

УДК 616.15:616.155.294

ЕФЕКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ МОРФОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ТРОМБОЦИТІВ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ІДІОПАТИЧНОЇ ТРОМБОЦИТОПЕНІЧНОЇ ПУРПУРИ

Є.В. Шороп, С.М. Шороп

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Мета. Визначити зміни морфології тромбоцитів, характерні для ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури (ІТП), та оцінити ефективність використання різних морфологічних показників у якості діагностичних критеріїв цього захворювання.

Матеріали і методи. Обстежено 58 хворих на ІТП. Групу контролю становили 87 осіб без гематологічних захворювань. За допомогою автоматичного гематологічного аналізатора визначали кількість тромбоцитів, середній об'єм тромбоцитів (MPV), ширину розподілу тромбоцитів за об'ємом (PDW), відсоток великих тромбоцитів (P-LCR). Методом імерсійної мікроскопії в мазках периферичної крові підраховували тромбоцитограми. За цифровими мікрофотографіями мазків крові, отриманими методом світлової мікроскопії, визначали площі тромбоцитів і враховували за цими даними моду, середнє значення, середнє значення логарифма, коефіцієнт варіації, стандартне відхилення, стандартне відхилення логарифма, скошеність кривої розподілу. Методом проточної цитометрії визначали відсотковий вміст ретикулярних тромбоцитів та флуоресценцію тромбоцитів після фарбування РНК-специфічним барвником тіазоловим оранжевим.

Результати. В тромбоцитограмах при ІТП спостерігалось підвищення відносного вмісту форм подразнення – $(4,8 \pm 0,9)\%$ проти $(0,7 \pm 0,1)\%$ ($p = 0,0001$), а також відповідне до цього зменшення відсотку зрілих тромбоцитів – $(90,1 \pm 1,3)\%$ проти $(96,9 \pm 0,3)\%$ ($p = 0,0004$). При автоматичному аналізі крові спостерігалось збільшення показників розмірів тромбоцитів: MPV – $(10,3 \pm 0,3)$ фл проти $(9,4 \pm 0,1)$ фл ($p = 0,0065$), PDW – $(15,3 \pm 0,8)\%$ проти $(12,5 \pm 0,4)\%$ ($p = 0,0006$), P-LCR – $(28,8 \pm 1,8)\%$ проти $(22,3 \pm 0,9)\%$ ($p = 0,0022$). За даними морфометричного дослідження при ІТП виявлено збільшення статистичних показників площ тромбоцитів: середнього значення $(10,9 \pm 0,6)$ мкм² проти $(8,0 \pm 0,4)$ мкм² ($p = 0,0002$), середнього значення натурального логарифма – $2,12 \pm 0,04$ проти $1,93 \pm 0,05$ ($p = 0,0088$), коефіцієнта варіації – $(75,2 \pm 2,8)\%$ проти $(48,3 \pm 1,6)\%$ ($p < 0,0001$), стандартного відхилення – $(8,5 \pm 0,7)$ мкм² проти $(3,7 \pm 0,1)$ мкм² ($p < 0,0001$), стандартного відхилення натурального логарифма – $0,61 \pm 0,02$ проти $0,43 \pm 0,01$ ($p < 0,0001$), скошеності кривої розподілу – $3,2 \pm 0,2$ проти $1,3 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$). Методом проточної цитометрії в крові хворих на ІТП виявлено збільшення відносної кількості ретикулярних тромбоцитів – $(16,0 \pm 3,8)\%$ проти $(2,3 \pm 0,4)\%$ ($p < 0,0001$), це також супроводжувалося відповідно

більшим показником флуоресценції при фарбуванні тіазоловим оранжевим – $(357,5 \pm 18,4)$ у.о. проти $(296,4 \pm 17,6)$ у.о. ($p = 0,0144$). При оцінці діагностичного значення різних показників методом аналізу кривої чутливість/специфічність найбільш ефективними виявилися підрахунок кількості ретикулярних тромбоцитів ($AUC = 0,89$) та показники площ тромбоцитів: коефіцієнт варіації ($AUC = 0,91$), стандартне відхилення ($AUC = 0,91$), стандартне відхилення логарифма ($AUC = 0,93$), скошеність кривої розподілу ($AUC = 0,92$).

