



Оригинальная статья

Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови при сепсисе

Кошелев Р.В.¹ • Ватазин А.В.¹ • Зулькарнаев А.Б.¹ • Фаенко А.П.¹

Кошелев Руслан Викторович – канд. мед. наук, доцент курса клинической трансфузиологии при кафедре анестезиологии и реаниматологии факультета усовершенствования врачей, заместитель главного врача по консультативно-диагностической работе¹

✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–1, Российская Федерация.
Тел.: +7 (916) 572 28 88.
E-mail: koshelevrv@yandex.ru

Ватазин Андрей Владимирович – д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела трансплантологии, нефрологии и хирургической гемокоррекции¹

Зулькарнаев Алексей

Батыргараевич – д-р мед. наук, гл. науч. сотр. хирургического отделения трансплантологии и диализа¹

Фаенко Александр Павлович –

ассистент курса клинической трансфузиологии при кафедре анестезиологии и реаниматологии факультета усовершенствования врачей¹

Актуальность. Сепсис – тяжелое жизнеугрожающее состояние, характеризующееся комплексным нарушением функции внутренних органов и систем, в частности, дисрегуляцией тромбоцитарного и коагуляционного звеньев системы гемостаза. **Цель** – оценить характер нарушений морфофункционального состояния тромбоцитов при развитии сепсиса и синдрома полиорганной недостаточности с использованием когерентной интерференционной микроскопии. **Материал и методы.** В одноцентровое проспективное наблюдательное исследование было включено 78 пациентов, поступивших в стационар с абдоминальным сепсисом, у 40 из них диагностировано развитие синдрома полиорганной недостаточности. Причинами сепсиса у 55 больных был перитонит различной этиологии, у 23 – панкреонекроз в стадии гнойно-септических осложнений. В качестве контрольной группы были привлечены 25 соматически здоровых человек. Для витальной оценки морфофункционального состояния тромбоцитов использовали когерентную интерференционную микроскопию, параллельно анализировали результаты рутинной коагулограммы и агрегатограммы. **Результаты.** В группе больных с сепсисом ($n=38$) по сравнению с контролем выявлено повышение уровня фибриногена ($4,5 \pm 1$ г/л, $p=0,0001$) на фоне незначительной тромбоцитопении ($238 \pm 12 \times 10^9$ /л, $p=0,0001$). Агрегационная активность тромбоцитов была также повышена ($48 \pm 3\%$, $p=0,0001$). Исследование популяции циркулирующих тромбоцитов методом когерентной интерференционной микроскопии показало прогрессирующее увеличение средних в популяции морфоденситометрических параметров клеток: диаметра ($p=0,0002$), периметра ($p<0,0001$) и площади ($p=0,0002$), снижение средних значений фазовой высоты ($p=0,0002$) и объема ($p=0,0002$). Отмечено увеличение доли активированных клеток до 41% (против 33% у здоровых людей) и дегенеративно измененных до 8%. При развитии тяжелой формы сепсиса, осложненной полиорганной недостаточностью, у больных ($n=40$) по сравнению со здоровым

контролем происходило истощение компенсаторных механизмов и развитие коагулопатии потребления: удлинение активированного частичного тромбопластинового времени до 57 ± 2 с ($p=0,0001$), увеличение протромбинового индекса до 117 ± 4 ($p=0,0025$), уменьшение уровня фибриногена до $1,6 \pm 2$ г/л ($p=0,0001$) и тромбоцитов до $110 \pm 9 \times 10^9$ /л ($p=0,0001$), снижение их агрегационной способности до $24 \pm 3\%$ ($p=0,0001$). По данным когерентной фазовой микроскопии характер изменения морфоденситометрических параметров был аналогичным таковому в основной группе, но более выраженным. Доля активированных клеток составила 43%, доля дегенеративно измененных и функционально неполноценных тромбоцитов – 15%. Установлены статистически значимые корреляции между морфоденситометрическими показателями тромбоцитов и основными параметрами агрегатограмм при использовании в качестве индукторов адезин дифосфата и коллагена. **Заключение.** На фоне развития сепсиса происходят выраженные изменения морфофункциональной картины тромбоцитов периферической крови, которые прогрессируют по мере отягощения состояния. Метод когерентной интерференционной микроскопии позволяет в режиме реального времени оценить морфологические особенности и функциональное состояние циркулирующих тромбоцитов. Для валидации результатов применения этого метода необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: сепсис, полиорганная недостаточность, морфометрия тромбоцитов, когерентная интерференционная микроскопия

Для цитирования: Кошелев РВ, Ватазин АВ, Зулькарнаев АБ, Фаенко АП. Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови при сепсисе. Альманах клинической медицины. 2018;46(7):672–81. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-672-681.

Поступила 31.07.2018;
принята к публикации 22.11.2018

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация



Сепсис – тяжелое генерализованное заболевание, характеризующееся комплексными нарушениями множества звеньев гомеостаза: иммунного, эндокринного, метаболического, а также системы свертывания крови [1]. Прогрессирование дисфункции органов, вызванной дисрегулируемым ответом хозяина на инфекцию [2], приводит к формированию полиорганной недостаточности, которая становится наиболее частой причиной летальных исходов заболевания.

Важную роль в развитии сепсиса играет дисфункция микрососудистого русла, отягощающая метаболические нарушения в организме и инициирующая активацию клеточного и плазменного звеньев гемостаза [2]. Ключевым агентом как нормального, так и патологического тромбоцитического процесса считаются тромбоциты. Помимо этого, они принимают участие в развитии ряда иммунных реакций [3]. Активация тромбоцитов через Toll-подобные рецепторы мембраны приводит к высвобождению хемокинов, которые привлекают лейкоциты в очаг воспаления [4]. Установлено, что бактерии могут взаимодействовать с различными рецепторами тромбоцитов (GPIb, GPIIb-GPIIIa, рецепторы компонентов комплемента), способствуя их активации, адгезии и агрегации [5]. Недавние исследования показали способность самих тромбоцитов разрушать некоторые микроорганизмы (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis* и др.), опсонизированные иммуноглобулинами G при их интернализации через рецептор FcγRII [6, 7]. Данные механизмы являются адаптивными и имеют протективный характер в условиях локализованной инфекции, но становятся дисрегулируемыми и деструктивными при развитии сепсиса, способствуя развитию полиорганной недостаточности [8].

Тромбоцитопению, возникающую в результате активации и потребления тромбоцитов у пациентов с сепсисом, рассматривают в качестве отрицательного прогностического признака [9, 10]. Очевидно, что при сепсисе тромбоциты подвержены значительным количественным и качественным изменениям. Это может иметь важное патофизиологическое значение и позволяет рассматривать тромбоциты в качестве информативных биомаркеров тяжести состояния пациентов и эффективности терапии [11].

