

Praca oryginalna • Original Article

Wpływ wieku płodowego na generację mikrocytek u noworodków urodzonych przedwcześnie

Alicja Wasiluk¹, Maria Mantur², Halina Kemonia², Marek Szczepański¹, Janusz Warda¹

¹Klinika Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka, ²Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Streszczenie

Cel: Celem pracy była ocena wpływu dojrzałości wcześniaków (wieku płodowego i masy ciała urodzeniowej) na aktywację płytek krwi w warunkach *in vivo* za pomocą oceny odsetka mikrocytek. Zbadano krew pępowinową 51 noworodków urodzonych przedwcześnie (poniżej 37. tygodnia ciąży) będących w różnym wieku płodowym (≤ 33 . i ≥ 34 . tygodnia) i z różną masą ciała. Istniejące u tych noworodków zagrożenia związane z ich niedojrzałością, np. zaburzenia hemostazy, odporności, mogą być w pewnym stopniu wyjaśnione poprzez ocenę aktywacji płytek krwi.

Metody: Mikrocytki oznaczano metodą cytometrii przepływowej. Krew do badań pobierano bezpośrednio po porodzie łożyska, z tętnicy pępowinowej, do probówek z CTAD.

Wyniki: Odsetek mikrocytek u wcześniaków płci żeńskiej ≥ 34 . tygodnia ciąży wynosił 4,23 %, ≤ 33 . tygodnia ciąży 4,0%. U wcześniaków płci męskiej ≥ 34 . tygodnia ciąży stwierdzono 4,43% mikrocytek, ≤ 33 . tygodnia ciąży 3,66%. Z przeprowadzonych badań wynika, że u noworodków bardziej dojrzałych stwierdza się wyższy odsetek mikrocytek.

Wnioski: Z punktu widzenia klinicznego przy ocenie zaburzeń hemostazy u wcześniaków należy uwzględnić ich wiek płodowy.

The effect of gestational age on the generation of microplatelets in preterm newborns

Summary

Aim: The aim of this investigation was the evaluation of the effect maturity of preterm newborns gestational age – g. a. and birth body weight on activation of umbilical blood platelets in the group of 51 neonates born prior to the 37th gestational week. They were divided into two groups: ≤ 33 i ≥ 34 weeks g.a. Newborns demonstrated different birth body weight. The risk connected with immaturity of newborns, for instance hemostasis or immunological disorders can be explained to some extent by the platelet activation.

Methods: Microplatelets were determined using flow cytometry. Blood was sampled with umbilical artery to the tubes with CTAD.

Results: Neonatal thrombocytes in *in vivo* conditions released microplatelets female ≥ 34 weeks g.a. 4,23%, ≤ 33 weeks g.a. 4,0%; male ≥ 34 weeks g.a. 4,43% and in ≤ 33 weeks g.a. 3,66%. Presented findings indicate that in more matured preterm newborns there is higher percentage of microplatelets.

Conclusions: From clinical point of view the evaluation of disturbances of hemostasis in preterm newborns should take under consideration their gestational age.

Słowa kluczowe: noworodki urodzone przedwcześnie, mikrocytki

Key words: preterm newborns, microplatelets

Praca finansowana ze środków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku nr 4-05-884P.

Wstęp

Noworodki urodzone przedwcześnie wykazują różnego stopnia trudności adaptacyjne do życia pozamacicznego. Występują u nich: zaburzenia termoregulacji, zaburzenia metaboliczne (głównie hipoglikemia), problemy ze strony układu oddechowego, układu krążenia, układu nerwowego,

przewodu pokarmowego, związane z niedojrzałością wątroby, nerek, zaburzenia immunologiczne, niedokrwistość, zaburzenia hemostazy. Zaburzenia te mają charakter złożony, mogą wystąpić zagrażające życiu dziecka: zespół zaburzeń oddychania, posocznica, krwawienie dokomorowe. Dopiero noworodek urodzony po 37. tygodniu ciąży jest dojrzały do

życia zewnątrzmacicznego. Każdy noworodek, urodzony z masą ciała poniżej 2 500 g, spełnia kryterium małej urodzeniowej masy ciała.