Висновок. Встановлено, що характерним для ІТП є підвищення в крові відносної кількості ретикулярних тромбоцитів, у тромбоцитограмі – відсотку форм подразнення тромбоцитів; при автоматичному аналізі крові – показників MPV, PDW, P-LCR; при морфометричному аналізі в мазках крові – середніх розмірів та анізоцитозу тромбоцитів. Серед використаних методів найбільш ефективними для діагностики ІТП є визначення кількості ретикулярних тромбоцитів в периферичній крові, а також морфометричні показники, що характеризують підвищену варіабельність тромбоцитів за розмірами.

Ключові слова: ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, ретикулярні тромбоцити, тромбоцити, морфометрія, автоматичний гематологічний аналізатор.

EFFICIENCY OF SOME MORPHOLOGICAL THROMBOCYTES PARAMETERS FOR DIAGNOSTICS OF THE IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA

Y.V. Shorop, S.M. Shorop

SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Resume. Aim. Determine the changes in platelet morphology characteristic of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and evaluate the effectiveness of using different morphological parameters as diagnostic criteria for this disease.

Materials and methods. 58 patients with ITP were examined. The control group comprised 87 people without hematologic diseases. The number of platelets, the Mean platelet volume (MPV), platelet distribution width (PDW), and the Platelet large cell ratio (P-LCR) were determined using an automatic hematological analyzer. Thrombocytograms were calculated by immersion microscopy in peripheral blood slides. By digital micrographs of blood slides obtained by light microscopy, platelets squares were determined and the mode, mean, average logarithm, variation coefficient, standard deviation, standard deviation of logarithm, screw coefficient were calculated based on these data. Using the flow cytometry method determined the percentage of reticular platelets and platelet fluorescence after painting with an RNA-specific dye is thiazole orange.

Results. In thrombocytograms, by the ITP, an increase in the relative content of irritation forms was observed – $(4,8 \pm 0,9)\%$ versus $(0,7 \pm 0,1)\%$ ($p = 0,0001$), and corresponding to this decrease in the percentage of mature platelets – $(90,1 \pm 1,3)\%$ versus $(96,9 \pm 0,3)\%$ ($p = 0,0004$). At automatic blood count, an increase in platelet indices was observed: MPV – $(10,3 \pm 0,3)$ fl versus $(9,4 \pm 0,1)$ fl ($p = 0,0065$), PDW –

(15,3 ± 0,8)% versus (12,5 ± 0,4)% ($p = 0,0006$), P -LCR – (28,8 ± 1,8)% versus (22,3 ± 0,9%) ($p = 0,0022$). According to morphometric data by the ITP, there was an increase in the statistical parameters of platelet squares: the average value (10,9 ± 0,6)μm² (8,0 ± 0,4)μm² ($p = 0,0002$), the mean value of the natural logarithm – 2,12 ± 0,04 versus 1,93 ± 0,05 ($p = 0,0088$), coefficient of variation – (75,2 ± 2,8)% versus (48,3 ± 1,6)% ($p < 0,0001$), standard deviation – (8,5 ± 0,7)μm² versus (3,7 ± 0,1)μm² ($p < 0,0001$), standard deviation of natural logarithm – 0,61 ± 0,02 versus 0,43 ± 0,01 ($p < 0,0001$), skewness coefficient – 3,2 ± 0,2 versus 1,3 ± 0,1 ($p < 0,0001$). The method of flow cytometry revealed in the blood of patients with ITP an increase in the relative number of reticulated platelets – (16,0 ± 3,8)% versus (2,3 ± 0,4)% ($p < 0,0001$), it was also accompanied by a large index of fluorescence during coloring thiazole orange – (357,5 ± 18,4) conditional. unit against (296,4 ± 17,6) conditional. unit ($p = 0,0144$). When assessing the diagnostic value of different parameters, the sensitivity/specificity of the curve analysis method was the most effective calculation of the number of reticular platelets (AUC = 0,89) and platelet squares indices: variation coefficient (AUC = 0,91), standard deviation (AUC = 0,91), the standard deviation of the logarithm (AUC = 0,93), the skewness coefficient (AUC = 0,92).

