscope. M.: Znanie, 1989. 64 p.
- Creath K. Phase-shifting speckle interferometry // Appl. Opt. 1985. 24. (18). 3053–3058.
- Vishnyakov G.N., Levin G.G., Minaev V.L. et al. Tomographic interference microscopy of living cells // Microscopy Analysis. 2004. 18. 15–17.
- Arnold D.M., Nazi I., Kelton J.G. New treatments for idiopathic thrombocytopenic purpura: rethinking old hypotheses // Expert Opin. Investig. Drugs. 2009. 18. 805–819.
- Lechner K., Weltermann A., Pabinger I. Autoimmunthrombocytopenie (AITP) des Erwachsenen: Klinik, Diagnose und Therapie // Wien. Klin. Wochenschr. 2006. 118. 255–264.

ASSESSMENT OF MORPHOFUNCTIONAL CONDITION OF PLATELETS OF PATIENTS WITH IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA BY METHOD OF VITAL COMPUTER MORPHOMETRY

Ekaterina Nikolaevna KOLOSOVA, Irina Anatolievna VASILENKO, Lidiya Grigoryevna KOVALEVA

*Hematology Scientific Centre
125167, Moscow, Noviy Zykovskii av., 4a*

The wide group of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) was examined. All patients with ITP have changes of morphological structure of population of platelets in the form of decrease in the quantity of discocytes (resting cells). It has been revealed that the increase in average values of diameter, perimeter, and area of platelets progress at the decrease in phase height of thrombocytes. The using of glucocorticoids steroid therapy, splenectomy and plasmapheresis has not caused considerable positive shifts in morpho-functional status of platelets. The best result of treatment has been received against a background of the immunoglobulin use. It has been established that severity of the patients condition accurately correlates with the change of dimensional parameters of platelets: increase in diameter, perimeter, area and reduction of phase height of cages.

Key words: idiopathic thrombocytopenic purpura, vital computer morphometry, prednisolone, splenectomy, immunoglobulin, plasmapheresis.

Kolosova E.N. — *post-graduate student of the department for standardization of methods of blood system diseases therapy, e-mail: katja.27@mail.ru*

Vasilenko I.A. — *senior researcher, doctor of medical sciences, professor, e-mail: katja.27@mail.ru*

Kovaleva L.G. — *doctor of medical sciences, professor, head of the department for standardization of methods of blood system diseases therapy, e-mail: katja.27@mail.ru*