Однако главной проблемой в реализации такого подхода можно считать недостаток простых и оперативных методов оценки функции тромбоцитов в клинической практике.

Витальная когерентная интерференционная микроскопия – новый метод клеточной диагностики на основе лазерной голографии, который позволяет в режиме реального времени проводить количественный анализ исследуемых цитобъектов [12]. Опыт применения данного метода в клинической практике еще недостаточно широк. Вместе с тем метод представляется привлекательным для специалистов благодаря таким преимуществам, как возможность неинвазивного изучения состояния живых функционирующих клеток, отсутствие сложной пробоподготовки, оперативность получения данных, высокая разрешающая способность, точность регистрации анализируемых показателей и др.

Цель настоящей работы – оценить характер нарушений морфофункционального состояния тромбоцитов при развитии сепсиса и синдрома полиорганной недостаточности с использованием когерентной интерференционной микроскопии.

Материал и методы

Проведено одноцентровое проспективное наблюдательное исследование, в которое было включено 78 пациентов с сепсисом, находившихся на лечении в различных отделениях ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в 2014–2016 гг. Причины сепсиса: у 55 больных развился перитонит различной этиологии, у 23 больных был панкреонекроз в стадии гнойно-септических осложнений. Причины перитонита: у 16 пациентов – язва желудка или двенадцатиперстной кишки, у 14 – перфорация дивертикула толстого кишечника, у 9 – аппендицит, у 9 – травма живота, у 5 – осложнения плановых операций и у 2 – акушерско-гинекологическая патология. Все больные были переведены из стационаров Московской области в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Медиана возраста больных составила 45 лет, интерквартильный размах – от 34 до 55 лет, минимум – 23, максимум – 73 года.

В этой работе мы использовали критерии сепсиса «Сепсис-2» [13] по двум причинам. Во-первых, часть больных была включена в исследование до появления классификации «Сепсис-3». Во-вторых, мы ставили своей целью проанализировать различия в морфофункциональном состоянии тромбоцитов при генерализованном бактериальном инфекционном процессе и при присоединении тяжелой полиорганной недостаточности.

В соответствии с критериями «Сепсис-2» пациенты были разделены на две группы: основную



группу составили 38 пациентов, у которых был диагностирован сепсис, группу сравнения – 40 пациентов с тяжелым сепсисом и развернутой картиной полиорганной недостаточности. В основной группе среднее количество баллов по шкале SOFA (Sepsis-related Organ Failure – шкала оценки органной недостаточности) составило $4,2 \pm 0,7$, по шкале APACHE II (Acute Physiological and Chronic Health Estimation II – шкала оценки острых и хронических функциональных изменений II) – $13,2 \pm 2,8$, в группе сравнения – $7,3 \pm 0,7$ и $21,4 \pm 3,8$ соответственно.

В качестве контрольной группы были привлечены 25 соматически здоровых человек, медиана возраста которых составила 35 лет, интерквартильный размах – от 31 до 51 года, минимум – 28, максимум – 62 года.

Протокол настоящего исследования был одобрен локальным этическим комитетом при ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (заседание № 5 от 12 мая 2014 г.) и утвержден заседанием ученого совета ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (заседание № 6 от 16 июня 2014 г.).

Для оценки морфологии и функциональной активности тромбоцитов использовали фазово-интерференционный микроскоп Цитоскан (МГИРЭА, Москва) с источником света лазером ($\lambda = 633$ нм) [14]. Взвесь, обогащенную тромбоцитами, помещали в камеру Горяева с зеркальным напылением на рабочей поверхности. После оседания клеток проводили съемку штатным 30-кратным микрообъективом с числовой апертурой 0,65 и увеличением в канале регистрации 500 \times . Определяли морфоденситометрические (геометрические – диаметр, периметр, площадь, а также оптические – высота (фазовая толщина) и объем) показатели отдельных тромбоцитов и всей анализируемой популяции в целом.

Оценивали структурно-морфологические особенности клеток (форму, рельеф поверхности, наличие псевдоподий), выделяя 4 морфологических типа живых тромбоцитов, характеризующих ту или иную степень их активации. К 1-му морфологическому типу (клетки покоя) относили плоские тромбоциты с гладкой или складчатой поверхностью без отростков. Ко 2-му типу – клетки округлой или неправильной формы, имеющие широкие отростки меньше диаметра клетки. Тромбоциты 3-го типа были представлены клетками неправильной формы с длинными тонкими отростками-спикулами больше диаметра клетки. Тромбоциты 2- и 3-го типов, характеризующиеся появлением отростков различного

числа и длины, а также изменением их формы, связанным с перестройкой цитоскелета и структуры грануломера, считались функционально активными. Тромбоциты неправильной формы с неровной бугристой поверхностью, большим количеством отростков различной длины и многочисленными вакуолями были отнесены к 4-му морфологическому типу – дегенеративно измененным клеткам, исчерпавшим свой функциональный потенциал [12, 15].

Агрегационную способность тромбоцитов изучали на анализаторе АЛАТ-2 (ООО НПФ «Биола»). В качестве активаторов использовали аденозина дифосфат (АДФ) и коллаген.

Исследование коагулограммы (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновый индекс (ПТИ), фибриноген и антитромбин III (АТ III)) проводили стандартными методами на автоматическом коагулометре ACL TOP 500 CTS.

Статистическую обработку данных проводили в программах SPSS v.24 и Statistica v.10. Соответствие распределения выборки нормальному оценивали при помощи критерия Шапиро – Уилка. Количественные данные представлены как среднее и стандартное отклонение ($M \pm SD$). Для сравнения трех клинических групп (здоровые, больные с сепсисом и тяжелым сепсисом) использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки, оценивали средние значения и 95% доверительный интервал. Для анализа связи между номинальными признаками применяли критерий χ^2 . При оценке корреляции использовали критерий Пирсона с расчетом коэффициентов корреляции и детерминации. Связь между двумя количественными показателями считали сильной при $r \geq 0,4$. Критическим уровнем значимости считали значения $p < 0,05$.

Результаты

Проведено сравнение основных рутинных показателей гемостаза у здоровых добровольцев, больных с сепсисом, развившимся в результате гнойно-септических осложнений заболеваний органов брюшной полости, и тяжелым сепсисом (сепсисом, осложненным синдромом полиорганной недостаточности) (рис. 1).