Conclusion. It is established that the characteristic of ITP is an increase in the relative number of reticular platelets in the blood; in the thrombocytogram is in the percentage of platelets irritation forms; at automatic blood analysis is indicators MPV, PDW, P -LCR; at morphometric analysis in blood slides is the average size and anisocytosis of the platelets. Among the methods used, the most effective for the diagnosis of ITP are the determination of the reticular platelets number in the peripheral blood, as well as the morphometric parameters that characterize the increased platelet variability by size.

Key words: idiopathic thrombocytopenic purpura, reticulated platelets, platelets, morphometry, automatic hematological analyzer.

Вступ. Як відомо, головним патогенетичним механізмом ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури (ІТП) є руйнування тромбоцитів під дією аутоімунних антитіл. Внаслідок цього, у циркулюючій крові зменшується до декількох годин тривалість існування кров'яних пластинок і, відповідно, зростає частка молодих тромбоцитів, що нещодавно вивільнилися з кісткового мозку. Це супроводжується змінами морфології тромбоцитів та збільшенням відносного вмісту ретикулярних тромбоцитів (РТ) в периферичній крові. До останніх відносять молоді тромбоцити, що містять залишки РНК, які можна виявити за допомогою специфічних флуоресцентних барвників.

Можливість використання розмірних характеристик тромбоцитів та кількості РТ для диференційної діагностики ІТП до теперішнього часу вивчається науковцями різних країн [3, 4] Активність досліджень в цьому напрямі обумовлюється також наявністю сучасних методів визначення

розмірних характеристик клітин крові та відсотка РТ за допомогою автоматичних гематологічних аналізаторів.

Мета. Визначити зміни морфології тромбоцитів, характерні для ІТП, та оцінити ефективність використання різних морфологічних показників у якості діагностичних критеріїв цього захворювання.

Матеріали і методи дослідження. Обстежено периферичну кров 58 хворих на ІТП. Групу контролю становили 87 осіб без гематологічних захворювань.

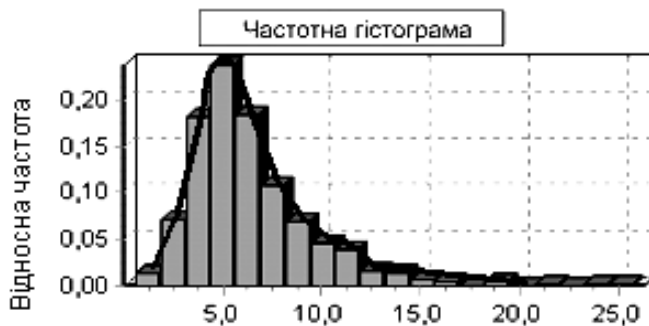
За допомогою автоматичного гематологічного аналізатора SYSMEX KX-21N (Японія) визначали кількість тромбоцитів, середній об'єм тромбоцитів (MPV), ширину розподілу тромбоцитів за об'ємом (PDW) та відсоток великих тромбоцитів (P-LCR).