Płytki krwi u wcześniaków są mniej dojrzałe niż u osób dorosłych. *Saving* wraz ze współpracownikami stwierdził, że płytki krwi noworodków w porównaniu z dorosłymi tworzą w czasie aktywacji mniej wypustek cytoplazmatycznych, mają mniej widoczną strukturę kanalików i mniejszą ilość ziarnistości glikogenu [13]. Hyporeaktywność płytek krwi w okresie noworodkowym potwierdzono w wielu publikacjach [11]. Hyporeaktywność płytek krwi jest silniej wyrażona u wcześniaków [6]. Według niektórych autorów może to wynikać z uszkodzenia wewnątrzkomórkowej aktywacji [15]. Obniżona ekspresja P-selektyny na powierzchni komórek śródbłonna u wcześniaków może być odpowiedzialna za opóźnioną migrację neutrofilii. *Israels* i wsp. [6] udowodnili, że hyporeaktywność płytek u noworodków urodzonych przedwcześnie wynika z obniżonego metabolizmu fosfolipidów, obniżonej mobilizacji wapnia i wydzielania ziarnistości, stwierdzono zmniejszoną zdolność płytek do agregacji. Niektórzy badacze zaobserwowali zwiększoną adhezję płytek wynikającą z obecności w osoczu noworodków większych i bardziej funkcjonalnych multimerów czynnika *von Willebranda* (vWF) [18].

Gibson [4] wykazał upośledzoną agregację płytek krwi pod wpływem ADP i trombiny zarówno u noworodków urodzonych przedwcześnie, jak i u urodzonych w terminie, za przyczynę tego zjawiska uważał nie w pełni dojrzały układ receptorów na powierzchni płytek i wzrost zagrożenia infekcją [7]. W procesie hemostazy płytki krwi noworodków urodzonych przedwcześnie [4] wykazują upośledzoną agregację i zmniejszoną reakcję uwalniania substancji z ziarnistości płytkowych.

Mikroplateki są to bardzo drobne fragmenty płytek krwi odłączane w czasie uwypuklenia błony plazmatycznej podczas aktywacji lub apoptozy płytek. Mają wielkość od 100 nm do 1 µm, zawierają części błony plazmatycznej, bogatej w fosfolipidy (m.in. fosfatydyloserynę), dzięki czemu wykazują aktywność prokoagulacyjną. Na ich powierzchni nieaktywne czynniki krzepnięcia stają się aktywne (Xa, Va), zachodzi generacja trombiny [10]. Mikroplateki nazywane są w związku z tym prokoagulantem drobnofragmentarycznym PM (*procoagulant microparticles*). Mikroplateki są określane za pomocą

dwóch kryteriów: wielkości i ekspresji fosfatydyloseryny [3]. Celem pracy była ocena wpływu dojrzałości wcześniaków (wieku płodowego i masy ciała urodzeniowej) na aktywację płytek krwi w warunkach *in vivo* za pomocą oceny odsetka mikroplatek w cytometrze przepływowym.

Materiał i metody

Cel pracy realizowano oceniając we krwi pępowinowej noworodków urodzonych przedwcześnie obu płci (<37. tygodnia wieku płodowego), będących w różnym wieku płodowym (≤ 33. i ≥ 34. tygodnia) i z różną masą ciała aktywację płytek krwi za pomocą oceny odsetka mikroplatek w cytometrze przepływowym.

Materiał badany stanowiło 51 noworodków urodzonych przedwcześnie: 25 noworodków płci żeńskiej i 26 noworodków płci męskiej. Dzieci były urodzone w różnym wieku płodowym: od 25 do 36 tygodni ciąży, drogami i siłami natury lub drogą cięcia cesarskiego, w różnym stanie ogólnym, ocenianym według skali Apgar w 1., 3. i w 5. minucie życia, z różną masą urodzeniową, zawartą pomiędzy 860 a 2 960 gramów.

Wiek płodowy wcześniaków płci żeńskiej wahał się pomiędzy 27. a 36. tygodniem ciąży (średnio 33,2 ± 2,81 tygodnia ciąży), a wcześniaków płci męskiej pomiędzy 25. a 36. tygodniem ciąży (średnio 32,7 ± 3,21 tygodnia ciąży).

Masa urodzeniowa wcześniaków płci żeńskiej wahała się pomiędzy 930 a 2 950 g (średnio 2 086 ± 576,5 g), a masa urodzeniowa wcześniaków płci męskiej pomiędzy 860 a 2 960 g (średnio 2 054 ± 644,6 g). Charakterystykę badanych noworodków przedstawiono w tabeli I. Z badań wykluczono noworodki z potwierdzoną klinicznie i laboratoryjnie infekcją wewnątrzmaciczną. Matki zakwalifikowanych do badań noworodków nie otrzymywały leków wpływających na układ hemostazy w ciągu ostatnich 10 dni przed porodem. Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku Nr R-I-002/168/2008. Badania przeprowadzono u noworodków urodzonych w Klinice Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, oznaczenia wykonywano w Zakładzie Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Krew do badań pobierano bezpośrednio po porodzie łożyska, ze środkowego odcinka podwójnie zakleszczonyj pępowiny,

