

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616-005.757.9

Белоус М.С.¹, Певнев А.А.¹, Рябиков Д.В.², Яковлев А.Ю.¹

К ВОПРОСУ О ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЖИРОВОЙ ГЛОБУЛЕМИИ

¹ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», 603126, Нижний Новгород;

²ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 13», 603018, Нижний Новгород

У 60 пациентов с тяжелой сочетанной травмой проведено сравнительное определение плазмы крови на наличие жировых глобул с использованием способа Черкасова В.А. и разработанного нами способа. Применение этого способа повышает точность качественного и количественного анализа за счет снижения эмульгирующего действия этилового спирта в красителе судан IV, предупреждения неравномерной окраски и разрушения препарата в течение 3 мин после приготовления. Разработана классификация жировых глобул, выделены капилляроопасные глобулы размером ≥ 8 мкм и артериолоопасные глобулы ≥ 50 мкм.

Ключевые слова: диагностика жировой эмболии, жировые глобулы, классификация.

Для цитирования: Белоус М.С., Певнев А.А., Рябиков Д.В., Яковлев А.Ю. К вопросу о лабораторной диагностике жировой глобулемии. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 615-618. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-615-618>

Belous M.S.¹, Pevnev A.A.¹, Ryabikov D.V.², Yakovlev A.Yu.¹

TO THE QUESTION OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF FAT DROPLETS

¹Nizhniy Novgorod regional clinical hospital named after N.A. Semashko, Nizhniy Novgorod, 603126, Russian Federation;

²Nizhny Novgorod clinical hospital № 13, Nizhniy Novgorod, 603018, Russian Federation

This study aims to compare of study of blood plasma for the presence of fat globules using the method of V.A. Cherkasov and the method what we developed in 60 patients with severe combined trauma. The use of the developed method increases the accuracy of qualitative and quantitative analysis by reducing the emulsifying action of the ethyl alcohol of Sudan IV, preventing uneven coloring and destruction of the preparation within 3 minutes after preparation. A classification of fat globules has been developed, capillary-hazardous globules of ≥ 8 μ m in size and arterioles-hazardous globules ≥ 50 μ m.

Key words: diagnostics of fat embolism syndrome; fat droplets; classification.

For citation: Belous M.S., Pevnev A.A., Ryabikov D.V., Yakovlev A.Yu. To the question of laboratory diagnostics of fat droplets. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (10): 615-618 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-615-618>

For correspondence: Yakovlev A.Yu., Sc. D., Ass. Prof., ICU curator; e-mail: aritmru@list.ru

Information about authors:

Belous M.S., <http://orcid.org/0000-0002-1869-6144>

Pevnev A.A., <http://orcid.org/0000-0002-2293-634X>

Ryabikov D.V. <http://orcid.org/0000-0002-4032-622X>

Yakovlev A.Yu. <http://orcid.org/0000-0002-4616-5711>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 24.10.2018

Accepted 01.11.2018

Введение. Жировая эмболия (ЖЭ) обусловлена множественной окклюзией артериальных сосудов жировыми эмболами (каплями триглицеридов, недифференцированными частицами липидов, цельными жировыми клетками, липидными комплексами размером более 7-8 мкм). Клиническое состояние пациента, как правило, характеризуют симптомы дыхательной недостаточности, проходящие нарушения кровообращения головного мозга и наличие на коже петехиальных (точечных) кровоизлияний. Жировая эмболия – это, в большинстве случаев, клинический диагноз, однако, к большому сожалению, до сих пор нет единого общепризнанного лабораторного показателя этого афизиологичного процес-

са, который бы обладал высокой чувствительностью и специфичностью. Лишь жировую глобулемиию считают патогномичным признаком ЖЭ [1].

По данным литературы для выявления жировых глобул в крови используют световую микроскопию [2], вариант «темного поля» [3], флюоресцентную микроскопию [4], а также микроскопию плазмы крови, которую подвергли фильтрации [5] или ультрафильтрации [6]. При этом для обнаружения (окраски частиц жира) применяют как нейтральные жирорастворимые красители (нильский голубой сульфат, судан III, судан IV, липофильный краситель «Oil Red O»), а также и флюоресцентные (фосфин-3R) красители.

Первую попытку количественной оценки циркулирующего в крови жира в 1970 г. предпринял A. Gurd [7]. Для определения в пробирку помещают 2 - 10 мл

Для корреспонденции: Яковлев Алексей Юрьевич, д-р мед. наук, доц., куратор ОРИТ; e-mail: aritmru@list.ru

крови. После образования сгустка кровь центрифугируют в течение 10 мин. со скоростью 3500 об/мин⁻¹. Полученный супернатант отбирают пипеткой и делят на две части. Первую используют для определения концентрации триглицеридов (ТГ); вторую часть фильтруют через бумажный микрофильтр с диаметром пор 8 мкм с последующим орошением фильтра липофильным красителем судан IV. Далее фильтр подвергли микроскопии с определением диаметра глобул при использовании объект- и окуляр-микрометра, видимых только на поверхности фильтра; их общей площади. Одновременно в фильтрате определяли концентрацию ТГ. Различие содержания липидов в плазме крови и фильтрате, весьма приблизительно, характеризовали как «патологические ТГ» при формировании ими глобул размером более 8 мкм.

В 1997 г. В.М. Кустов и соавт. [8] предложили более удобный для клинического применения полуколичественный метод определения глобулемии. Для приготовления препарата автор использовал 5 мл венозной крови, смешанной с 0,5 мл 3,8% цитрата натрия. После 20-30 мин отстаивания кровь центрифугировали при 1500 об/мин⁻¹ в течение 15 мин. Для определения брали верхний слой центрифугата: на предметное стекло наносили 0,02 мл плазмы в виде одной толстой капли. Для окрашивания жира в препарат добавляли 0,02 мл насыщенного раствора судана III в спирте, накладывали покровное стекло и проводили световую микроскопию для фиксации липидов в проходящем свете при увеличении 7 x 40 (280 x). Оценку проводили по разработанным авторами критериям (табл. 1).

Заметим, что наклеивание покровного стекла приводит к «утеканию», потере части исследуемого материала и визуальному увеличению размеров глобул в потоке; это, безусловно, влияет на точность проводимого измерения. При этом не проводят исследования количественных и качественных характеристик обнаруженных жировых глобул. Кроме того, разработанные авторами критерии предполагают описание либо отдельно взятого поля зрения, либо в динамике в четырех препаратах, приготовленных через интервалы времени от 30 мин. до 1 суток после протезирования крупных суставов. Это не позволяет провести объективную оценку жировой глобулемии.

В целях большей объективности диагностики жировой эмболии Черкасов В.А. и соавт. [9] в 2000 г. предложили способ, отличительной особенностью которого является использование для микроскопии образцов артериальной крови. Однако и этот метод не позволяет в динамике проводить оценку формирования жировой глобулемии.

Таблица 1

Оценка жировой глобулемии по Кустову В.М.

Степень глобулемии	Описание микроскопической картины
(+)	редкие жировые глобулы ($d > 4$ мкм) в препарате;
(++)	единичные глобулы (до 10 мкм) в поле зрения;
(+++)	глобулы больших размеров и разной величины ($d > 6-12$ мкм) в каждом поле зрения;
(++++)	слившиеся большие капли в каждом препарате;
(-)	жировые глобулы не обнаружены во всех четырех препаратах

Недостатки известных методов диагностики жировой глобулемии затрудняют широкое их применение и рассмотрение лечащими врачами, в первую очередь, травматологами и анестезиологами-реаниматологами; отсутствует возможность быстрого получения и интерпретации результатов анализа. В то же время, жировая глобулемия встречается более чем у 80 % пострадавших с тяжелой сочетанной травмой (ТСТ). Изложенное выше явилось побудительным фактором для разработки метода приготовления препарата крови с целью выявления наличия жировых глобул и классификации их по признаку опасности эмболизации сосудов системы микроциркуляции.

Цель исследования - разработка способа лабораторной диагностики и оценки выраженности жировой глобулемии.

Материал и методы. Проведено микроскопическое исследование плазмы крови на наличие жировых глобул у 60 пациентов с ТСТ (ISS ≥ 17 баллов), госпитализированных в отделение реанимации и интенсивной терапии Нижегородского регионального травматологического центра при ГБУЗ НО «НОКБ им. Н.А. Семашко». Кровь брали у пациентов в вакуумные пробирки с 3,2%-цитратом Na «BD Vacutainer» и проводили определение жировых глобул с помощью двух способов. В контрольной серии определение наличия жировых глобул проводили по методу Черкасова В.А. [9]: исследуемую кровь центрифугировали со скоростью 2000 об/мин⁻¹ в течение 15 мин. Затем полученную плазму в количестве 20 мкл наносили на предметное стекло в виде толстой капли. В каплю добавляли 6 капель спиртового насыщенного раствора судан IV. Через 1 мин препарат просматривали под микроскопом. В опытной серии использовали разработанный нами способ: кровь 10-15 мин центрифугировали со скоростью 2000 об/мин⁻¹. 50 мкл плазмы вносили в пробирку с 50 мкл красителя судан IV. Содержимое смешивали трехкратным переворачиванием пробирки. Через 1 минуту из полученной смеси забирали 10 мкл и наносили на предметное стекло, после чего препарат исследовали под микроскопом. При увеличении в 100 раз полученный препарат рассматривали в 16 полях зрения. Подсчет глобул в контрольной серии проводили также в 16 полях зрения. Для нивелирования влияния разведения на оценку глобулемии использовали поправочный коэффициент 8, пропорциональный степени разведения сыворотки в контрольной серии определений.

Для микроскопического исследования препаратов в обеих сериях использовали микровизор медицинский проходящего света mVizo-101 (ЛОМО, Россия), который позволяет делать «цифровые» фотографии. Полученные микрофотографии обрабатывали с помощью компьютерной программы JMicroVision 1.2.7 [10]. Это позволило подсчитать общее количество глобул, размер глобул, а также общую площадь глобул. Статистическая обработка результатов определения проведена с помощью пакета прикладных программ PSPP 0.10.2. Все данные проверены в отношении нормальности распределения с помощью тестов Шапиро-Уилка, Колмогорова-Смирнова. Для сравнения количественных признаков с асимметричным распределением использовали U-критерий Манна-Уитни. Разницу считали статистически значимой при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Результаты выявили статистическую достоверность данных, полученных в контрольной и опытной сериях (табл. 2, 3).

Количество и общая площадь глобул в препарате при световой микроскопии, Me [0,25; 0,75]

Параметр	Контрольная серия	Опытная серия
Количество глобул ≥ 8 мкм, шт.	11,5 [7,5; 13,75]	21,5 [15,5; 37]*
Количество глобул $d = 8-20$ мкм, шт.	6,2 [3,5; 8,4]	11,4 [8,3; 14,5]*
Количество глобул $d = 21-50$ мкм, шт.	3,1 [0; 4,7]	7,0 [6,2; 9,9]*
Количество глобул $d \geq 50$ мкм, шт.	1,2 [0; 3,2]	3,4 [0; 6]*
Общая площадь глобул $d \geq 50$ мкм, мкм ²	4784,2 [1673,8; 9855,9]	10022,5 [5125,7; 24660,2]*

* - статистическая значимость различий значений опытной серии относительно значений контрольной серии ($p \leq 0,05$).

Таблица 3

Количество и площадь зон разрушения и неравномерной окраски препарата через 3 мин после приготовления, $M \pm \sigma$, Me [0,25; 0,75]

Параметр	Контрольная серия	Опытная серия
Количество зон разрушения, шт.	3,2 \pm 1,46	0 [0; 0]*
Площадь зон разрушения, мм ²	8,9 \pm 4,06	0 [0; 0]*
Площадь зон неравномерного окрашивания, мм ²	0,115 [0; 0,643]	0 [0; 0]*

* - статистическая значимость различий значений опытной серии относительно значений контрольной серии ($p \leq 0,05$).

Таблица 4

Сравнительная характеристика методик диагностики жировой глобулемии

Характеристики способа	Способ Черкасова В.А. и соавт. [9]	Модифицированная методика
Место окрашивания препарата	Предметное стекло	Пробирка
Количество необходимой плазмы, мкл	20	50
Количество необходимого красителя, мкл	300	50
Количество исследуемой смеси, мкл	320	10
Время экспозиции красителя, мин	1	1
Использование покровного стекла	нет	нет

При сравнении результатов видно, что при использовании разработанного способа зафиксировано статистически значимое увеличение количества глобул в препарате и общей площади глобул. При этом в опытной серии увеличилось количество жировых глобул диаметром ≥ 50 мкм, что соответствует размеру артериол в которых могут быть образованы эмболы. Глобулы диаметром ≥ 50 мкм следует считать потенциально эмбоопасными для артериол системы микроциркуляции, с последующим развитием полиорганной недостаточности, инициированной ЖЭ.

При использовании разработанного способа в опытной серии количество глобул статистически значимо превышало таковые в контрольной серии при отсутствии зон разрушения и неравномерного окрашивания препарата. Повышение качества идентификации жировых глобул в опытной серии мы связываем, прежде всего: а) со снижением количества спиртового красителя, необходимого для приготовления препарата и б) длительностью экспозиции смеси

плазмы крови и красителя не на предметном стекле, а в пробирке.

Необходимо отметить, что недостатки способа Черкасова В.А. [9] были известны и ранее. Во многом это определено тем, что целью разработанного авторами способа являлось определение наличия артериальной глобулемии, а не количественная ее оценка.

При данном способе диагностики жировой эмболии слишком высока степень разведения сыворотки пациента (20 мкл сыворотки / 6 капель красителя) затрудняет поиск жировых глобул в препарате, а также визуальную оценку жировой глобулемии.

На рис. 1 (см. обложку) изображен препарат плазмы крови, приготовленный с помощью способа Черкасова В.А. [9]. Видно интенсивное и неравномерное окрашивание препарата, при этом визуализируется лишь одна глобула (обозначена цифрой 1).

Спирт, в большом количестве входящий в состав красителя судан IV, может значимо влиять на размеры глобул жира [11] при высоком соотношении краситель/плазма, а за счет испарения спирта приводит к быстрому высыханию и разрушению препарата на предметном стекле.

На рис. 2 (см. обложку) видно разрушение центральной части препарата контрольной серии через 3 мин после его приготовления по мере испарения этилового спирта в составе красителя (обозначено цифрой 2).

Внесение красителя в сыворотку крови на предметном стекле не позволяет равномерно прокрашивать весь препарат, что приводит к затруднению подсчета жировых глобул в зонах слабого, или, наоборот, чрезмерного окрашивания препарата (рис. 3, см. обложку).

На рис. 3 видно, что препарат прокрашен не равномерно. Цифрами 2 и 3 обозначены области препарата с низкой и высокой степенью окрашивания, что затрудняет визуализацию жировых глобул. Цифрой 1 обозначена жировая глобула с нечеткими контурами за счет ее избыточного окрашивания.

Способ Черкасова В.А. [9] не позволяет количественно оценивать выраженность глобулемии; эта информация отсутствует в публикациях авторов. Это может быть связано с быстрым высыханием препарата, что препятствует объективной его оценке и с отсутствием объективных критериев выраженности глобулемии. Отличия модифицированной методики диагностики жировой глобулемии в сравнении со способом Черкасова В.А. представлены в табл. 4.

Модифицированный метод позволяет качественно идентифицировать жировые глобулы в плазме крови, дополнительно устанавливая общее количество и их площадь. Описанные преимущества связаны со снижением степени разведения нативной плазмы (1:1), меньшим содержанием спирта в смеси, меньшим временем экс-

позиции, отсутствием зон неравномерного окрашивания препарата, а так же с меньшим разрушением (особенно в краевых зонах) препарата.

Следует отметить, что фотографирование микропрепарата повышает скорость определения, а компьютерная обработка фотографий позволяет проводить быстрый математический анализ полученных результатов с получением количества глобул, их размера и общей площади. Последующее вычисление из площади глобул в препарате из 5 мкл исследуемой плазмы крови количества эмболоопасного жира в объеме циркулирующей крови позволяет прогнозировать течение органических нарушений, которые возникают вследствие эмболизации микроциркуляторного русла.

При цифровой обработке полученных результатов, жировые глобулы рационально классифицировать:

- Жировые глобулы размером ≤ 7 мкм;
- Жировые глобулы размером 8-20 мкм;
- Жировые глобулы размером 21-50 мкм;
- Жировые глобулы размером ≥ 50 мкм.

Следует считать все глобулы размером ≥ 8 мкм как капилляроопасные эмболы, глобулы размером ≥ 50 мкм - как артериолоопасные эмболы. Клиническое применение классификации позволит повысить унификацию методов определения жировых глобул и оценивать в динамике эффективность применяемых средств профилактики и лечения жировой эмболии.

Выводы:

Разработанный способ определения жировых глобул в крови двукратно повышает их выявление за счет снижения эмульгирующего действия этилового спирта, входящего в состав красителя судан IV, предупреждения неравномерной окраски препарата и разрушения в течение 3 мин. после его приготовления.

Оценку степени выраженности глобулемии рационально проводить по объективным критериям: количеству глобул размером ≥ 8 мкм, 8-20 мкм, 21-50 мкм, ≥ 50 мкм и их общей площади во всем препарате. Это позволяет прогнозировать течение жировой эмболии, оценивать влияние профилактики и лечения на глобулемию. При оценке жировой глобулемии необходима их классификация по степени эмболоопасности: ≥ 8 мкм – капилляроопасные, ≥ 50 мкм – артериолоопасные.

Цифровая форма регистрации и обработки результатов позволяет вносить объективные данные в историю болезни, обеспечивает их хранение, способствует стандартизации полученных результатов и оценке эффективности применяемых методов профилактики и лечения жировой эмболии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-7, 10 см. REFERENCES)

1. Шифман Е. М. *Жировая эмболия: клиническая физиология, диагностика и интенсивная терапия*. Петрозаводск: ИнтелТек; 2003.
8. Кустов В. М., Перфилова П. Е., Нечуева И. Б. Роль лабораторных методов в диагностике жировой эмболии после операций на крупных суставах нижних конечностей. *Гений ортопедии*. 1997; 3: 25-8.
9. Черкасов В.А., Литвиненко С.Г., Рудаков А.Г. Способ диагностики травматической жировой эмболии. Патент РФ № 2195659; 2000.
11. Плахотина Е.Н., Бочаров С.Н., Творогова С.С., Дмитриева Л.А., Родионова Л.В., Кинаш И.Н. Эффективность лечения экспериментальной жировой эмболии наиболее часто применяемыми в клинической практике препаратами. *Acta Biomedica Scientifica*. 2005; 6: 157-61.

REFERENCES

1. Shifman E. M. *Fat embolism: clinical physiology, diagnosis and intensive care. Zhirovaya emboliya: klinicheskaya fiziologiya, diagnostika i intensivnaya terapiya*. Petrozavodsk: IntelTek, 2003. (in Russian)
2. Gage S. H, Fish P. A. Fat digestion, absorption, and assimilation in man and animals as determined by the dark-field microscope, and a fat-soluble dye. *Am. J. Anat.* 1924; 34: 1-85.
3. Frazer A.C. Stewart H.C. Ultramicroscopic particles in normal serum. *J. Physiol.* 1936; 87: 53-4.
4. Peltier L.F. The detection of fat droplets in the circulating blood. *Surgery*. 1954; 36 (2): 198-203.
5. Schlag G., Sommoggy S.V. Modification des Gurd-test zur Diagnostik der fettembolie im blat. *Act. Chir.* 1972; 7 (2): 347-50.
6. Tedeschi C.G., Castelli W., Kropp G., Tedeschi L.G. Fat macroglobulinemia and fat embolism. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1968; 126 (1): 83-90.
7. Gurd A.R. Fat embolism: an aid to diagnosis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1970; 52 (4): 732-7.
8. Kustov V. M., Perfiletova P. E., Nechueva I. B. The role of laboratory methods in the diagnosis of fat embolism after operations on large joints of the lower extremities. *Geniy ortopedii*. 1997; 3: 25-8. (in Russian)
9. Cherkasov V.A., Litvinenko S.G., Rudakov A.G. Method for the diagnosis of traumatic fat embolism. Patent RF N 2195659; 2000. (in Russian)
10. Roudit N. J. MicroVision: Image analysis toolbox for measuring and quantifying components of high-definition images. Version 1.2.7. <http://www.jmicrovision.com> (accessed 01 February 2016).
11. Plakhotina E.N., Bocharov S.N., Tvorogova S.S., Dmitrieva L.A., Rodionova L.V., Kinash I.N. The effectiveness of the treatment of experimental fat embolism most frequently used in clinical practice drugs. *Acta Biomedica Scientifica*. 2005; 6: 157-61. (in Russian)

Поступила 24.10.18

Принята к печати 01.11.18

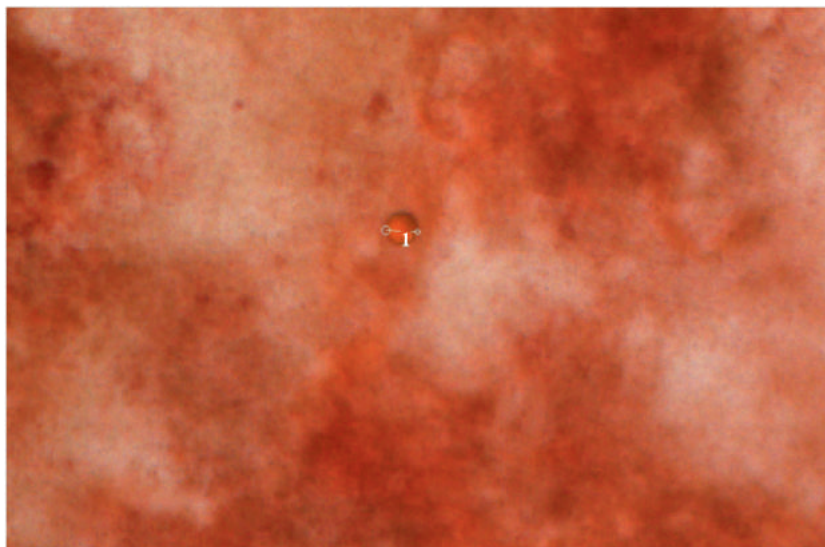


Рис. 1. Препарат плазмы крови контрольной серии исследования. Окрашивание суданом IV. Об. 5, видеонасадка – ХТ0028.
1 – жировая глобула.

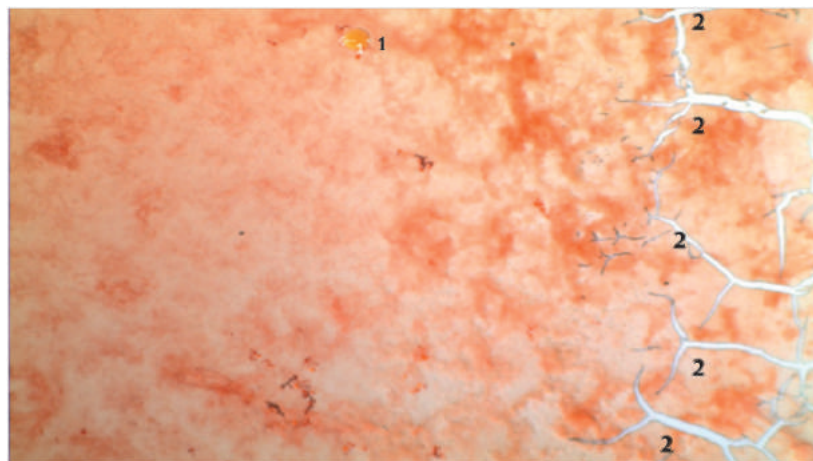


Рис. 2. Препарат плазмы крови контрольной серии.
Окрашивание суданом IV. Об. 5, видеонасадка – ХТ0028. Примечание: 1 – жировая глобула размером 64 мкм; 2 – участки разрушения препарата.

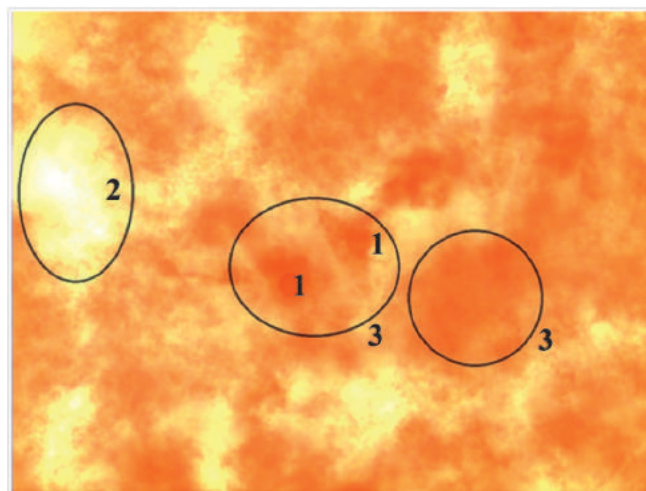


Рис. 3. Препарат плазмы крови контрольной серии исследования.
Окрашивание суданом IV. Об. 5, видеонасадка – ХТ0028. Примечание: 1 – крупная жировая глобула с нечеткими контурами в зоне избыточного окрашивания; 2 – зона недостаточного окрашивания; 3 – зона избыточного окрашивания.