При развитии сепсиса зарегистрировано повышение уровня фибриногена до $4,5 \pm 1$ г/л ($p = 0,0001$), тенденция к снижению показателей АЧТВ и ПТИ, но различия с контролем не были статистически значимыми. В этой группе пациентов отмечена также активация

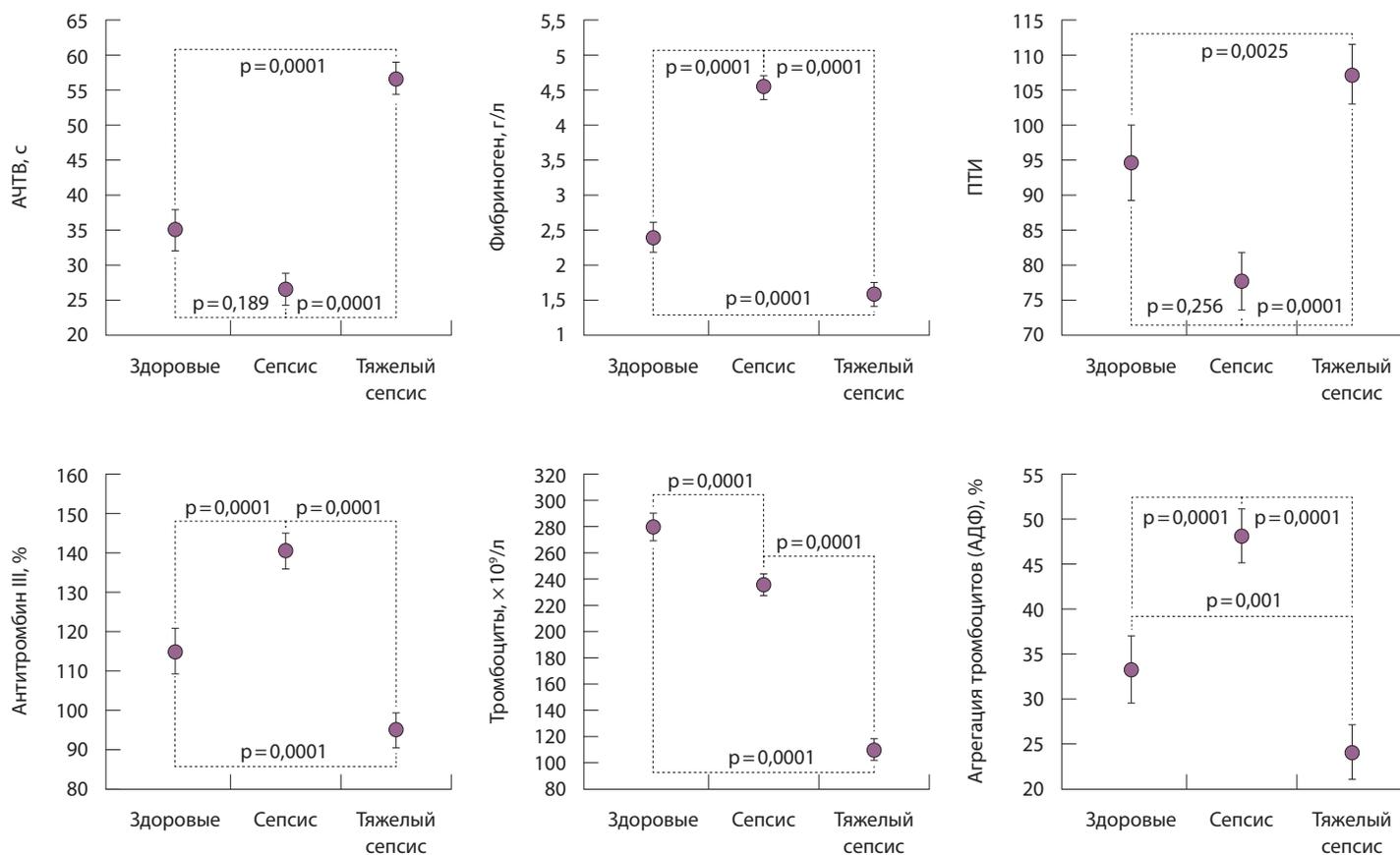


Рис. 1. Различия показателей тромбо-коагуляционного гемостаза (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), фибриноген, протромбиновый индекс (ПТИ), антитромбин III, количество тромбоцитов и их агрегационная активность с активатором аденозина дифосфатом (АДФ)) у здоровых людей (контроль), при сепсисе (основная группа) и тяжелом сепсисе (группа сравнения). Данные представлены в виде среднего и 95% доверительного интервала. Различия анализировали при помощи дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки

противосвертывающей системы, которая сопровождалась повышением содержания АТ III до $140 \pm 5\%$ ($p=0,0001$). Уровень тромбоцитов был незначительно снижен по сравнению со здоровыми добровольцами – до $238 \pm 12 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,0001$), оставаясь тем не менее в пределах нормальных значений; агрегационная активность тромбоцитов была повышена – $48 \pm 3\%$ ($p=0,0001$).

При развитии тяжелой формы сепсиса (с полиорганной недостаточностью) у больных по сравнению со здоровыми происходило истощение компенсаторных механизмов и развитие коагулопатии потребления: удлинение АЧТВ до 57 ± 2 с ($p=0,0001$), увеличение ПТИ до 117 ± 4 ($p=0,0025$), уменьшение уровня фибриногена до $1,6 \pm 2$ г/л ($p=0,0001$) и количества тромбоцитов до $110 \pm 9 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,0001$), значительное снижение их агрегационной способности – до $24 \pm 3\%$ ($p=0,0001$).

Мы детально проанализировали морфофункциональные свойства тромбоцитов у здоровых людей и больных с гнойно-септическими осложнениями на разных стадиях процесса методом когерентной интерференционной микроскопии (рис. 2).

У пациентов с сепсисом по мере усугубления тяжести состояния зарегистрировано прогрессирующее увеличение средних в популяции диаметра ($p=0,0002$), периметра ($p < 0,0001$) и площади ($p=0,0002$) клеток, снижение средних значений фазовой высоты ($p=0,0002$) и объема ($p=0,0002$).