Для оцінки морфології тромбоцитів у мазках крові, пофарбованих за Паппенгеймом, методом імерсійної мікроскопії при збільшенні $\times 1000$ підраховували тромбоцитограму, розподіляючи тромбоцити за їхніми морфологічними ознаками на зрілі, юні, старі та форми подразнення [2]. За цими ж мазками крові визначали морфометричні показники тромбоцитів методом комп'ютерного аналізу зображень. Для цього за допомогою мікрофотонасадки на мікроскопі Leica DME (Німеччина) цифровою фотокамерою робили знімки полів зору, що містили тромбоцити. На мікрофотографіях (в мкм^2) визначали площу тромбоцитів як кількість точок, які утворюють їхнє зображення, помножене на масштабний коефіцієнт, визначений при вимірюванні латексних часток відомого розміру.

Як відомо, розподіл тромбоцитів у крові за розмірами має складний характер, що відрізняється з нормальним (рисунок), тому для морфометричної характеристики тромбоцитів, крім середнього значення їхньої площі (С-ПТ), враховували ще декілька статистичних показників [1].

Так, для характеристики розміру визначали площу тромбоцитів, яка найчастіше зустрічалася в мазку – моду площі тромбоцитів (М-ПТ). Показником варіабельності були середньоквадратичне відхилення (СВ-ПТ) та коефіцієнт варіації (КВ-ПТ), а тенденції до збільшення розмірів – скошеність кривої розподілу площі тромбоцитів (СК-ПТ). Крім цього, статистичний розподіл розмірів тромбоцитів наближали до нормального шляхом обчислення натурального логарифма значень площі тромбоцитів. Для отриманих величин враховували середнє значення (СЛ-ПТ), яке характеризувало розмір тромбоцитів, та середньоквадратичне відхилення (СВЛ-ПТ), що характеризувало варіабельності розмірів.

Кількість РТ у периферичній крові визначали методом лазерної цитофлуориметрії з використанням РНК-специфічного барвника тіазолового оранжевого. Дослідження виконувалося в плазмі, збагаченій тромбоцитами,



Середнє арифметичне	6,95 мкм ²
Мода	5,09 мкм ²
Середнє арифметичне натурального логарифма	1,85
Стандартне відхилення	3,18 мкм ²
Стандартне відхилення натурального логарифма	0,42
Коефіцієнт варіації	45,70%
Скошеність кривої розподілу	1,84

Рис. Розподіл тромбоцитів за площею в мазку крові особи контрольної групи.

яку отримували центрифугуванням венозної крові, стабілізованої етилендіамінтетраацетатом. Після інкубації з розчином тіазолового оранжевого проби аналізували на лазерному цитофлуориметрі FACScan (США). Для аналізу обирали дані клітин, які за параметрами прямого та бічного світлорозсіювання відносилися до регіону тромбоцитів, побудованому при аналізі даних експресії тромбоцит-специфічного антигена CD42b в паралельній пробі, визначеного з використанням відповідного моноклонального антитіла, міченого флуоресцеїном. Граничне значення параметра флуоресценції РТ було враховане при аналізі гістограм розподілу цього показника у здорових осіб. У ході дослідження визначався відсотковий вміст РТ та середнє значення параметра флуоресценції і (в умовних одиницях).

Імовірність різниці даних контрольної групи та групи здорових осіб визначали за непараметричним критерієм Уїтні-Манна, діагностичну ефективність методом аналізу характеристикних кривих чутливість/ефективність (ROC-аналіз). При цьому ефективність виражали як значення площі під такою кривою.

Результати та їх обговорення. У хворих на ІТП мала місце значна тромбоцитопенія ($55,0 \pm 5,1 \times 10^9/\text{л}$ порівняно з групою контролю ($234,3 \pm 8,4 \times 10^9/\text{л}$) ($p < 0,0001$).

