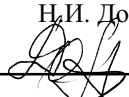


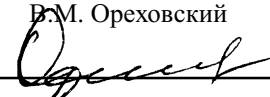
# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО  
Начальник отдела  
науки и внедрения  
Н.И. Доста

  
\_\_\_\_\_  
2 апреля 1999 г.

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель  
министра здравоохранения  
В.М. Ореховский

  
\_\_\_\_\_  
5 апреля 1999 г.  
Регистрационный № 90-9807

## МЕТОД ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ТРОМБОЦИТОПОЭЗА В УСЛОВИЯХ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ

Минск 1999

**Учреждение-разработчик:** НИИ гематологии и переливания крови МЗ РБ

**Авторы:** канд. мед. наук В.Е. Иванов, К.В. Сальников, Т.Н. Башманова, В.Н. Смольникова, канд. мед. наук В.М. Кучук, Т.И. Терехович

**Рецензент:** канд. мед. наук Д.Г. Цвирко

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа

## ВВЕДЕНИЕ

Тромбоцитопенические состояния — большая группа заболеваний и синдромов, объединенная основным диагностическим критерием — снижением количества тромбоцитов периферической крови ниже  $150 \times 10^9/\text{л}$ . Выделяют наследственные и приобретенные формы тромбоцитопений.

При большинстве наследственных тромбоцитопений изменены различные функциональные свойства тромбоцитов, что дает основание относить эти болезни к тромбоцитопеническим тромбоцитопатиям. Описаны единичные случаи тромбоцитопений, связанных с нарушением активности ферментов гликолиза или цикла Кребса, а также с наследственным нарушением образования тромбопоэтинов.

Приобретенные формы тромбоцитопений разделяют по генезу повреждения мегакариоцитарно-тромбоцитарного аппарата на иммунные и обусловленные:

- механической травмой тромбоцитов (при гемангиомах, спленомегалии и др.);
- угнетением пролиферации клеток костного мозга (при апластической анемии, химическом и радиационном повреждении костного мозга);
- замещением костного мозга опухолевой тканью (при острых и хронических лейкозах);
- соматической мутацией (при болезни Маркиафавы — Микели (пароксизмальной ночной гемоглобинурии));
- повышенным потреблением тромбоцитов (при тромбозах, синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания и др.);
- недостатком витамина  $B_{12}$  или фолиевой кислоты.

Тромбоцитопения также может осложнять течение многих других заболеваний, ассоциированных с извращенным иммунным статусом, таких как коллагенозы (системная красная волчанка, ревматоидный артрит и др.); аутоиммунная гемолитическая анемия (синдром Эванса), тиреоидит.

Несмотря на большое число заболеваний, этиологически связанных с тромбоцитопенией, существуют три основных патофизиологических механизма развития этого состояния:

- сниженная продукция;
- ускоренное разрушение;
- повышенное потребление тромбоцитов.

Особенно сложна скрининговая дифференцировка между гипопролиферативными и гипердеструктивными формами тромбоцитопении. До сих пор не существует лабораторного теста, позволяющего быстро, достоверно и с малыми затратами провести дифференциальную диагностику этих трех механизмов тромбоцитопенического состояния.

Базовые исследования для оценки тромбоцитопенического состояния включают микроскопическое изучение кровяных пластинок в мазке периферической крови и мегакариоцитов в пунктате и трепанобиоптате костного мозга, что позволяет провести качественную дифференцировку гипоплазии (в костном мозге мегакариоциты

отсутствуют) и ускоренного разрушения тромбоцитов (неэффективный мегакариоцитопоз — резкое увеличение числа мегакариоцитов в каждом поле зрения — «синий» костный мозг). Анализ распределения тромбоцитов по объему, количеству иммуноглобулина G (IgG), связанного с поверхностью тромбоцитов, а также изучение продолжительности жизни тромбоцитов с помощью изотопов являются важными диагностическими дополнениями. Проведение всего комплекса названных исследований достаточно информативно. Однако эти процедуры имеют свои недостатки: пункции костного мозга и трепанобиопсии причиняют дискомфорт пациентам, могут сопровождаться серьезными геморрагическими и инфекционными осложнениями и подлежат субъективной интерпретации врача-морфолога; измерение продолжительности жизни тромбоцитов — очень длительное и трудоемкое исследование и подвергает пациента облучению; методы исследования, использующиеся для определения количества тромбоцитарного IgG, также сложны для рутинной лабораторной диагностики и весьма дорогостоящи.