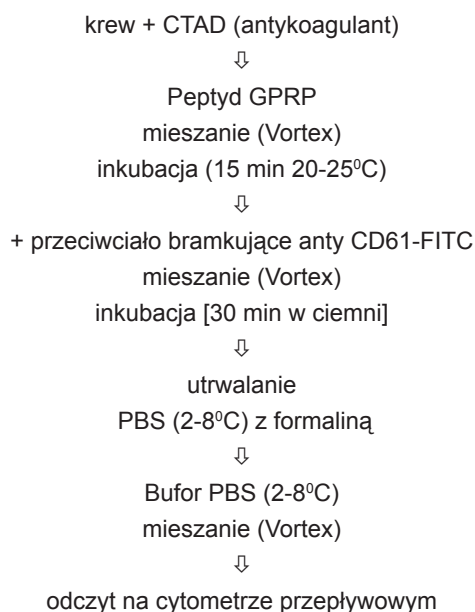
Tabela I
Charakterystyka badanych grup noworodków.

Grupy noworodków urodzonych przedwcześnie n=51	Wiek płodowy (tygodnie ciąży)	Masa urodzeniowa (gramy)
płci żeńskiej n = 25	27-36 śr. 33,2 ± 2,81	≤ 33 tygodni n = 11 min. 930
		≥ 34 tygodni n = 14 maks. 2 950 śr. 2 086 ± 576,5
płci męskiej n = 26	25-36 śr. 32,7 ± 3,21	≤ 33 tygodni n = 12 min. 860
		≥ 34 tygodni n = 14 maks. 2 960 śr. 2 054 ± 644,6

z tętnicy pępowinowej, do probówek z CTAD (cytrynian, teofilina, adenozyina, dipirydamol) w celu oznaczania mikroplatek. W celu uniknięcia aktywacji płytek pierwszy 1 ml krwi odrzucono. Materiał był transportowany do pracowni w ciągu 10 minut od pobrania. Badanie mikroplatek krwi metodą cytometrii przepływową wykonano na cytometrze przepływowym EPICS XL firmy Coulter Electronics Corporation, FL, USA. W celu identyfikacji mikroplatek zastosowano bramkujące przeciwciała monoklonalne anty-CD61, które wiąże się z wolną cząsteczką adhezyjną GPIIIa (CD61) lub związaną w kompleksie GPIIb/IIIa (CD41/CD61) na powierzchni płytek krwi oraz na błonie płytkowej wszystkich struktur płytkopochodnych. Podczas oznaczania przeciwciała monoklonalne znakowane fluorochromem (w tym przypadku FITC = izotiocjanian fluoresceiny) łączy się ze swoistym receptorem na płytce krwi. Intensywność fluorescencji odczytuje się na cytometrze przepływowym przy odpowiedniej długości fali w zależności od stosowanego fluorochromu.

Liczba mikroplatek została oceniona jako odsetek całkowitej liczby płytek krwi. Za każdym razem analizie poddawano 10⁴ elementów morfotycznych. Do każdego badania wykonywano próbę kontrolną, znakując płytki krwi antyCD61-FITC i nieswoistym przeciwciałem kontrolnym.

Procedurę badania aktywacji płytek krwi za pomocą oznaczania odsetka mikroplatek metodą cytometrii przepływową prowadzono według algorytmu [1, 2] (ryc. 1.).



Rycina 1 Procedura oznaczania odsetka mikroplatek metodą cytometrii przepływową.

Analiza statystyczna: Analizując cechy ilościowe nie stwierdzono istnienia normalności rozkładu, dlatego do ich dalszej analizy wykorzystano testy nieparametryczne. Poszukując różnic pomiędzy dwiema próbami niezależnymi, wykorzystano test U Manna-Whitneya. Przy porównywaniu prób zależnych użyto testu kolejności par Wilcoxon. Charakterystykę poszczególnych grup przedstawiono przy pomocy średniej

arytmetycznej oraz odchylenia standardowego. Wyznaczono także współczynnik korelacji porządku rang Spearmana. W analizie statystycznej wykorzystano pakiet Statistica 7.1 firmy StatSoft. Różnice istotne statystycznie uznano na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

Odsetek mikroplatek jest wyższy u noworodków płci żeńskiej urodzonych powyżej 34. tygodnia ciąży 4,23% w porównaniu do noworodków urodzonych poniżej 33. tygodnia 4%, a więc czas trwania ciąży korzystnie wpływa na liczbę mikroplatek, co świadczy o większej ich aktywacji. Zjawisko to obserwuje się niezależnie od płci, ale jest silniej wyrażone u noworodków płci męskiej: powyżej 34. tygodnia ciąży 4,43%, poniżej 33. tygodnia 3,66% mikroplatek (tab. II). Poszukiwano również korelacji mikroplatek w warunkach *in vivo* z masą ciała noworodków. Wyniki badań nie wykazały takich zależności.