При сепсисе происходит активация клеток с увеличением числа тромбоцитов, имеющих различные отростки, в результате чего возрастают и их размерные показатели: диаметр и периметр. При этом у больных с разными стадиями сепсиса увеличение диаметра и периметра клеток имеет свои особенности (рис. 3). Ясно, что при развитии

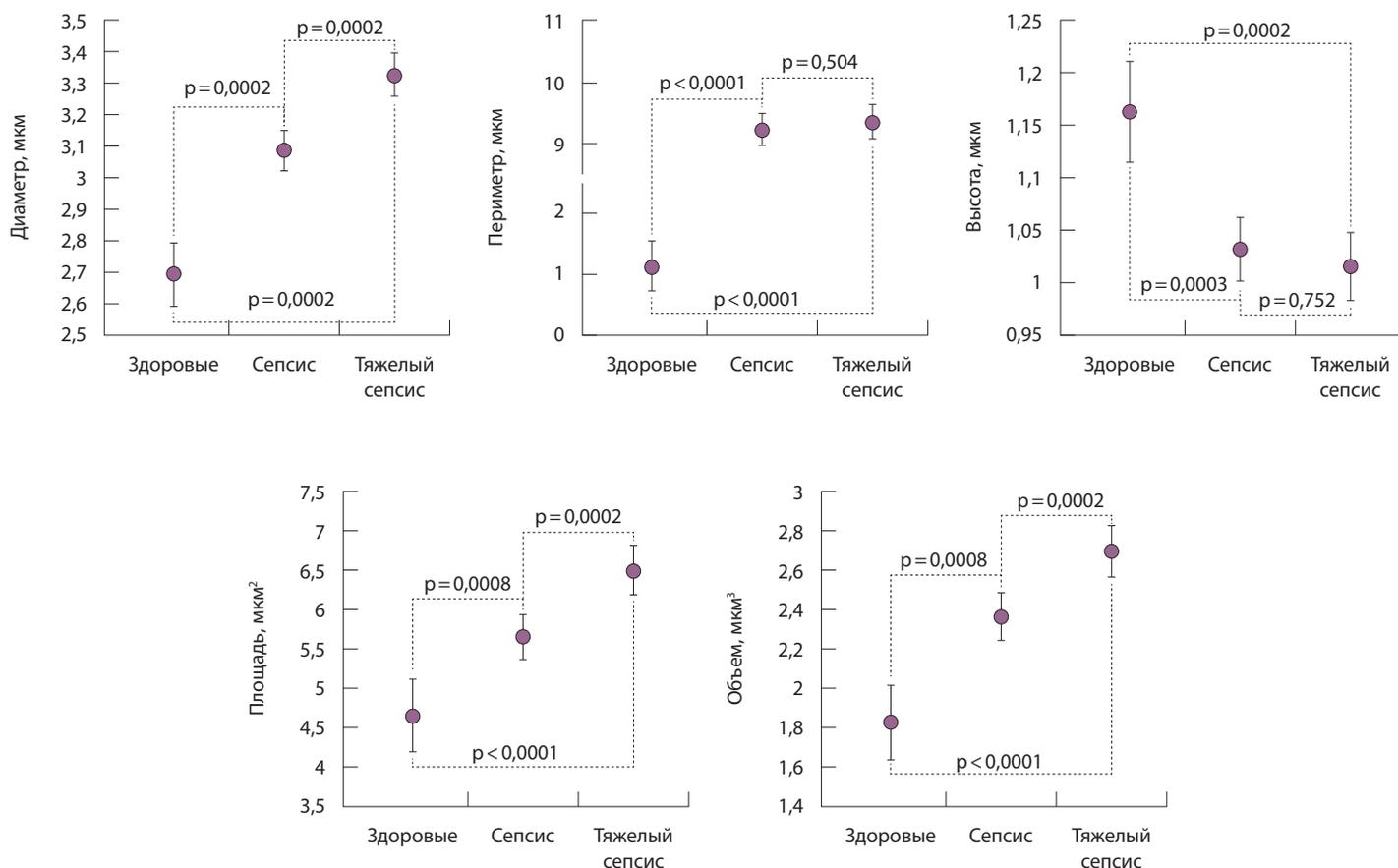


Рис. 2. Морфоденситометрические показатели тромбоцитов (диаметр, периметр, высота, площадь и объем) у здоровых людей (контроль), при сепсисе (основная группа) и тяжелом сепсисе (группа сравнения). Данные представлены в виде среднего и 95% доверительного интервала. Различия анализировали при помощи дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки

и прогрессировании сепсиса изменяется по сравнению с контролем характер зависимости этих показателей тромбоцитов. Так, у соматически здоровых людей мы отметили слабую отрицательную корреляцию величин диаметра и периметра циркулирующих тромбоцитов. У больных сепсисом диаметр и периметр увеличивались пропорционально, о чем свидетельствовала сильная положительная корреляция. При прогрессировании септического процесса с присоединением полиорганной недостаточности зависимость изменения величин диаметра и периметра была в целом аналогичной, с той лишь разницей, что увеличивалась вариабельность данных, и у некоторых пациентов было отмечено появление фракции тромбоцитов с отсутствием какой-либо связи между изменением величин их диаметра и периметра. Как было установлено, эти клетки были представлены тромбоцитами 4-го типа.

Анализ морфологических особенностей тромбоцитов показал, что у относительно здоровых людей 63% тромбоцитов представлены клетками без признаков функциональной активности – покоящимися клетками (1-й морфологический тип). На долю клеток с признаками активности приходится не более 33%, из них 21% – клетки с низкой степенью активности (2-й тип) и 12% – активированные клетки (3-й тип) (рис. 4).

При развитии генерализованного инфекционного процесса происходит снижение тромбоцитов покоя с 63 до 51%, процент активированных клеток увеличивается до 41, из них 25% – клетки 2-го типа и 16% – клетки 3-го типа. При этом вдвое (с 4 до 8%) увеличивается доля дегенеративно измененных клеток (4-го типа). Таким образом, выявленные морфофункциональные изменения связаны с активацией тромбоцитарного звена гемостаза, что проявляется гиперкоагуляцией.



У больных с тяжелым сепсисом содержание тромбоцитов 1-го типа было снижено до 42%. Доля активированных клеток осталась примерно на прежнем уровне – 43% (против 41% у больных с сепсисом). При этом большую часть составили клетки 2-го типа с низкой степенью активности (31%). В 2 раза по сравнению с больными без полиорганной недостаточности (и в 4 раза по сравнению со здоровыми людьми) увеличилась доля дегенеративно измененных клеток (4-го типа).

Мы оценили информативность метода когерентной интерференционной микроскопии тромбоцитов путем сопоставления структурно-морфологических и морфоденситометрических показателей тромбоцитов с основными стандартными параметрами агрегатограммы: амплитудой ($A_{\text{макс}}$), углом наклона кривой агрегации ($\alpha_{\text{макс}}$), радиусом агрегатов ($R_{\text{макс}}$) и скоростью образования агрегата ($C_{\text{макс}}$) (рис. 5). Установлены статистически значимые корреляционные связи между анализируемыми показателями. Так, для форм покоя (1-й тип) выявлено наличие сильной обратной связи с величиной угла наклона амплитуды агрегатограммы при использовании в качестве индуктора АДФ ($r = 0,75, p = 0,0001$).