В тромбоцитограмах хворих порівняно з групою контролю спостерігалось підвищення відносного вмісту форм подразнення – ($4,8 \pm 0,9$)% проти ($0,7 \pm 0,1$)% ($p = 0,0001$), а також відповідно до цього зменшення відсотку зрілих тромбоцитів – ($90,1 \pm 1,3$)% проти ($96,9 \pm 0,3$)% ($p = 0,0004$). Відносні кількості юних та старих тромбоцитів не мали вірогідних різниць з нормою і, відповідно, становили ($4,3 \pm 0,8$)% проти ($2,0 \pm 0,4$)% ($p = 0,0544$) та ($0,8 \pm 0,1$)% проти ($0,5 \pm 0,1$)% ($p = 0,3962$).

При дослідженні тромбоцитів периферичної крові за допомогою гематологічного аналізатора, крім тромбоцитопенії, спостерігалось підвищення розмірних показників тромбоцитів: MPV – ($10,3 \pm 0,3$) фл проти ($9,4 \pm 0,1$) фл ($p = 0,0065$), PDW – ($15,3 \pm 0,8$)% проти ($12,5 \pm 0,4$)% ($p = 0,0006$), P-LCR – ($28,8 \pm 1,8$)% проти ($22,3 \pm 0,9$)% ($p = 0,0022$). Виявлені зміни свідчать про збільшення розміру тромбоцитів у крові за рахунок підвищення відносного вмісту цих клітин більших розмірів.

Збільшення розмірів тромбоцитів також було виявлено при вимірюванні їхніх площ за мікрофотографіями. Це виражалось в збільшенні С-ІТТ – ($10,9 \pm 0,6$) $\mu\text{м}^2$ проти ($8,0 \pm 0,4$) $\mu\text{м}^2$ ($p = 0,0002$) та СЛ-ІТТ – $2,12 \pm 0,04$ проти $1,93 \pm 0,05$ ($p = 0,0088$) у групі контролю. Поряд з тим, значення показника М-ІТТ лишалося без змін – ($6,4 \pm 0,3$) $\mu\text{м}^2$ проти ($6,3 \pm 0,4$) $\mu\text{м}^2$ у групі контролю, що вказує на те, що більшість тромбоцитів при ІТП зберігають нормальні розміри, а збільшення середніх показників їхніх площ відбувається за рахунок появи в кровообігу великих кров'яних пластинок. На появу таких тромбоцитів також вказувало підвищення у хворих показника СК-ІТТ – $3,2 \pm 0,2$ проти $1,3 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$). Поява великих форм тромбоцитів супроводжувалась збільшенням морфометричної варіабельності цих клітин, яка проявлялась підвищенням значень показників: КВ-ІТТ – ($75,2 \pm 2,8$)% проти ($48,3 \pm 1,6$)% ($p < 0,0001$), СВ-ІТТ – ($8,5 \pm 0,7$) $\mu\text{м}^2$ проти ($3,7 \pm 0,1$) $\mu\text{м}^2$ ($p < 0,0001$) та СВЛ-ІТТ – $0,61 \pm 0,02$ проти $0,43 \pm 0,01$ ($p < 0,0001$).

Дослідження цитофлуориметричним методом з використанням тіазолового оранжевого показало, що в крові хворих на ІТП спостерігалось збільшення кількості ретикулярних тромбоцитів – ($16,0 \pm 3,8$)% проти ($2,3 \pm 0,4$)% ($p < 0,0001$) в групі контролю. Збільшення відносного вмісту ретикулярних тромбоцитів при ІТП також супроводжувалось підвищеною флуоресценцією тромбоцитів – ($357,5 \pm 18,4$) у.о. проти ($296,4 \pm 17,6$) у.о. ($p = 0,0144$) у групі контролю.

Для визначення потенційної діагностичної цінності досліджених показників, які у хворих на ІТП мали відмінності від контрольної групи,

вказані показники були піддані ROC-аналізу. Результати наведено в таблиці.