Таким образом, имеется потребность в быстросействующем, атравматичном тесте, который поможет установить механизм тромбоцитопении.

В 1969 г. Ingram и Coopersmith выявили РНК-подобные субстанции в молодых тромбоцитах, которые появляются в большом количестве в кровотоке после острой кровопотери. В этом исследовании такие тромбоциты окрашивались метиленовым синим и расценивались как ретикулярные (молодые) тромбоциты.

Свойства тиазол-оранжа (ТО), как средства флуоресцентного окрашивания РНК в клетках крови для использования в проточной цитометрии, были впервые исследованы Lee et al. Они показали, что ТО легко активируется при 488 нм, оптимальной длине волны для аргоновых лазеров, и что в результате отмечается повышение флуоресценции при связывании с РНК приблизительно в 3 000 раз. Кроме того, ТО хорошо проникает через мембраны жизнеспособных клеток крови.

Позже Klienast и Schmitz показали, что РНК тромбоцитов, имеющих длительность жизни менее 24 ч, интенсивно окрашивается флюорохромом тиазол-оранжем, и процент таких молодых тромбоцитов может быть определен с помощью проточной цитометрии, подобно тесту обнаружения РНК в ретикулоцитах. Тромбоциты с продолжительностью жизни более 24 ч становятся ТО-негативными, так как теряют остаточную РНК.

Изучение образцов плазмы пациентов, которые предположительно имели повышенные уровни синтеза тромбоцитов, показало увеличенный процент тиазолпозитивных тромбоцитов. Ault et al. и Rinder et al. показали достоверность и применимость этого метода в многочисленных клинических испытаниях и подтвердили данные, что интенсивность синтеза тромбоцитов пропорциональна проценту тиазолпозитивных тромбоцитов.

## **МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТО-ПОЗИТИВНЫХ ТРОМБОЦИТОВ**

Окрашивание ТО. ТО производства Polysciences, Inc. Warrington, PA (лот № 445486). Рабочий раствор ТО (1 мг/мл) был сделан в метаноле. Рабочий раствор разбавлялся 1:5 000 в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 0,1% бычий сывороточный альбумин (BSA, Sigma, USA) и 0,01% азида натрия (NaN<sub>3</sub>, Sigma, USA).

Для окрашивания 5 мкл свежей цельной крови, стабилизированной 0,2 г ЭДТА (3,8% цитратом Na), добавлялись к 1 мл разбавленного ТО и инкубировались при комнатной температуре в течение 1 ч в защищенном от света месте. Параллельно ставилась контрольная проба: 5 мкл цельной крови, стабилизированной ЭДТА, добавляли к 1 мл PBS, содержащему 0,1% бычий сывороточный альбумин (BSA, Sigma, USA) и 0,01% азида натрия ( $\text{NaN}_3$ , Sigma, USA). После инкубации образцы переносились на лед на 20 мин для исключения неспецифического окрашивания клеток.

Определение ТО-позитивных тромбоцитов. (Приложение 1). Образцы анализировались на FACScan (Becton&Dickinson, Texas, USA), оборудованном аргоновым лазером. Лазерная эмиссия была отрегулирована на молекулярный вес 200 при 488 нм для активации. Флуоресценция определялась через 530/30 нм фильтр.

Образцы пропускались через лазерный луч через 70-нм наконечник при скорости потока 500–1000 клеток крови в секунду. Данные были собраны и проанализированы на Macintosh, оборудованном программным обеспечением LYSIS II (Becton&Dickinson, Texas, USA).

В анализе цельной крови тромбоциты были идентифицированы на основе их способности рассеивать световой пучок в лайт-скаттере, который отделял их от эритроцитов и лейкоцитов и выделял гейт популяции тромбоцитов. Исследование богатой тромбоцитами плазмы, отмытой от эритроцитов, подтвердило, что более 95% клеток, появившихся в пределах области гейта, были тромбоцитами и менее 5% популяции тромбоцитов появились вне этого гейта. Анализируется минимум 5 000 клеток в пределах гейта тромбоцитов для каждого образца. Высокофлуоресцирующая популяция тромбоцитов определяется между средним и правым маркером в гистограмме окрашенного образца и рассматривается как тiazолпозитивные тромбоциты.

Измерения количества и размеров тромбоцитов. Измерения количества и размеров тромбоцитов были сделаны на свежих образцах цельной крови с ЭДТА с использованием автоматического геманализатора (SYSMEX 7000, Kobe, Japan). Количество тромбоцитов менее  $15 \cdot 10^9/\text{л}$  подтверждалось фазово-контрастной микроскопией.

#### Нормальные значения теста

В лаборатории клинической гематологии и ТКМ НИИ ГПК выработаны нормальные показатели теста — среднее значение ТО-позитивных тромбоцитов  $20 \pm 2,6\%$ .

## **КЛИНИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ДАННЫХ**

Исследование популяции ТО-позитивных тромбоцитов позволяет провести качественную оценку состава тромбоцитов и опосредованно состояние тромбоцитопоэза в данный момент времени.

#### При острых лейкозах:

*Повышение процента ТО-позитивных тромбоцитов:*

1) на момент постановки диагноза — отражает повышенное разрушение тромбоцитов или их потребление при гиперкоагуляционно-тромботической фазе ДВС-синдрома, часто сопровождающей острый промиелоцитарный лейкоз;

2) на 5–7-й дни проведения полихимиотерапии — вследствие редукции лейкозного клона и уменьшения угнетающего воздействия на мегакариоцитарный росток. Как следствие — восстановление остаточного нормального тромбоцитопоэза;

3) на 12–15-й дни (на фоне восстановления гранулоцитарного роста) — вследствие потребления при гиперкоагуляционно-тромботической фазе ДВС-синдрома или при развитии так называемой рефракторной тромбоцитопении, обусловленной аллоиммунизацией, частыми трансфузиями от разных доноров.

*Снижение процента тиазолпозитивных тромбоцитов:*

1) на момент постановки диагноза — отражает угнетение мегакариоцитарного роста лейкозным клоном;

2) на 12–15-й дни (на фоне восстановления гранулоцитарного роста) — вследствие угнетения мегакариоцитарного роста резидуальным лейкозным клоном.

При тромбоцитопенической пурпуре:

Повышение процента ТО-позитивных тромбоцитов говорит о гиперпродукции тромбоцитов с гиперплазией мегакариоцитопоэза, характерно для иммунной формы.

Снижение процента ТО-позитивных тромбоцитов говорит об истинном угнетении мегакариоцитопоэза на уровне продукции тромбоцитов в костном море, характерно для амегакариоцитарных состояний.

Полученные нами результаты указывают, что определение количества тиазолпозитивных тромбоцитов обеспечивает быстроедействующую и надежную информацию относительно адекватности тромбоцитопоэза при тромбоцитопенических состояниях. Проточная флуоресценциметрия популяции тромбоцитов после их окрашивания ТО может быть полезна в идентификации преобладающего механизма тромбоцитопении (угнетения образования тромбоцитов или повышенного разрушения), особенно в тех клинических случаях, когда требуется принятие быстрого решения относительно терапевтических мероприятий.

Основными примерами такой дифференциально-диагностической ценности могут быть ранняя диагностика генеза длительной или рефракторной тромбоцитопении на фоне выхода их постцитостатической панцитопении, дифдиагностика амегакариоцитарных и иммунных форм тромбоцитопении для решения вопроса о дальнейшей тактике (назначение кортикостероидных препаратов, иммуносупрессантов, спленэктомия, тромбopoэтин). Преимущества этого чувствительного и специфического метода для клинического использования в простоте и быстроте получения результатов без причинения дискомфорта пациентам.

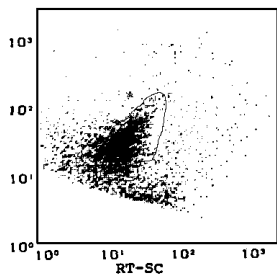


Рис. 1. Выделение гейта популяции тромбоцитов

	[RT-SC]			[FW-SC]		
	Mean	SD	CV%	Mean	SD	CV%
Total	77.8	35.4	45.5	100.0	23.8	23.8
Gate A	87.0	14.4	16.6	106.6	17.8	16.7

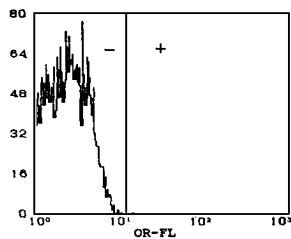
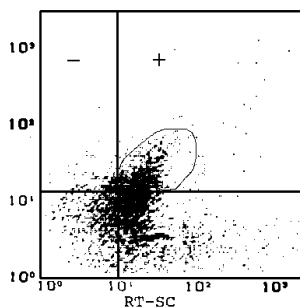


Рис. 2. Контроль — 0% TO-позитвных тромбоцитов в пробе

-FL ]	Positive%	Count	Mean ch	SD	CV(%)
-	100.0	4,999	19.9	20.7	104.0
+	0.0	1	117.0	0.0	0.0

REG[-]: 0 - 90 ch / REG[+]: 90 - 255 ch



REG -+	174	2.0 %
REG ++	876	10.1 %
REG --	2,168	24.9 %
REG +-	5,478	63.0 %

RT-SC : 73.1 % 6,354 cells  
 OR-FL : 12.1 % 1,050 cells

Рис. 3. Расширение пула TO-позитвных тромбоцитов (light-scatter)

REG	[RT-SC]			[OR-FL]		
	MEAN	SD	CV%	MEAN	SD	CV%
--	32.0	25.0	78.1	51.6	26.6	51.6
+-	31.2	24.8	79.5	102.0	9.8	9.6
++	95.2	25.4	26.7	51.2	29.4	57.4
++	101.0	21.6	21.4	105.2	14.0	13.3

LY:[0, 46] UX:[ 32,127] RY:[127, 46] LX:[ 32,0] CP:[ 32, 46]

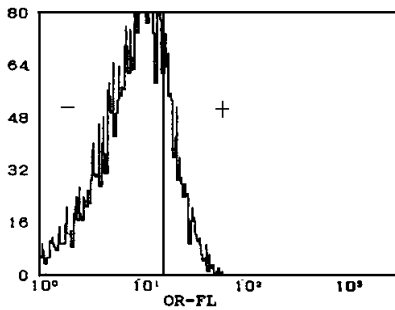
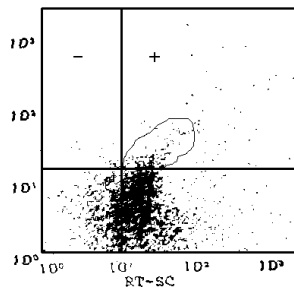


Рис. 4. Расширение пула ТО-позитвных тромбоцитов (гистограмма)

[OR-FL ]	Positive%	Count	Mean_ch	SD	CV(%)
-	80.3	4,014	58.7	24.6	41.9
+	20.9	1,047	100.9	9.7	9.6

REG[-]: 0 - 90 ch / REG[+]: 90 - 255 ch



REG -+	REG ++
30	343
0.3 %	3.9 %
REG --	REG +-
1,871	6,502
21.4 %	74.4 %

RT-SC : 78.3 % 6,845 cells  
OR-FL : 4.2 % 373 cells

Рис. 5. Сужение пула ТО-позитвных тромбоцитов при угнетении мегакариопоэза (light-scatter профиль)

REG	MEAN	[RT-SC SD]	CV%	MEAN	[OR-FL SD]	CV%
--	32.2	25.0	77.6	37.4	26.4	70.6
-+	28.6	22.6	79.0	101.2	7.8	7.7
+-	96.4	22.2	23.0	40.4	27.8	68.8
++	115.4	34.4	29.8	109.2	22.2	21.2

LY:[0, 46] UX:[ 32,127] RP:[127, 46] LX:[ 32,0] CP:[ 32, 46]

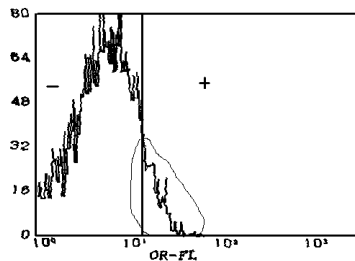


Рис. 6. То же (гистограмма)

[OR-FL ]	Positive%	Count	Mean_ch	SD	CV(%)
-	93.4	4,669	46.4	26.1	56.3
+	7.3	364	98.4	8.0	8.1

REG[-]: 0 - 90 ch / REG[+]: 90 - 255 ch