Увеличение процента клеток 2-го типа имеет слабую прямую связь с амплитудой агрегатограммы ($r = 0,39, p = 0,089$) и сильную прямую связь с величиной угла ее наклона ($r = 0,66, p = 0,0015$) при использовании в качестве индуктора АДФ.

Повышение доли тромбоцитов 3-го типа имеет слабую прямую связь с углом наклона амплитуды агрегатограммы при использовании в качестве индуктора АДФ ($r = 0,41, p = 0,0725$).

Для дегенеративно измененных форм тромбоцитов выявлена сильная отрицательная связь с амплитудой, углом наклона агрегатограммы и радиусом агрегатов при спонтанной агрегации: $r = -0,51, p = 0,022$; $r = -0,53, p = 0,016$; $r = -0,47, p = 0,036$ соответственно; амплитудой и углом наклона агрегатограммы, радиусом агрегатов и скоростью образования агрегата при использовании в качестве индуктора коллагена: $r = -0,6, p = 0,005$; $r = -0,62, p = 0,003$; $r = -0,57, p = 0,009$; $r = -0,54, p = 0,014$ соответственно; а также слабую обратную связь с амплитудой агрегатограммы и величиной угла ее наклона при использовании в качестве индуктора АДФ: $r = -0,33, p = 0,15$; $r = -0,38, p = 0,098$ соответственно.

Нами также обнаружены корреляции средних морфоденситометрических показателей тромбоцитов с некоторыми параметрами агрегатограммы. Увеличение среднего диаметра тромбоцитов

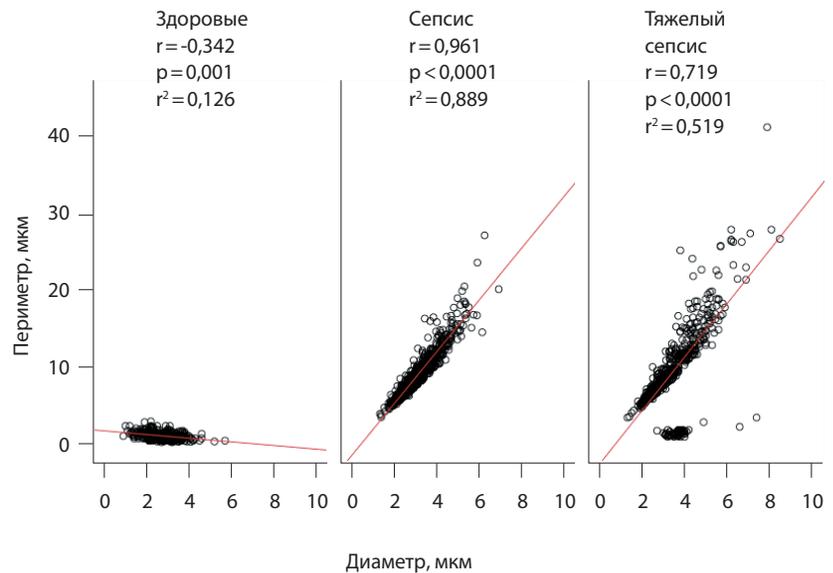


Рис. 3. Зависимость периметра и диаметра тромбоцитов у здоровых людей (контроль), при сепсисе (основная группа) и тяжелом сепсисе (группа сравнения). Анализ проводили при помощи коэффициента корреляции Пирсона (r), также вычисляли коэффициент детерминации (r^2)

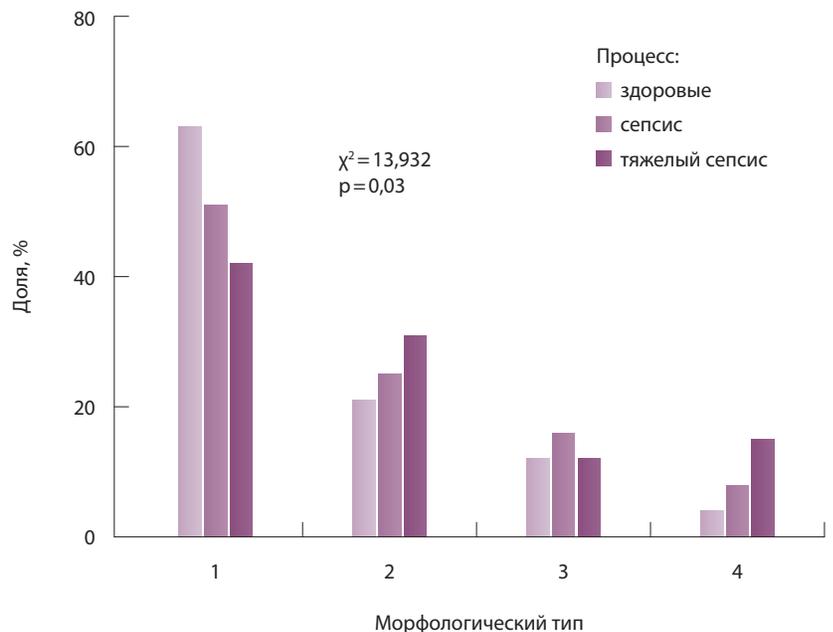


Рис. 4. Распределение циркулирующих тромбоцитов по морфологическим типам у здоровых людей (контроль), при сепсисе (основная группа) и тяжелом сепсисе (группа сравнения). Различия между группами оценивали при помощи критерия χ^2

имело слабую прямую связь с углом наклона кривой агрегатограммы, а также при спонтанной агрегации: $r = 0,32, p = 0,169$; $r = 0,36, p = 0,119$ соответственно, а увеличение периметра – с углом