Таблиця – Цінність показників тромбоцитів для діагностики ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури за даними ROC-аналізу

Показники	Площа під характеристичною кривою $M \pm \sigma$
Відсоток форм подразнення тромбоцитів у тромбоцитогамі	0,76±0,05
Відсоток зрілих тромбоцитів у тромбоцитогамі	0,75±0,05
MPV	0,71±0,08
PDW	0,77±0,07
P-LCR	0,74±0,08
Середня площа тромбоцитів	0,72±0,05
Середнє значення логарифма площ тромбоцитів	0,65±0,06
Коефіцієнт варіації площ тромбоцитів	0,91±0,03
Стандартне відхилення площ тромбоцитів	0,91±0,03
Стандартне відхилення логарифма площ тромбоцитів	0,93±0,02
Асиметрія кривої розподілу площ тромбоцитів	0,92±0,03
Відсоток ретикулярних тромбоцитів	0,89±0,05
Показник флуоресценції тромбоцитів при дослідженні з тіазоловим оранжевим	0,73±0,08

Як можна бачити з приведених даних, найбільшу цінність для діагностики ІТП можуть мати показники, що характеризують підвищення варіабельності тромбоцитів, визначені методом комп'ютерного аналізу зображень за мазками периферичної крові, а також відносний вміст РТ у периферичній крові, підрахований методом проточної цитометрії.

Висновки

1. Особливостями тромбоцитогамі у хворих на ІТП є збільшення в них відсотку форм подразнення тромбоцитів та відповідне зменшення частки зрілих тромбоцитів.

2. Характерними змінами тромбоцитів при ІТП за даними морфометричного дослідження та автоматичного аналізу крові є відносне збільшення в периферичній крові кількості великих форм цих клітин, що проявляється підвищенням їхнього середнього розміру та збільшенням морфометричної гетерогенності.

3. У хворих на ІТП в периферичній крові спостерігається збільшення відносного вмісту ретикулярних тромбоцитів та підвищення, в наслідок

цього, флуоресценції тромбоцитів при фарбуванні РНК-специфічним барвником тіазоловим оранжевим.

4. Серед досліджених показників найбільшу цінність для діагностики ІТП мають показники морфометричної гетерогенності тромбоцитів та відносна кількості ретикулярних тромбоцитів в периферичній крові.

Література

1. Клетки крови – современные технологии их анализа/ Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, Д.А. Шмаров [и др.]. – М. : Триада-Фарм, 2002. – 200 с.

2. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / [под ред. Е.А. Кост]. – М. : Медицина, 1975. – (издание второе исправленное и дополненное). – 383 с.

3. Diagnostic value of platelet indices and bone marrow megakaryocytic parameters in immune thrombocytopenic purpura / Y.T. Tang, P. He, Y.Z. Li, H.Z. Chen // Blood Coagul. Fibrinolysis.– 2017. – V. 28, №1. – P. 83–90.

4. Measurements of immature platelets with haematology analysers are of limited value to separate immune thrombocytopenia from bone marrow failure / A. Cybulska, L. Meintker, J. Ringwald, SW. Krause // Br. J. Haematol. – 2017. – V. 177, № 4. – P. 612–619.

Надійшла 10.10.2017 року.

УДК 612.151-083:616.151.514.-056.7

НОВИЙ МЕТОД ОТРИМАННЯ КОМПЛЕКСУ ФАКТОРІВ VIII/ФОН ВІЛЛЕБРАНДА

Н.О. Шурко

*ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»,
Львів*

Резюме. Хвороба Віллебранда разом із гемофілією є найпоширенішими захворюваннями системи гемостазу. Для лікування цих захворювань використовують препарати FVIII.

Мета роботи – дослідити співвідношення факторів VIII/фон Віллебранда на різних етапах технології отримання антигемофільного препарату.

Методи дослідження: фракціонування, іонообмінна та барвник-лігандна афінна хроматографія.

Результати. У статті наведено результати досліджень очищення комплексу факторів VIII/фон Віллебранда, що є комбінацією попереднього фракціонування з наступними етапами іонообмінної та барвник-лігандної хроматографії. Охарактеризовано основні переваги цього методу.