Dyskusja

Zebrany materiał kliniczny zawiera krew pobraną od noworodków płci żeńskiej urodzonych pomiędzy 27. a 36. tygodniem wieku płodowego i noworodków płci męskiej urodzonych pomiędzy 25. a 36. tygodniem. Średni wiek płodowy obu grup noworodków był bardzo zbliżony do siebie: noworodków płci żeńskiej 33,2 tygodnia, noworodków płci męskiej 32,7 tygodnia życia płodowego. Stwarza to możliwość określenia, czy badane parametry wiążą się z tygodniem życia płodowego i zależą od dojrzałości noworodka. Również masa urodzeniowa wahała się w szerokich granicach: od 860 do 2 960 gramów, ale jednocześnie była zbliżona do siebie: u noworodków płci żeńskiej średnio 2 086 g, u płci męskiej średnio 2 054 g. Wpływa to korzystnie na szukanie związków badanych parametrów z wiekiem płodowym i z masą ciała noworodków urodzonych przedwcześnie, może więc wskazać, czy istnieje zależność pomiędzy ocenianymi parametrami.

Liczne badania wskazują na to, że u noworodków płytki krwi są niedojrzałe czynnościowo, zwłaszcza hyporeaktywne w procesach hemostazy i fagocytozy. Wykazują mniejszą reaktywność w odpowiedzi na trombinę, ADP, tromboksan A2 w porównaniu do osób dorosłych [9, 11]. Wykazują również mniejszą zdolność do ekspresji receptorów GPIa/IIa, GPIb, GPIIb/IIIa [5, 19], oraz P-selektyny po zastosowaniu trombiny/ADP [12, 17]. Hyporeaktywność płytek krwi wcześniaków potwierdzają badania *Israelsa*, *Michelsona*, *Saxonhouse'a* i *Wasiluk* [6, 9, 14, 20]. *Israels* [6] wykazał niedobór syntezy TXA₂ u wcześniaków i małą reaktywność płytek krwi na jego działanie.

U noworodków, zwłaszcza urodzonych przedwcześnie, istnieje chwiejna równowaga pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrynolizy. Badane płytki pochodziły z krwi pępowinowej. Wiadomo, że bezpośrednio po porodzie stwierdza się wzmożoną aktywację płytek krwi, o czym mogą świadczyć podwyższone poziomy stężenia substancji uwalnianych z ziarnistości płytkowych: PF4, β -TG [16], w porównaniu do ich śladowych ilości stwierdzanych u osób dorosłych. Ze

Tabela II

Odsetek mikroplatełek u wcześniaków ≤33. tygodnia ciąży i ≥34. tygodnia ciąży w warunkach *in vivo*.

Liczba noworodków n = 51	Wiek płodowy	Mikroplatełki (%)	
		Średnia x	± SD
płci żeńskiej n = 25	≤33. tygodnia ciąży n = 11	4,00	1,107
	≥34. tygodnia ciąży n = 14	4,23	1,765
płci męskiej n = 26	≤33. tygodnia n = 12	3,66	0,823
	≥34. tygodnia n = 14	4,43	1,737

względu na budowę i wielkość mikroplatełek pomiar ich jako wskaźnika aktywacji platełek może mieć większą wartość niż pomiar innych wskaźników aktywacji platełek krwi, np. PF4, β-TG. Mikrocząsteczki pochodzenia platełkowego wykazują olbrzymie działanie plejotropowe, mają największy zakres działania spośród innych parametrów oceniających funkcje platełek krwi. Współdziałają z neutrofilami i komórkami śródbłonna, uczestnicząc w reakcjach zapalnych [8]. Mogą dotrzeć do miejsc niedostępnych dla platełek krwi, a ich powierzchnia bogata jest w czynniki aktywujące krzepnięcie i oddziałujące na śródbłonek naczyń krwionośnych. Dostępność składników układu krzepnięcia i ekspresja receptorów na powierzchni mikroplatełek stwarza wyjątkowo korzystną sytuację do ich udziału w procesach hemostazy. Wzrost liczby mikroplatełek daje gwarancję większych możliwości korekty hemostazy. Ze względu na funkcje mikroplatełek wzrost ich odsetka może mieć korzystny wpływ nie tylko na układ hemostazy, ale i na homeostazę organizmu noworodków urodzonych przedwcześnie. Wykazaliśmy, że wraz ze wzrostem wieku płodowego u noworodków urodzonych przedwcześnie obserwuje się większy odsetek mikroplatełek, co pośrednio wskazuje na wzrost aktywacji platełek. Jest to pierwsza w piśmiennictwie praca oceniająca wpływ wieku płodowego noworodków urodzonych przedwcześnie na generację mikroplatełek. Pozwala to na rzeczywistą ocenę funkcji platełek krwi w tej grupie noworodków, gdzie istnieją realne zagrożenia dysfunkcji układu hemostazy. Stwierdziliśmy że stopień zagrożenia w równym stopniu dotyczy noworodków obu płci.

Wniosek

Z punktu widzenia klinicznego przy ocenie zaburzeń hemostazy u wcześniaków należy uwzględniać ich wiek płodowy.

Piśmiennictwo

1. Baj Z. Wykorzystanie cytometrii przepływowej w badaniach platełek krwi. *Centr Europ J Immunol* 1996; 21: 119-127.
2. Becton Dickinson Procedures. Flow cytometry analysis of platelets. *Source Book Section* 1991; 8: 19-35.
3. De Botton S, Sabri S, Daugas E i wsp. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002; 100: 1310-1317.
4. Gibson B. Neonatal haemostasis. *Arch Dis Child* 1989; 64: 503-506.
5. Hitchcock IS, Chen MM, King JR i wsp. YRRL motifs in the cyto-

plasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation. *Blood* 2008; 112: 2222-2231.

6. Israels SJ, Rand ML, Michelson AD. Neonatal platelet function. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 363-371.
7. Lorant DE, Li W, Tabatabaei N i wsp. P-selectin expression by endothelial cells is decreased in neonatal rats and human premature infants. *Blood* 1999; 94: 600-609.
8. Lordier L, Jalil A, Aurade F i wsp. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* 2008; 112: 3164-3174.
9. Michelson AD. Platelet function in the newborn. *Semin Thromb Haemost* 1998; 24: 507-512.
10. Michelson AD, Rajasekhar D, Bednarek FJ i wsp. Platelet and platelet-derived microparticle surface factor V/Va binding in whole blood: differences between neonates and adults. *Thromb Haemost* 2000; 84: 689-694.
11. Pietrucha T, Wojciechowski T, Greger J i wsp. Differentiated reactivity of whole blood neonatal platelets to various agonists. *Platelets* 2001; 12: 99-107.
12. Pozner R, Schattner M. TPO signaling: when the tyrosines go marching in(side). *Blood* 2008; 112: 2171-2172.
13. Saving KL, Jennings DE, Aldag JC i wsp. Platelet ultrastructure of high-risk premature infants. *Thromb Res* 1994; 73: 371-384.
14. Saxonhouse MA, Sola MC. Platelet function in term and preterm neonates. *Clin Perinatol* 2004; 31: 15-28.
15. Suarez CR, Gonzalez J, Menendez C i wsp. Neonatal and maternal platelets: activation at time of birth. *Am J Hematol* 1988; 29: 18-21.
16. Wasiluk A. Is activation of blood platelets in term newborns related to sex? *Medical Science Monitor* 2004; 10: 83-84.
17. Wasiluk A. Markers of platelets activation, CD62P and soluble P-selectin in healthy term neonates. *J Perinat Med* 2004; 32: 514-515.
18. Wasiluk A. The expression of vWF receptor on newborn platelet. *Medical Science Monitor* 2005; 11: 545-548.
19. Wasiluk A. Membrane-activated form of glycoproteins IIb/IIIa complex on newborn platelets. *Fetal Diagn Ther* 2006; 21: 177-180.
20. Wasiluk A, Mantur M, Szczepański M i wsp. The effect of gestational age on platelet surface expression of CD62P in preterm newborns. *Platelets* 2008; 19: 236-238.

Adres Autorów:

Klinika Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
ul. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-276 Białystok
tel.: (+48 85) 746 84 98
faks: (+48 85) 746 86 63
e-mail: awasiluk@umwb.edu.pl

(Praca wpłynęła do Redakcji: 2009-07-06)

(Praca przekazana do opublikowania: 2009-09-16)