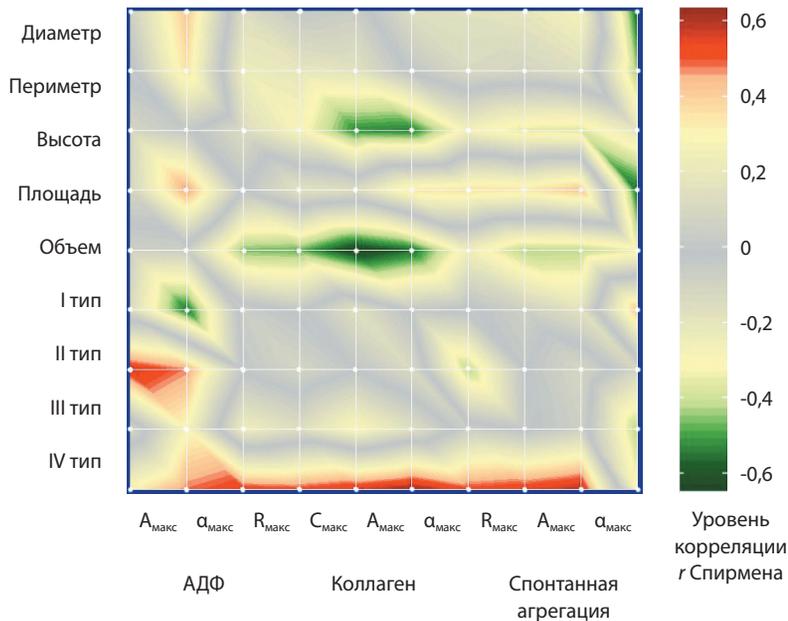


Рис. 5. Результаты корреляционного анализа показателей морфоденситометрии (средние в популяции значения диаметра, периметра, высоты, площади и объема тромбоцитов; процентное содержание тромбоцитов 1, 2, 3, 4-го морфологических типов) и агрегатограммы (амплитуда ($A_{\text{макс}}$), угол наклона кривой агрегации ($\alpha_{\text{макс}}$), радиус агрегатов ($R_{\text{макс}}$) и скорость образования агрегата ($C_{\text{макс}}$)) при спонтанной агрегации и агрегации тромбоцитов с аденозина дифосфатом (АДФ) и коллагеном

наклона ($r=0,39$, $p=0,089$) при использовании в качестве индуктора АДФ.

Установлены отрицательные корреляции величины фазовой высоты тромбоцитов с параметрами агрегатограммы при использовании в качестве индуктора коллагена: амплитудой, углом наклона кривой и скоростью образования агрегата ($r=-0,49$, $p=0,028$; $r=-0,52$, $p=0,019$; $r=-0,3$, $p=0,198$ соответственно).

При спонтанной агрегации показатель фазовой высоты тромбоцитов имел слабую обратную связь с амплитудой и углом наклона агрегатограммы, а также максимальным радиусом агрегатов: $r=-0,3$, $p=0,198$; $r=-0,33$, $p=0,155$; $r=-0,32$, $p=0,169$ соответственно.

Площадь и объем характеризовались разной направленностью корреляционных связей. Так, площадь клеток имела слабую прямую связь с углом наклона агрегатограмм при индукции АДФ и коллагеном: $r=0,34$, $p=0,142$; $r=0,36$, $p=0,119$ соответственно, а также с амплитудой, углом наклона кривой и радиусом агрегатов при спонтанной агрегации: $r=0,38$, $p=0,098$; $r=0,04$, $p=0,08$; $r=0,39$, $p=0,089$ соответственно.

Вместе с тем объем клеток был отрицательно связан с амплитудой и углом наклона кривой ($r=-0,61$, $p=0,004$; $r=-0,58$, $p=0,007$

соответственно), имел слабую отрицательную связь с радиусом агрегатов и временем агрегации при индукции коллагеном ($r=-0,38$, $p=0,098$; $r=-0,42$, $p=0,065$ соответственно), а также имел слабую отрицательную связь с амплитудой, углом наклона кривой и радиусом агрегации при спонтанной реакции: $r=-0,4$, $p=0,08$; $r=-0,33$, $p=0,155$; $r=-0,37$, $p=0,108$ соответственно.

Обсуждение

Нарушения в системе гемостаза, в частности синдром диссеминированной внутрисосудистой свертываемости (ДВС), имеют тесную связь с патогенезом сепсиса и системной воспалительной реакцией. Воспалительные медиаторы и бактериальные токсины не только инициируют каскад коагуляционных реакций, но и активируют фибринолитическую систему [4, 8]. Тем не менее у большинства больных с сепсисом, неотягощенным полиорганной недостаточностью, на фоне умеренного снижения количества тромбоцитов показатели АЧТВ и ПТИ находятся в пределах нормальных значений при значительном увеличении агрегационной способности тромбоцитов.

У обследованных нами больных с сепсисом на момент поступления в стационар изменения рутинных показателей гемостаза соответствовали увеличению потенциала свертывания крови за счет плазменного звена по внешнему пути: отмечено повышение уровня фибриногена по сравнению со здоровыми добровольцами. Активация свертывающей системы сопровождалась ответной активацией противосвертывающей системы, мы зарегистрировали повышения содержания АТIII.

При развитии полиорганной недостаточности у больных происходило прогрессирование синдрома ДВС – истощение компенсаторных механизмов и развитие коагулопатии потребления: удлинение АЧТВ, увеличение ПТИ; уменьшение уровня фибриногена и тромбоцитов, значительное снижение их агрегационной способности. Эти результаты полностью согласуются с данными отечественных и зарубежных исследователей, свидетельствующих о характере нарушений свертывающей и противосвертывающей систем, которые приводят к одному из поздних осложнений сепсиса – развитию ДВС-синдрома [5–7].

Будучи ключевым компонентом системы гемостаза, тромбоциты периферической крови участвуют в формировании первичного тромбоцитарного агрегата, а также стимулируют реакции плазменного свертывания.



У обследованных пациентов с сепсисом содержание тромбоцитов было несколько снижено по сравнению со здоровыми людьми, но тем не менее оставалось в пределах нормальных значений, агрегационная активность тромбоцитов была повышена.

Структурно-морфологические изменения этих клеток косвенно отражают их функциональное состояние: изменение формы при активации, образование филоподий, прикрепление к стенке сосуда (адгезия), скрепление с другими тромбоцитами (агрегация), секреция различного специфических гранул, появление прокоагулянтной активности. В этой связи совершенно очевидно, насколько важно оценивать не только количественные показатели, но и качественный состав клеточной популяции тромбоцитов. Эта возможность может быть реализована в рамках одного метода – когерентной интерференционной микроскопии.

Ранее было установлено, что у здоровых людей подавляющее число циркулирующих в русле тромбоцитов представлено клетками с низкой функциональной активностью, о чем говорит умеренная вариабельность параметра «диаметр» при выраженной однородности параметра «периметр» как следствие отсутствия отростков [15].

При септическом процессе в результате активации клеток диаметр и периметр тромбоцитов увеличиваются за счет перестройки цитоскелета и появления отростков. Отмечается очень сильная связь среднего диаметра клетки и ее периметра. При развитии полиорганной недостаточности сохраняются характерные для сепсиса изменения, однако появляется группа больших клеток с низкой вариабельностью показателя «периметр».

Проведенная нами морфоденситометрия тромбоцитов продемонстрировала неоднородность популяционного состава тромбоцитов периферической крови. При этом у больных с тяжелым сепсисом гетерогенность популяции оказалась выше, чем при неосложненном. Поскольку оптические характеристики клеток зависят от

состояния их внутриклеточной среды, можно заключить, что на фоне высокого уровня секреторной активности тромбоцитов при сепсисе, при дальнейшем тяжелом течении генерализованного инфекционного процесса, происходит истощение функционального потенциала клеток, опустошение гранул и увеличение доли дегенеративно измененных клеток. Как следствие, у больных с полиорганной недостаточностью развивается характерная клиническая картина тяжелого проявления синдрома ДВС.

Полученные нами результаты указывают на то, что морфоденситометрические параметры циркулирующих тромбоцитов не только обладают значительным потенциалом в диагностике синдрома ДВС, но и могут выявить опасные тенденции на ранних стадиях патологического процесса. Высокая информативность морфоденситометрических показателей для оценки нарушений гемостаза у септических больных подтверждается наличием четких корреляций с показателями рутинной агрегатограммы как одного из основополагающих методов диагностики функции тромбоцитов.

Заключение

Нарушения в системе гемостаза при сепсисе и развивающийся на этом фоне синдром ДВС – неотъемлемый компонент полиорганной недостаточности, связанный с повреждением микрососудистого русла, нарушением тканевого метаболизма и прогрессированием гипоксии. При этом наблюдаются изменения морфофункциональной картины тромбоцитарного звена, которые прогрессируют по мере отягощения состояния пациента.

Когерентная интерференционная микроскопия в режиме реального времени позволяет оперативно оценить выраженность нарушений структурно-функционального состояния тромбоцитов периферической крови при сепсисе. Метод информативен, точен и прост в реализации. Однако для валидации результатов, полученных при использовании этого метода, необходимы дальнейшие исследования. ©

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Литература

1. Tsalik EL, Jagers LB, Glickman SW, Langley RJ, van Velkinburgh JC, Park LP, Fowler VG, Cairns CB, Kingsmore SF, Woods CW. Discriminative value of inflammatory biomarkers for suspected sepsis. *J Emerg Med.* 2012;43(1):97–106. doi: 10.1016/j.jemermed.2011.05.072.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).



- JAMA. 2016;315(8):801–10. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
3. Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Cavaillon JM, Cognasse F. Bench-to-bedside review: Platelets and active immune functions – new clues for immunopathology? *Crit Care*. 2013;17(4):236. doi: 10.1186/cc12716.
4. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1): 5–30. doi: 10.1007/s00281-011-0286-4.
5. Серебряная НБ, Якуцени ПП, Клишко НН. Роль тромбоцитов в патогенезе бактериальных инфекций. *Журнал инфектологии*. 2017;9(4): 5–13. doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-4-5-13.
6. Worth RG, Chien CD, Chien P, Reilly MP, McKenzie SE, Schreiber AD. Platelet FcγRIIIa binds and internalizes IgG-containing complexes. *Exp Hematol*. 2006;34(11):1490–5. doi: 10.1016/j.exphem.2006.06.015.
7. Antczak AJ, Vieth JA, Singh N, Worth RG. Internalization of IgG-coated targets results in activation and secretion of soluble CD40 ligand and RANTES by human platelets. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(2):210–6. doi: 10.1128/0140-6895-01802-210-6.
8. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*. 2014;5(1):66–72. doi: 10.4161/viru.26907.
9. Thiery-Antier N, Binquet C, Vinault S, Meziani F, Boissramé-Helms J, Quenot JP; Epidemiology of Septic Shock Group. Is Thrombocytopenia an Early Prognostic Marker in Septic Shock? *Crit Care Med*. 2016;44(4):764–72. doi: 10.1097/CCM.0000000000001520.
10. Claushuis TA, van Vught LA, Scicluna BP, Wiewel MA, Klein Klouwenberg PM, Hoogendijk AJ, Ong DS, Cremer OL, Horn J, Franitza M, Toliat MR, Nürnberg P, Zwinderman AH, Bonten MJ, Schultz MJ, van der Poll T; Molecular Diagnosis and Risk Stratification of Sepsis Consortium. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients. *Blood*. 2016;127(24):3062–72. doi: 10.1182/blood-2015-11-680744.
11. de Stoppelaar SF, van 't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost*. 2014;112(4):666–77. doi: 10.1160/TH14-02-0126.
12. Василенко ИА, Валов АЛ, Ватазин АВ, Нестеренко ИВ, Круглов ЕЕ. Некоторые особенности морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови доноров и реципиентов почечного аллотрансплантата. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2009;11(4):69–74. doi: 10.15825/1995-1191-2009-4-69-74.
13. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003;29(4):530–8. doi: 10.1007/s00134-003-1662-x.
14. Василенко ИА, Кардашова ЗЗ, Тычинский ВП, Вишенская ТВ, Лифенко РА, Валов АЛ, Иванюта ИВ, Агаджанян БЯ. Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии. *Вестник последипломного медицинского образования*. 2009;(3–4):64–8.
15. Власова ЕА, Василенко ИА, Суслов ВП, Пашкин ИН. Динамика морфометрических показателей тромбоцитов периферической крови как критерий оценки тромбогенности диализных мембран. *Урология*. 2011;(2): 36–41.
- ## References
1. Tsalik EL, Jagers LB, Glickman SW, Langley RJ, van Velkinburgh JC, Park LP, Fowler VG, Cairns CB, Kingsmore SF, Woods CW. Discriminative value of inflammatory biomarkers for suspected sepsis. *J Emerg Med*. 2012;43(1):97–106. doi: 10.1016/j.jemermed.2011.05.072.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–10. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
3. Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Cavaillon JM, Cognasse F. Bench-to-bedside review: Platelets and active immune functions – new clues for immunopathology? *Crit Care*. 2013;17(4):236. doi: 10.1186/cc12716.
4. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1): 5–30. doi: 10.1007/s00281-011-0286-4.
5. Serebryannaya NB, Yakutseni PP, Klimko NN. The role of platelets in the pathogenesis of bacterial infections. *Journal Infectology*. 2017;9(4):5–13. Russian. doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-4-5-13.
6. Worth RG, Chien CD, Chien P, Reilly MP, McKenzie SE, Schreiber AD. Platelet FcγRIIIa binds and internalizes IgG-containing complexes. *Exp Hematol*. 2006;34(11): 1490–5. doi: 10.1016/j.exphem.2006.06.015.
7. Antczak AJ, Vieth JA, Singh N, Worth RG. Internalization of IgG-coated targets results in activation and secretion of soluble CD40 ligand and RANTES by human platelets. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(2):210–6. doi: 10.1128/0140-6895-01802-210-6.
8. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*. 2014;5(1):66–72. doi: 10.4161/viru.26907.
9. Thiery-Antier N, Binquet C, Vinault S, Meziani F, Boissramé-Helms J, Quenot JP; Epidemiology of Septic Shock Group. Is Thrombocytopenia an Early Prognostic Marker in Septic Shock? *Crit Care Med*. 2016;44(4):764–72. doi: 10.1097/CCM.0000000000001520.
10. Claushuis TA, van Vught LA, Scicluna BP, Wiewel MA, Klein Klouwenberg PM, Hoogendijk AJ, Ong DS, Cremer OL, Horn J, Franitza M, Toliat MR, Nürnberg P, Zwinderman AH, Bonten MJ, Schultz MJ, van der Poll T; Molecular Diagnosis and Risk Stratification of Sepsis Consortium. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients. *Blood*. 2016;127(24):3062–72. doi: 10.1182/blood-2015-11-680744.
11. de Stoppelaar SF, van 't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost*. 2014;112(4):666–77. doi: 10.1160/TH14-02-0126.
12. Vasilenko IA, Valov AL, Vatazin AV, Nesterenko IV, Kруглов ЕЕ. Some features of morphofunctional status of peripheral blood platelets in donors and recipients of renal allograft. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2009;11(4):69–74. Russian. doi: 10.15825/1995-1191-2009-4-69-74.
13. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003;29(4):530–8. doi: 10.1007/s00134-003-1662-x.
14. Vasilenko IA, Kardashova ZZ, Tychinskiy VP, Vishenskaya TV, Lifenko RA, Valov AL, Ivanyuta IV, Agadzhanian BYa. Cell diagnostics: the potential of vital computer phase microscopy. *Journal of Postgraduate Medical Education*. 2009;(3–4):64–8. Russian.
15. Vlasova EA, Vasilenko IA, Suslov VP, Pashkin IN. Dynamics of morphometric parameters of peripheral blood platelets as a criterion in assessing thrombogenicity of dialysis membranes. *Urologiia*. 2011;(2):36–41. Russian.



Evaluation of the morphofunctional state of peripheral blood platelets in sepsis

R.V. Koshelev¹ • A.V. Vatazin¹ • A.B. Zulkarnayev¹ • A.P. Faenko¹

Background: Sepsis is a severe life-threatening condition characterized by combined dysfunction of the inner organs and systems and by dysregulation of the platelet and coagulation compartments of hemostasis, in particular. **Aim:** To assess the character of abnormalities in morphofunctional state of platelets in the pathophysiology of sepsis and the multiple organ failure syndrome by means of coherent interference microscopy. **Materials and methods:** This single center, prospective, observational study included 78 hospitalized patients with abdominal sepsis; in 40 of them, the syndrome of multiple organ failure was diagnosed. The causes of sepsis were peritonitis of various etiologies in 55 patients, acute necrotic pancreatitis with suppurative and septic complications in 23. The control group included 25 physically healthy subjects. Coherent interference microscopy was used for vital assessment of the platelet morphofunctional state, with simultaneous analysis of routine coagulogram and platelet aggregation parameters. **Results:** The group of patients with sepsis ($n=38$) had higher fibrinogen levels, compared to that in the control (4.5 ± 1 g/L, $p=0.0001$), with mild thrombocytopenia ($238 \pm 12 \times 10^9/L$, $p=0.0001$). Platelet aggregation was also increased ($48 \pm 3\%$, $p=0.0001$). Assessment of circulating platelets by coherent interference microscopy showed a progressive increase of the mean populational morphodensitometrical parameters, such as the diameter ($p=0.0002$), perimeter ($p<0.0001$), and area ($p=0.0002$), as well as a decrease in mean values of the phase height ($p=0.0002$) and volume ($p=0.0002$). There was an increase in the proportion of activated cells to 41% (vs. 33% in healthy control) and the proportion of degenerative cells up to 8%. The patients with severe sepsis complicated by multiple organ failure ($n=40$), compared

to the control ones, demonstrated exhausted of compensatory mechanisms with the development of consumption coagulopathy: prolonged activated partial thromboplastin time (57 ± 2 s, $p=0.0001$), increased prothrombin index (117 ± 4 , $p=0.0025$), decreased fibrinogen level (1.6 ± 2 g/L, $p=0.0001$) and platelet counts ($110 \pm 9 \times 10^9/L$, $p=0.0001$), and their lower aggregation ($24 \pm 3\%$, $p=0.0001$). According to the results of the coherent phase microscopy, the types of the morphodensitometrical abnormalities were similar to that in the main group, albeit they were more significant. The proportion of the activated cells was 43%, while that of the degenerated and functionally incompetent platelets, 15%. There were significant correlations between the morphodensitometrical parameters of the platelets and basic parameters of their aggregation induced by adenosine diphosphate and collagen. **Conclusion:** Sepsis is associated with advanced abnormalities in the morphofunctional state of peripheral blood platelets progressing concomitantly to the deterioration of the patient's state. Coherent interference microscopy allows for a real-time assessment of the morphological particulars and functioning of circulating thrombocytes. Further studies are required to validate the results of this method.

Key words: sepsis, multiple organ dysfunction, platelet morphometry, vital computer phase morphometry

For citation: Koshelev RV, Vatazin AV, Zulkarnayev AB, Faenko AP. Evaluation of the morphofunctional state of peripheral blood platelets in sepsis. Almanac of Clinical Medicine. 2018;46(7):672–81. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-672-681.

Received 31 July 2018; accepted 22 November 2018

Ruslan V. Koshelev – MD, PhD, Associate Professor, Course of Clinical Transfusiology at the Chair of Anesthesiology and Intensive Care, Postgraduate Training Faculty; Deputy Chief Physician¹
✉ 61/2–1 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 572 28 88.
E-mail: koshelevrv@yandex.ru

Andrey V. Vatazin – MD, PhD, Professor, Head of the Department of Transplantology, Nephrology and Surgical Hemocorrection¹

Aleksey B. Zulkarnayev – MD, PhD, Chief Research Fellow, Surgical Department of Transplantology and Dialysis¹

Aleksandr P. Faenko – MD, Assistant, Course of Clinical Transfusiology at the Chair of Anesthesiology and Intensive Care, Postgraduate Training Faculty¹

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation