

DOI: 10.24287/j.1040

Сравнение импортных и отечественных наборов антител для иммунофлуоресцентного окрашивания тромбоцитов в мазках крови

Н.А. Подоплелова^{1,2}, Е.В. Юшкова^{1,2}, Д.Б. Флоринский¹, Д.В. Федорова¹, Д.М. Полохов¹, П.А. Жарков¹, Е.О. Осидак¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Москва

Введение. Внедрение отечественных антител для иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови требует обязательного сравнительного анализа с импортными аналогами, применяемыми ранее для диагностики наследственных тромбоцитопатий.

Цель исследования: провести сравнительный анализ наборов отечественных и импортных антител для иммунофлуоресцентного анализа мазков крови при диагностике двух наиболее распространенных нарушений тромбоцитов, связанных с дефектами мембранных гликопротеинов: тромбастении Гланцмана и синдрома Бернара–Суллье.

Материалы и методы. Для сравнительного анализа эффективности антител было проведено иммунофлуоресцентное исследование мазков крови 16 пациентов с тромбастенией Гланцмана, 10 пациентов с синдромом Бернара–Суллье, а также 25 здоровых добровольцев.

Результаты. В ходе работы было проведено качественное сравнение отечественных антител к поверхностным гликопротеинам тромбоцитов: IIbIIIa (CD41) и IblX (CD42), а также соответствующих вторичных флуоресцентно меченых антител с импортными аналогами. Результаты исследования показали, что исследуемые отечественные антитела не уступают импортным аналогам. Кроме того, клинические испытания показали, что у всех 10 пациентов с подтвержденным синдромом Бернара–Суллье экспрессия гликопротеина IblX была снижена или отсутствовала полностью. Из 16 пациентов с подтвержденной тромбастенией Гланцмана только у 2 (13%) не удалось выявить снижение или отсутствие экспрессии гликопротеина IIbIIIa. Кроме того, проведена оценка стабильности образцов мазков крови при хранении в различных условиях.

Заключение. Проведена валидация набора антител к тромбоцитарным гликопротеинам (CD41, CD42). Метод иммунофлуоресцентного анализа мазков крови продемонстрировал чувствительность 100% для синдрома Бернара–Суллье и 87% для тромбастении Гланцмана. Доказана стабильность образцов при хранении до 16 нед при –20°C и при комнатной температуре в вакуумной упаковке.

Ключевые слова: тромбоцитопения, тромбоциты, нарушения тромбоцитов, иммунофлуоресценция

Подоплелова Н.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025;24(4):71–82. DOI: 10.24287/j.1040

Comparison of imported and domestic antibody kits for immunofluorescence staining of platelets in blood smears

N.A. Podoplelova^{1,2}, E.V. Yushkova^{1,2}, D.B. Florinskiy¹, D.V. Fedorova¹, D.M. Polokhov¹, P.A. Zharkov¹, E.O. Osidak¹

¹The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

Introduction. The implementation of domestically produced antibodies for immunofluorescence staining of blood smears requires a thorough comparative analysis with foreign well-known analogues previously used in diagnosing inherited platelet disorders.

Aim: to conduct a comparative analysis of domestic and foreign antibody kits for immunofluorescence analysis of blood smears used in the diagnosis of the two most common platelet disorders associated with membrane glycoprotein defects: Glanzmann thrombasthenia and Bernard–Soulier syndrome.

Materials and methods. To compare the antibody effectiveness, immunofluorescence analysis of blood smears was carried out for 16 patients with Glanzmann thrombasthenia, 10 patients with Bernard–Soulier syndrome, and 25 healthy volunteers.

Results. In this work, we carried out a qualitative comparison between domestic antibodies to platelet surface glycoproteins: IIbIIIa (CD41) and IblX (CD42), as well as corresponding fluorescently labeled secondary antibodies and their foreign well-known analogues. It was shown that the domestic antibodies are not inferior to foreign well-known analogues. Clinical trials demonstrated that the expression of glycoprotein IblX was reduced or completely absent in 10 out of 10 patients with confirmed Bernard–Soulier syndrome. Among 16 patients with confirmed Glanzmann thrombasthenia, only two (13%) did not show decreased or absent expression of glycoprotein IIbIIIa. The stability of blood smear samples stored under various conditions was also evaluated.

Conclusion. A kit of antibodies against platelet glycoproteins (CD41, CD42) was validated. Immunofluorescence analysis of blood smears demonstrated 100% sensitivity for Bernard–Soulier syndrome and 87% sensitivity for Glanzmann thrombasthenia. The samples remained stable for up to 16 weeks at –20°C and at room temperature in vacuum packaging.

Keywords: thrombocytopenia, platelets, platelet disorders, immunofluorescence

Podoplelova N.A. et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025;24(4):71–82. DOI: 10.24287/j.1040

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 09.10.2025

Принята к печати 16.11.2025



EDN: BORWWW

Контактная информация:

Подоплелова Надежда Александровна, к.б.н. ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: podoplelovan@yandex.ru

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 09.10.2025

Accepted 16.11.2025

Correspondence:

Nadezhda A. Podoplelova, PhD, a leading researcher at the Laboratory of Cell Hemostasis and Thrombosis of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: podoplelovan@yandex.ru

Наследственные нарушения тромбоцитов – это группа редких заболеваний, характеризующихся качественными дефектами тромбоцитов, часто в сочетании с количественными. Для большинства заболеваний из данной группы постановка диагноза – длительный процесс, требующий большого количества лабораторных тестов с комплексной оценкой их результатов [1–3]. Тем не менее постановка точного диагноза избавляет пациента от неоправданного применения иммуносупрессивной терапии и/или спленэктомии [4, 5].

Диагностические инструменты включают в себя функциональные и генетические тесты в сочетании с исследованием морфологических особенностей тромбоцитов. Иммуноморфологическая оценка мазков крови с помощью микроскопии представляет собой надежный метод, позволяющий диагностировать наиболее распространенные нарушения тромбоцитов [6–8]. Поскольку для приготовления мазков крови требуется минимальное количество крови, данный метод может применяться у пациентов детского возраста, в том числе у новорожденных. Метод достаточно прост и относительно дешев в исполнении. Кроме того, высушенные мазки в отличие от цельной крови могут транспортироваться, что делает диагностику доступной для удаленных регионов страны. Для ряда заболеваний иммунофлуоресцентный анализ мазков крови может обеспечить постановку диагноза сам по себе (например, *MYH9*-макротромбоцитопения) либо выступать дополнением для функциональных тестов, таких как агрегометрия и проточная цитометрия [8]. Данный метод можно применять для диагностики дефектов цитоскелета (*MYH9*, *TUBB1*- и *FLNA*-макротромбоцитопении, синдром Вискотта–Олдрича), дефицитов мембранных гликопротеинов (тромбастения Гланцмана и синдром Бернара–Сулье), а также различных дефектов α - и плотных гранул (синдром серых тромбоцитов, *GATA1*- и *GF11b*-мутации, синдром Германски–Пудлака и т. д.). Однако метод неприменим для тромбоцитопатий, связанных с дефектами сигнальных путей [9].

В научной литературе уже есть ряд статей о том, что иммунофлуоресцентный метод анализа мазков крови может быть успешно использован для диагностики наследственных нарушений тромбоцитов [6–8, 10]. На настоящий момент отсутствуют коммерческие диагностические тест-системы для иммунофлуоресцентной оценки мазков крови пациентов с наследственными нарушениями тромбоцитов.

Цель исследования – провести сравнительный анализ наборов отечественных и импортных антител для иммунофлуоресцентного анализа мазков крови при диагностике двух наиболее распространенных нарушений тромбоцитов, связанных с дефектами

мембранных гликопротеинов: тромбастении Гланцмана и синдрома Бернара–Сулье.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования

В ретроспективное исследование включены деперсонифицированные результаты лабораторных исследований 26 пациентов в возрасте от 1 года до 65 лет, получавших стационарную или амбулаторную помощь в условиях НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Было 10 пациентов с установленным синдромом Бернара–Сулье и 16 – с тромбастенией Гланцмана. В качестве группы сравнения для каждой исследуемой патологии были использованы образцы крови 25 доноров отделения трансфузиологии, заготовки и процессинга гемопоэтических стволовых клеток НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Критерии соответствия

Критерии включения: возраст пациента старше 1 года на момент постановки диагноза, установленные диагнозы синдрома Бернара–Сулье или тромбастении Гланцмана. Диагноз считался подтвержденным, если симптомы, наблюдаемые у пациентов, соответствовали клинической картине заболевания, описанной в литературе, а также была идентифицирована мутация либо лабораторный тест, например проточная цитометрия, подтверждал диагноз, т. е. выраженное снижение или отсутствие комплексов гликопротеина IbIX при синдроме Бернара–Сулье или гликопротеина IIbIIIa (IIb β 3) при тромбастении Гланцмана.

Критерии невключения: возраст пациента младше 1 года, отсутствие установленного и подтвержденного синдрома Бернара–Сулье или тромбастении Гланцмана в соответствии с указанными выше критериями.

Условия и продолжительность исследования

Исследование выполнено на базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Период включения пациентов в данное исследование – 2020–2024 гг.

Материалы

Использовались фосфатно-солевой буфер Дульбекко pH 7,2 (HiMedia); козья сыворотка; первичные антитела: мышинные анти-CD42a (Bio-Rad, клон FMC-25), анти-CD42b (Имтек), анти-CD41 (Beckman Coulter, клон P2), анти-CD41 (Имтек); кроличьи антитела к тяжелой цепи немышечного миозина IIA (anti-NMMIIA) (Sigma Aldrich); вторичные антитела: козьи антитела к иммуноглобулинам кролика, меченые AF647 (Имтек), AlexaFluor568 (ThermoFisher), козьи антитела к иммуноглобулинам мыши, меченые AF488

(Имтек), AlexaFluor488 (ThermoFisher); флуоресцентная монтажная среда (Dako).

Приготовление мазков крови

Для приготовления мазков крови использовали свежую венозную кровь, взятую в вакуумные пробирки с цитратом натрия 3,2 или 3,8%. Мазки крови высушивали на воздухе при комнатной температуре в сухом месте не менее 1 сут, но не более 2 нед.

Фиксация образцов

Высушенные мазки крови фиксировали холодным ацетоном в течение 5 мин. После фиксации образцы в горизонтальном положении высушивали на воздухе до полного испарения ацетона. Зафиксированные и высушенные образцы можно использовать для иммунофлуоресцентной окраски.

Оценка связывания первичных антител

С помощью антител к CD42b (Имтек) и CD41 (Имтек), используемых в дальнейшем для создания тест-системы, было проанализировано 50 образцов мазков крови, полученных от 5 здоровых доноров (позитивный контроль), и 50 образцов мазков крови, полученных от 5 пациентов с подтвержденной патологией (отрицательный контроль), предварительно охарактеризованных с помощью мышиных анти-CD42a (Bio-Rad, клон FMC-25) и анти-CD41 (Beckman Coulter, клон P2). В качестве отрицательного контроля для антител к CD41 были использованы образцы пациентов с 1-м и 2-м типами тромбастении Гланцмана, а для анализа антител к CD41 – образцы пациентов с синдромом Бернара–Сулье с гомозиготной мутацией.

Оценка связывания вторичных антител

С использованием козьих антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуорофором AF488 (Имтек) было проанализировано 50 образцов мазков крови, полученных от 5 здоровых доноров с предварительно нанесенными антителами к CD41 (Имтек) (позитивный контроль), и 50 образцов мазков крови, полученных от 5 здоровых доноров без первичных антител (отрицательный контроль), предварительно охарактеризованных с помощью козьих антител к иммуноглобулинам мыши, меченых AlexaFluor488 (ThermoFisher).

Апробация набора антител в рамках клинических испытаний

Были отобраны образцы крови пациентов с подтвержденным диагнозом тромбастении Гланцмана, включая 1–3-й типы, а также образцы пациентов с синдромом Бернара–Сулье.

Для окрашивания образцов пациентов с тромбастенией Гланцмана применялись мышиные антитела анти-CD41 (Имтек). Образцы пациентов с синдромом Бернара–Сулье были проанализированы с использованием мышиных антител анти-CD42b (Имтек). Для идентификации тромбоцитов образцы дополнительно окрашивались кроличьими антителами анти-NMMIIA (Sigma Aldrich).

Оптимизация хранения образцов

Для оптимизации процедуры подготовки образцов мазков крови к длительному хранению и оценки их устойчивости при различных условиях хранения были созданы 3 группы по 50 опытных образцов. Первая группа – образцы после фиксации, которые хранились при температуре -20°C ; вторая группа – образцы после фиксации, которые хранились при комнатной температуре; третья группа – образцы, упакованные в вакуумную фольгированную упаковку, которые хранились при комнатной температуре. На 0, 4, 8, 12 и 16-й неделях проводили качественную оценку в изменении окрашивания антителами к CD41 или к CD42b.

Имунофлуоресцентное окрашивание мазков крови

Если зафиксированные образцы хранили при -20°C , то перед окрашиванием их инкубировали в горизонтальном положении в течение 30 мин при комнатной температуре и нормальной влажности. Затем проводили инкубацию с 10% козьей сывороткой в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. После этого инкубировали образцы с первичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. После инкубации с первичными антителами образцы промывали 3 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером Дульбекко pH 7,2. Инкубацию со вторичными антителами проводили в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере в темноте. После инкубации со вторичными антителами образцы промывали 3 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером Дульбекко pH 7,2. Удаляли со стекол излишки жидкости, наносили флуоресцентную среду для заключения, закрывали покровным стеклом. Готовые образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа, экспрессию интересующего белка оценивали по сравнению с нормальным контролем, окрашенным параллельно.

Для валидации первичных антител и конъюгатов вторичных антител в качестве контрольных использовали антитела зарубежного производства (анти-CD42a (Bio-Rad, клон FMC-25) и анти-CD41 (Beckman Coulter, клон P2)), об использовании которых ранее сообщалось в литературе [7].

Статистическая обработка результатов клинических испытаний

Данные, полученные в результате тестирования мазков крови от здоровых доноров и доноров с патологией, оформляли в виде таблицы сопряженности 2×2 , при помощи которых были оценены такие параметры используемых препаратов или конъюгатов антител, как чувствительность (доля образцов мазков крови, в которых точно определяется наличие заданного белка данным тестом), специфичность (доля образцов мазков крови без заданного белка, которые точно идентифицированы тестом), прогностическая значимость положительного результата теста (доля образцов мазков крови с положительным результатом критерия, которые имеют исследуемый антиген) и прогностическая значимость отрицательного результата теста (доля образцов мазков крови с отрицательным результатом критерия, которые не имеют исследуемый антиген). На основе этих таблиц были рассчитаны величина критерия Хи-квадрат с поправкой Йетса, достигнутый уровень значимости (p) и 95% доверительный интервал для разности популяционных пропорций. Расчеты осуществлялись в программе Microsoft Excel версии 16.89.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристики исследуемой популяции

В исследование были включены 26 пациентов: 10 с синдромом Бернара–Суллье и 16 с тромбастенией Гланцмана. Общая характеристика пациентов приведена в таблице 1.

Оценка связывания первичных антител

На рисунке 1 представлены типичные микрофотографии тромбоцитов здоровых доноров (позитивный контроль) и пациентов (негативный контроль), окрашенных исследуемыми (анти-CD41 и анти-CD42b, компания Имтек) и контрольными (анти-CD41

(Beckman Coulter, клон P2) и анти-CD42a (Bio-Rad, клон FMC-25)) антителами. Обобщенная статистика с расчетом чувствительности, специфичности, прогностичности положительного и отрицательного результатов представлена в *таблицах 2–5*. Отечественные антитела по своим характеристикам не уступают импортным аналогам и могут использоваться для иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови.

Оценка связывания вторичных антител

На рисунке 2 показаны типичные микрофотографии тромбоцитов, окрашенных с использованием исследуемых и контрольных вторичных антител. Обобщенная статистика приведена в *таблицах 6, 7*. Существенных различий между отечественными и импортными антителами не выявлено.

Апробация набора антител в рамках клинических испытаний

Как видно из рисунка 3А, тромбоциты пациентов с тромбастенией Гланцмана 1-го и 2-го типов имеют нормальные размеры и демонстрируют снижение экспрессии гликопротеина IIbIIIa. Однако для тромбастении Гланцмана 3-го типа не было выявлено существенных различий в связывании антител с гликопротеином IIbIIIa.

Для синдрома Бернара–Суллье (рисунок 3Б) характерны увеличенные в размерах тромбоциты, лишённые окрашивания гликопротеина IblX.

Результаты клинических испытаний выборки пациентов с подтвержденным синдромом Бернара–Суллье и подтвержденной тромбастенией Гланцмана приведены в *таблицах сопряженности (таблицы 8, 9)*.

Используя данные, представленные в *таблице 8*, для выборки пациентов с подтвержденным синдромом Бернара–Суллье была рассчитана статистика критерия χ^2 Пирсона, равного 30,25, при уровне значимости $p = 0,00000004$. Это свидетельствует о том, что доля пациентов с нормальной экспрессией CD42⁺ не

Таблица 1
Характеристика пациентов с наследственными тромбоцитопатиями
Table 1
Characteristics of the patients with hereditary thrombocytopathies

Патология Disorder	Общее число пациентов Total number of patients	Диагноз подтвержден лабораторными тестами The diagnosis was confirmed by laboratory tests	Диагноз подтвержден генетическими тестами The diagnosis was confirmed by genetic tests	Пол (мужской/женский) Sex (male/female)	Возраст, годы Age, years	Характерные морфологические особенности Typical morphological features
Синдром Бернара–Суллье Bernard–Soulier syndrome	10	10	7	8/2	5 (3–16)	Увеличенные тромбоциты со сниженным или полностью отсутствующим сигналом по гликопротеину IblX Enlarged platelets with reduced or completely absent glycoprotein IblX signal
Тромбастения Гланцмана Glanzmann thrombasthenia	16	16	3	12/4	9 (1–65)	Тромбоциты нормального размера со сниженным или полностью отсутствующим сигналом по гликопротеину IIbIIIa Platelets of normal size with reduced or completely absent glycoprotein IIbIIIa signal

Рисунок 1

Оценка связывания первичных антител: мышиных анти-CD42b (панель А) и анти-CD41 (панель Б)

Приведены типичные микрофотографии тромбоцитов здоровых доноров (положительный контроль) и пациентов (негативный контроль), окрашенных исследуемыми (анти-CD41 и анти-CD42b, компания Имтек) и контрольными (анти-CD41 (Beckman Coulter, клон P2) и анти-CD42a (Bio-Rad, клон FMC-25)) антителами

Figure 1

The assessment of primary antibody binding: mouse anti-CD42b (panel A) and anti-CD41 (panel B)

Shows typical micrographs of platelets from healthy donors (positive control) and patients (negative control), stained with the test antibodies (anti-CD41 and anti-CD42b from Imtek company) and control antibodies (anti-CD41 (Beckman Coulter, clone P2) and anti-CD42a (Bio-Rad, clone FMC-25))

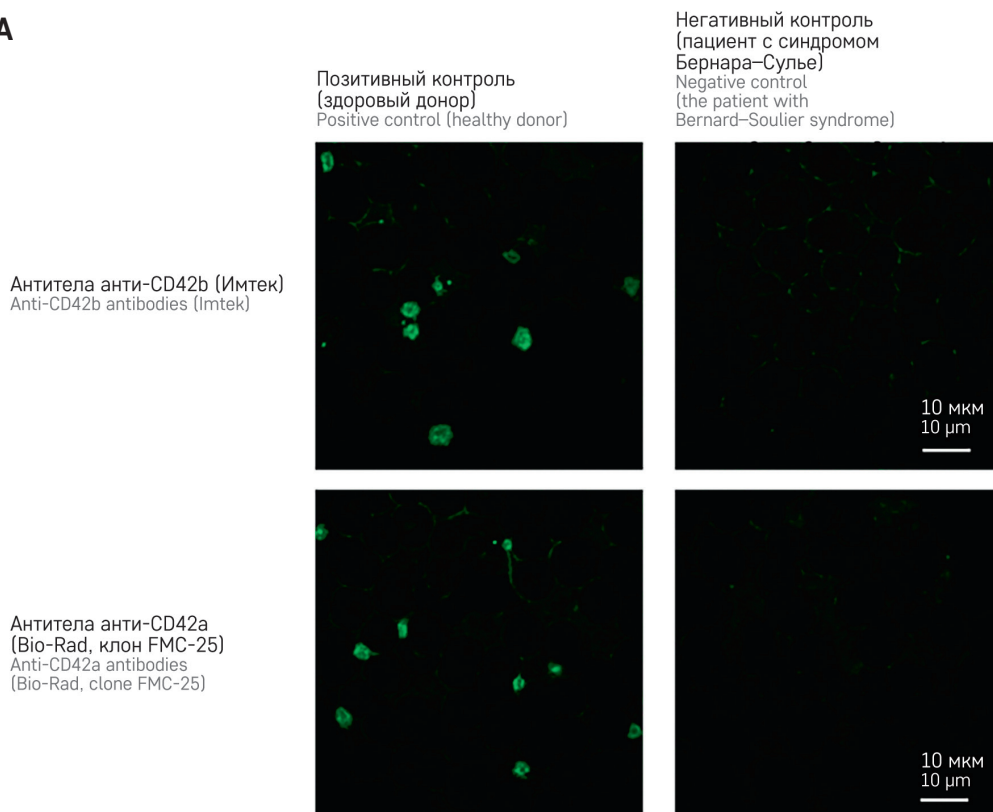
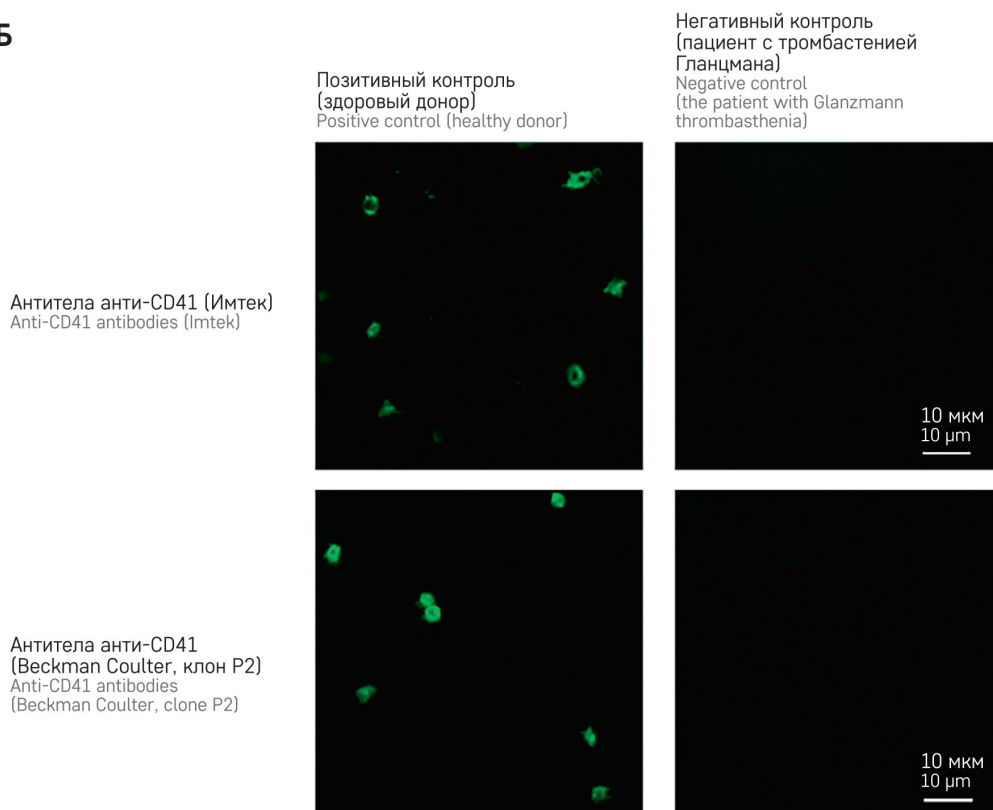
А**Б**

Таблица 2

Сравнение антител анти-CD42b (Имтек) и CD42a (Bio-Rad, клон FMC-25)

Table 2

A comparison of anti-CD42b antibodies (Imtek) and CD42a antibodies (Bio-Rad, clone FMC-25)

Показатель Parameter		Мышиные антитела анти-CD42a (Bio-Rad, клон FMC-25) Mouse anti-CD42a antibodies (Bio-Rad, clone FMC-25)		Всего Total
		Позитивный контроль Positive control	Негативный контроль Negative control	
Мышиные антитела анти-CD42b (Имтек) Mouse anti-CD42b antibodies (Imtek)	Позитивный контроль Positive control	50	0	50 + 0 = 50
	Негативный контроль Negative control	0	50	0 + 50 = 50
Всего Total		50 + 0 = 50	0 + 50 = 50	50 + 0 + 0 + 50 = 100

Таблица 3

Данные для мышиных антител анти-CD42b (Имтек)

Table 3

Data for mouse anti-CD42b antibodies (Imtek)

Параметр Parameter	Значение Value
Чувствительность, % Sensitivity, %	$100\% \times 50 / (50 + 0) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)
Специфичность, % Specificity, %	$100\% \times 50 / (0 + 50) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)
Прогностичность положительного результата теста, % Positive predictive value, %	$100\% \times 50 / (50 + 0) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)
Прогностичность отрицательного результата теста, % Negative predictive value, %	$100\% \times 50 / (0 + 50) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)

Примечание. Здесь и в таблицах 5, 7: ДИ – доверительный интервал.
Note. Here and in tables 5, 7: CI – confidence interval.

Таблица 4

Сравнение антител анти-CD41 производства Имтек и Beckman Coulter

Table 4

A comparison of anti-CD41 antibodies from Imtek and Beckman Coulter

Показатель Parameter		Мышиные антитела анти-CD41 (Beckman Coulter, клон P2) Mouse anti-CD41 antibodies (Beckman Coulter, clone P2)		Всего Total
		Позитивный контроль Positive control	Негативный контроль Negative control	
Мышиные антитела анти-CD41 (Имтек) Mouse anti-CD41 antibodies (Imtek)	Позитивный контроль Positive control	50	0	50 + 0 = 50
	Негативный контроль Negative control	0	50	0 + 50 = 50
Всего Total		50 + 0 = 50	0 + 50 = 50	50 + 0 + 0 + 50 = 100

Таблица 5

Данные для мышиных антител анти-CD41 (Имтек)

Table 5

Data for mouse anti-CD41 antibodies (Imtek)

Параметр Parameter	Значение Value
Чувствительность, % Sensitivity, %	$100\% \times 50 / (50 + 0) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)
Специфичность, % Specificity, %	$100\% \times 50 / (0 + 50) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)
Прогностичность положительного результата теста, % Positive predictive value, %	$100\% \times 50 / (50 + 0) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)
Прогностичность отрицательного результата теста, % Negative predictive value, %	$100\% \times 50 / (0 + 50) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)

является одинаковой для исследованных выборок. Различие между группами оценивается как 100%; 95% доверительный интервал для этого различия составляет 0%.

Таким образом, получается, что сниженная экспрессия или полное отсутствие CD42⁺-тромбоцитов в мазке крови пациента почти всегда означает наличие синдрома Бернара–Сулье.

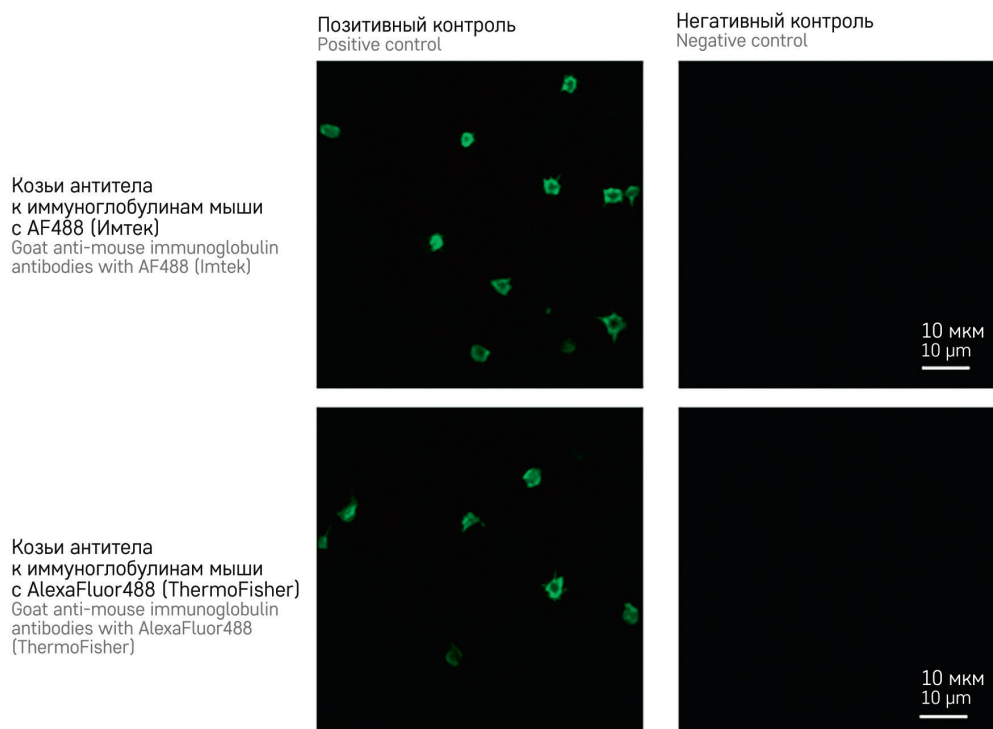
Используя данные, приведенные в таблице 9, для выборки пациентов с подтвержденной тромбастенией Гланцмана была рассчитана статистика критерия χ^2 Пирсона, равного 29,47. Расчетное значение p для данной величины критерия χ^2 составляет 0,00000006. Это свидетельствует о том, что существует достоверное различие между здоровыми людьми и пациентами с тромбастенией Гланцмана по наличию

Рисунок 2**Оценка связывания вторичных антител**

Приведены типичные микрофотографии тромбоцитов здоровых доноров, предварительно окрашенных мышинными антителами анти-CD41 (позитивный контроль) или не окрашенных (негативный контроль). В качестве вторичных были использованы козы антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с флуорофором AF488 (Имтек) (исследуемые антитела), и козы антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с флуорофором AlexaFluor488 (ThermoFisher) (контрольные антитела)

Figure 2**The assessment of secondary antibody binding**

Shows typical micrographs of platelets from healthy donors, either pre-stained with mouse anti-CD41 antibodies (positive control) or unstained (negative control). As secondary antibodies, goat anti-mouse immunoglobulin antibodies conjugated with the AF488 fluorophore (Imtek) (test antibodies) and goat anti-mouse immunoglobulin antibodies conjugated with the AlexaFluor488 fluorophore (ThermoFisher) (control antibodies) were used

**Таблица 6****Сравнение вторичных антител производства Имтек и ThermoFisher****Table 6**

A comparison of secondary antibodies from Imtek and ThermoFisher

Показатель Parameter		Козы антитела к иммуноглобулинам мыши с AlexaFluor488 (ThermoFisher) Goat anti-mouse immunoglobulin antibodies with AlexaFluor488 (ThermoFisher)		Всего Total
		Позитивный контроль Positive control	Негативный контроль Negative control	
Козы антитела к иммуноглобулинам мыши с AF488 (Имтек) Goat anti-mouse immunoglobulin antibodies with AF488 (Imtek)	Позитивный контроль Positive control	50	0	50 + 0 = 50
	Негативный контроль Negative control	0	50	0 + 50 = 50
Всего Total		50 + 0 = 50	0 + 50 = 50	50 + 0 + 0 + 50 = 100

Таблица 7**Данные для козых антител к иммуноглобулинам кролика с AF488 (Имтек)****Table 7**

Data for goat anti-rabbit immunoglobulin antibodies with AF488 (Imtek)

Параметр Parameter	Значение Value
Чувствительность, % Sensitivity, %	$100\% \times 50 / (50 + 0) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)
Специфичность, % Specificity, %	$100\% \times 50 / (0 + 50) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100%)
Прогностичность положительного результата теста, % Positive predictive value, %	$100\% \times 50 / (50 + 0) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)
Прогностичность отрицательного результата теста, % Negative predictive value, %	$100\% \times 50 / (0 + 50) = 100\%$ (95% ДИ/CI 100–100)

Рисунок 3

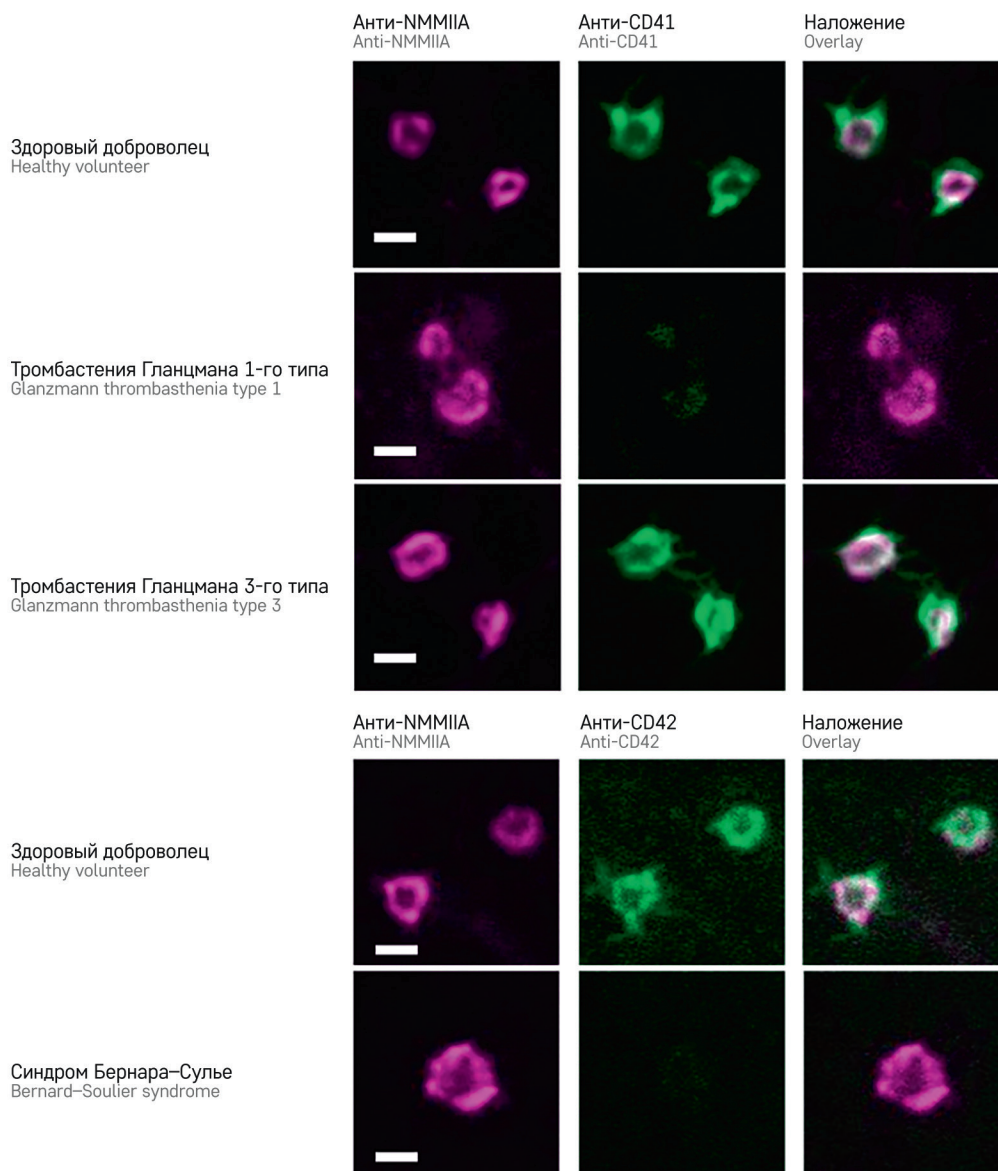
Типичные микрофотографии тромбоцитов пациентов с дефектами мембранных гликопротеинов: панель А – IIb/IIIa (тромбастения Гланцмана), панель Б – IblX (синдром Бернара–Сулье)

Для идентификации тромбоцитов были использованы антитела анти-NMMIIA (показано пурпурным цветом). Флуоресценция антител к гликопротеинам IIb/IIIa (анти-CD41 (Имтек)) и IblX (анти-CD42b (Имтек)) показана зеленым цветом. Масштаб горизонтальных отрезков, нанесенных на микрофотографии, соответствует 3 мкм

Figure 3

Shows typical micrographs of platelets from the patients with membrane glycoprotein defects: panel A – IIb/IIIa (Glanzmann thrombasthenia), panel Б – IblX (Bernard–Soulier syndrome)

Anti-NMMIIA antibodies (shown in purple) were used to identify platelets. Fluorescence of antibodies to glycoproteins IIb/IIIa (anti-CD41 (Imtek)) and IblX (anti-CD42b (Imtek)) is shown in green. The horizontal scale bars shown in the micrographs correspond to 3 μm



или отсутствию CD41⁺-тромбоцитов в исследуемых образцах мазков крови. Мы оцениваем это различие как 100% – 12,5% = 87,5%; 95% доверительный интервал для истинного различия в этих двухпроцентных отношениях составляет от 71,4 до 100%.

Таким образом, можно сделать вывод, что снижение экспрессии или полное отсутствие CD41⁺-тромбоцитов в мазке крови пациента с высокой вероятностью (87%) указывает на наличие тромбастении Гланцмана.

Опытное хранение образцов мазков крови

При хранении образцов в течение 16 нед наиболее выраженные изменения при окрашивании анти-CD42b наблюдаются в образцах, хранящихся при комнатной температуре без вакуумной упаковки (рисунок 4). В данных образцах к 16-й неделе существенно снижается интенсивность окраски анти-CD42b. В остальных случаях (хранение при –20°C, в вакуумной фольгированной упаковке при комнатной температуре) существенных изменений в окраске

Таблица 8

Таблица сопряженности для выборки пациентов с синдромом Бернара–Сулье

Table 8

A contingency table for a sample of patients with Bernard–Soulier syndrome

Наличие CD42 ⁺ -тромбоцитов The presence of CD42 ⁺ platelets	Подтвержденный синдром Бернара–Сулье Confirmed Bernard–Soulier syndrome				Всего Total
	Нет (здоровый донор) No (healthy donor)		Да Yes		
	Фактическая частота Observed frequency	Ожидаемая частота Expected frequency	Фактическая частота Observed frequency	Ожидаемая частота Expected frequency	
Имеются Present	25	$25 \times 25 / 35 = 17,86$	0	$10 \times 25 / 35 = 7,14$	25
Отсутствуют (сниженная экспрессия или полное отсутствие) Absent (reduced expression or complete absence)	0	$25 \times 10 / 35 = 7,14$	10	$10 \times 10 / 35 = 2,86$	10
Всего Total	25	25	10	10	35
Доля пациентов с данным свойством The proportion of patients with this characteristic	$25 / 25 = 1$		$0 / 10 = 0$		$(25 + 0) / 35 = 0,71$

Таблица 9

Таблица сопряженности для выборки пациентов с тромбастенией Гланцмана

Table 9

A contingency table for a sample of patients with Glanzmann thrombasthenia

Наличие CD41 ⁺ -тромбоцитов The presence of CD41 ⁺ platelets	Подтвержденный синдром Бернара–Сулье Confirmed Bernard–Soulier syndrome				Всего Total
	Нет (здоровый донор) No (healthy donor)		Да Yes		
	Фактическая частота Observed frequency	Ожидаемая частота Expected frequency	Фактическая частота Observed frequency	Ожидаемая частота Expected frequency	
Имеются Present	25	$25 \times 27 / 41 = 16,46$	0	$16 \times 27 / 41 = 10,54$	25
Отсутствуют (сниженная экспрессия или полное отсутствие) Absent (reduced expression or complete absence)	0	$25 \times 14 / 41 = 8,54$	10	$16 \times 14 / 41 = 5,46$	14
Всего Total	25	25	16	16	41
Доля пациентов с данным свойством The proportion of patients with this characteristic	$25 / 25 = 1$		$2 / 16 = 0,125$		$(25 + 2) / 41 = 0,66$

гликопротеина IbIX антителами анти-CD42b в течение 16 нед не наблюдается.

При хранении образцов в течение 16 нед наиболее выраженные изменения при окрашивании анти-CD41 наблюдаются в образцах, хранящихся при комнатной температуре без вакуумной фольгированной упаковки (рисунки 5). В данных образцах к 16-й неделе хранения наблюдается существенное снижение окрашивания гликопротеина IIbIIIa антителами анти-CD41. В остальных случаях (хранение при -20°C , в вакуумной фольгированной упаковке при комнатной температуре) существенных изменений в окраске гликопротеина IIbIIIa антителами анти-CD41 в течение 16 нед не наблюдается.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работы было проведено качественное сравнение отечественных антител с импортными

аналогами, о применении которых для иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови ранее сообщалось в литературе [6, 7, 11]. В первую очередь были оценены чувствительность и специфичность первичных антител к поверхностным гликопротеинам тромбоцитов: IIbIIIa (CD41) и IbIX (CD42), а также соответствующих вторичных флуоресцентно меченых антител. Результаты исследования показали, что исследуемые отечественные антитела не уступают импортным аналогам. Это открывает возможность для создания на их основе тест-системы для диагностики двух наиболее распространенных наследственных патологий тромбоцитов, связанных с дефицитом поверхностных гликопротеинов: тромбастении Гланцмана (дефицит гликопротеина IIbIIIa) и синдрома Бернара–Сулье (дефицит гликопротеина IbIX).

Кроме того, мы провели испытания разработанной тест-системы для диагностики вышеупомянутых патологий. Результаты показали, что у всех

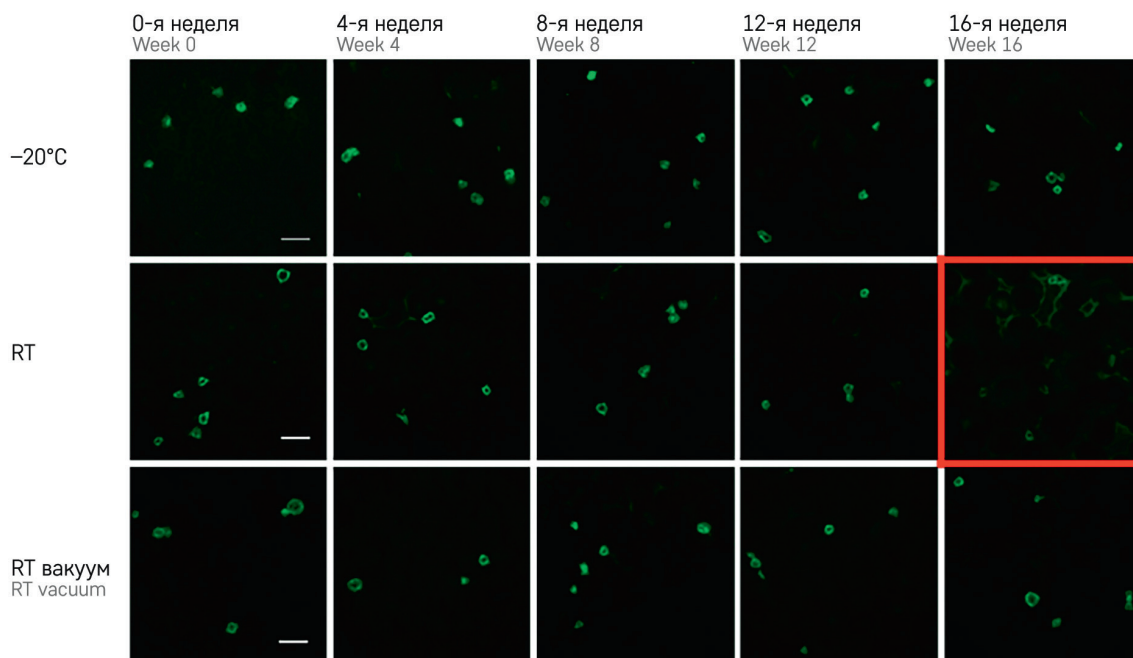
Рисунок 4

Изменение в окрашивании гликопротеина IblX антителами анти-CD42b (Имтек) при хранении фиксированных образцов в различных условиях
Красной рамкой выделена микрофотография с выраженным снижением интенсивности флуоресценции анти-CD42b. Масштаб горизонтальных отрезков, нанесенных на микрофотографии, соответствует 10 мкм. RT – комнатная температура

Figure 4

The changes in glycoprotein IblX staining with anti-CD42b antibodies (Imtek) during the storage of fixed samples under various conditions

The micrograph outlined in red shows a marked decrease in anti-CD42b fluorescence intensity. The horizontal scale bars shown in the micrographs correspond to 10 μ m. RT – room temperature

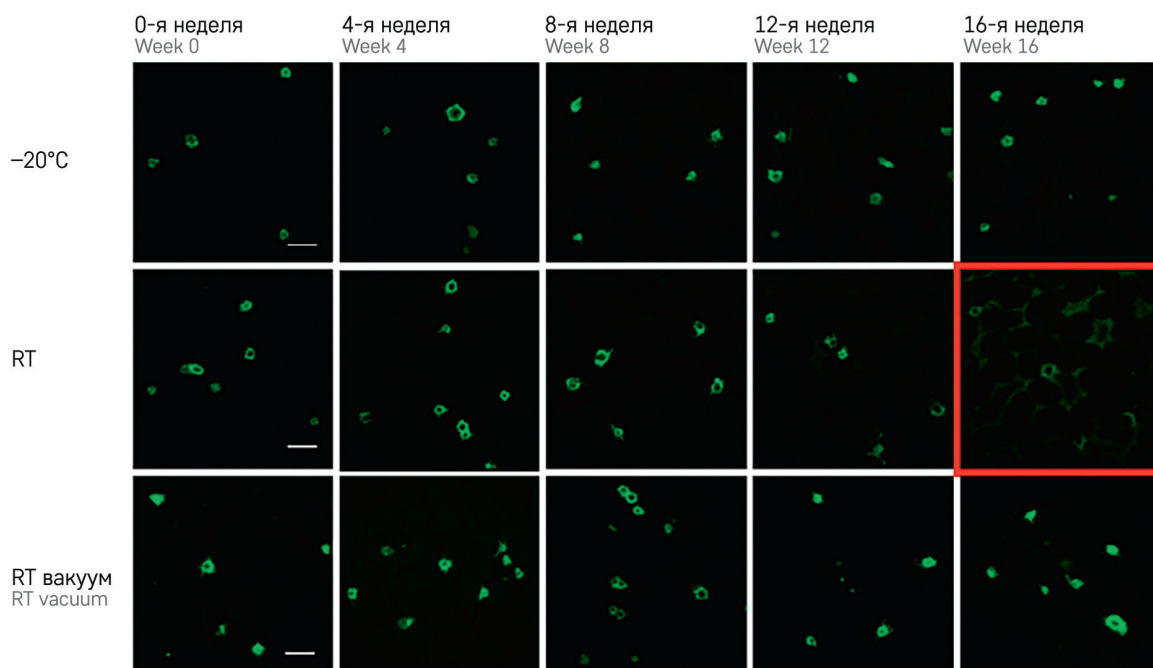
**Рисунок 5**

Изменение в окрашивании гликопротеина IIbIIIa антителами анти-CD41 (Имтек) при хранении фиксированных образцов в различных условиях
Красной рамкой выделена микрофотография с выраженным снижением интенсивности флуоресценции анти-CD41. Масштаб горизонтальных отрезков, нанесенных на микрофотографии, соответствует 10 мкм. RT – комнатная температура

Figure 5

The changes in glycoprotein IIbIIIa staining with anti-CD41 antibodies (Imtek) during the storage of fixed samples under various conditions

The micrograph outlined in red shows a marked decrease in anti-CD41 fluorescence intensity. The horizontal scale bars shown in the micrographs correspond to 10 μ m. RT – room temperature



пациентов ($n = 10$) с подтвержденным синдромом Бернара–Суллье экспрессия гликопротеина IblX была снижена или отсутствовала полностью. Следует отметить, что необходимо продолжить клинические испытания, чтобы увеличить число пациентов. В литературе есть данные о том, что для некоторых пациентов с гетерозиготной формой мутации в гене, кодирующем гликопротеин IblX, постановка диагноза с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови может быть затруднительной [7]. В нашей выборке только 1 пациент имел гетерозиготную форму мутации, и даже для него мы смогли однозначно продемонстрировать снижение экспрессии гликопротеина IblX.

Из 16 пациентов с подтвержденной тромбастенией Гланцмана только у 2 (13%) не удалось выявить снижение или отсутствие экспрессии гликопротеина IblIla. У этих пациентов была диагностирована тромбастения Гланцмана 3-го типа. В данном случае проблема заключалась не в количестве или отсутствии гликопротеина IblIla, а в его функциональной несостоятельности. Количество гликопротеина было в норме, что подтверждалось мазками крови и цитометрией. Однако рецептор не выполнял свои функции должным образом.

Полученные в рамках этой работы данные о клинической применимости иммунофлуоресцентного анализа мазков крови для диагностики тромбастении Гланцмана и синдрома Бернара–Суллье совпадают с опубликованными ранее результатами командой профессора Грайнахера [12].

Не менее важным аспектом при создании диагностических тест-систем являются правильная подготовка проб и обеспечение их сохранности во время хранения и транспортировки. Наглядно показано, что образцы мазков крови остаются стабильными для оценки экспрессии как гликопротеина IblX, так и гликопротеина IblIla в течение как минимум 16 нед при температуре -20°C . А если поместить образцы в герметичную вакуумную фольгированную упаковку, то температуру хранения можно увеличить до $20-25^{\circ}\text{C}$. Это значительно упрощает транспортировку мазков крови из регионов России, где не всегда есть возможность оперативно провести подобную диагностику.

Ограничения исследования

Ключевым ограничением данного исследования является небольшая выборка пациентов с наследственными тромбоцитопатиями, что представляет собой объективную трудность при изучении редких патологий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена валидация набора первичных и вторичных антител к гликопротеинам тромбоцитов IblIla (CD41) и IblX (CD42). Показана высокая диагностическая точность метода иммунофлуоресцентного анализа мазков крови с использованием данных реагентов: для синдрома Бернара–Суллье 100% совпадение с клиническим диагнозом, а для тромбастении Гланцмана чувствительность метода составила 87%. Кроме того, показана возможность хранения зафиксированных мазков крови в течение 16 нед при температуре -20°C или $20-25^{\circ}\text{C}$ в герметичной вакуумной фольгированной упаковке.

ЭТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА

В ретроспективное исследование включены деперсонифицированные результаты лабораторных исследований пациентов, поэтому оно не требовало одобрения независимого этического комитета.

ETHICS REVIEW

This retrospective study included depersonalized laboratory test results of the patients; therefore, it did not require approval from an Independent Ethics Committee.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №24-15-00387 «От физиологии тромбоцита к инновационным методам лабораторной диагностики».

FUNDING

The work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 24-15-00387 "From platelet physiology to innovative methods of laboratory diagnosis".

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

CONFLICT OF INTEREST

The authors of the article confirm that there is no conflict of interest to declare.

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.А. Подоплелова, Е.О. Осидак: разработка дизайна статьи, анализ данных, написание и редактирование текста;
П.А. Жарков: пересмотр и редактирование текста;
Е.В. Юшкова, Д.Б. Флоринский, Д.В. Федорова, Д.М. Полохов: сбор и анализ данных.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.A. Podoplelova, E.O. Osidak: article design, data analysis, manuscript writing and editing;
P.A. Zharkov: manuscript revision and editing;
E.V. Yushkova, D.B. Florinskiy, D.V. Fedorova, D.M. Polokhov: data collection and analysis.

ORCID

N.A. Podoplelova: <https://orcid.org/0000-0001-8013-1112>
E.V. Yushkova: <https://orcid.org/0009-0007-3456-9616>
D.B. Florinskiy: <https://orcid.org/0000-0003-4555-9337>
D.V. Fedorova: <https://orcid.org/0000-0003-4567-1871>
D.M. Polokhov: <https://orcid.org/0000-0001-6905-2878>
P.A. Zharkov: <https://orcid.org/0000-0003-4384-6754>
E.O. Osidak: <https://orcid.org/0000-0003-2549-4011>

Литература / References

- Gresele P.; Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Diagnosis of Inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. 2015;13:314–22. DOI: 10.1111/jth.12792
- Watson S.P., Lowe G.C., Lordkipanidzé M., Morgan N.V.; GAPP consortium. Genotyping and phenotyping of platelet function disorders. *J Thromb Haemost* 2013;11:351–63. DOI: 10.1111/jth.12199
- Фёдорова Д.В., Жарков П.А., Плясунова С.А., Серёгина Е.А., Игнатова А.А. Диагностика врожденных нарушений функций тромбоцитов: современное состояние вопроса. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2017;1:83–95. [D.V. Fedorova, P.A. Zharkov, S.A. Plyasunova, E.A. Seregina, A.A. Ignatova Diagnosis of congenital platelet function disorders: the current state of the issue. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2017;1:83–95. (In Russ.)].
- Bolton-Maggs P.H.B., Chalmers E.A., Collins P.W., Harrison P., Kitchen S., Liesner R.J. et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006;135:603–33. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06343.x
- Boender J., Kruip M.J.H.A., Leebeek F.W.G. A diagnostic approach to mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2016;14:1507–16 DOI: 10.1111/jth.13368
- Юшкова Е.В., Подоплелова Н.А., Федорова Д.В., Хорева А.Л., Щербина А.Ю., Жарков П.А. и др. Опыт использования иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови для диагностики наследственных тромбоцитопатий. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2023;22:43–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-43-47 [Yushkova E.V., Podoplelova N.A., Fedorova D.V., Khoreva A.L., Shcherbina A.Yu., Zharkov P.A. et al. A single-center experience of using immunofluorescence staining of blood smears for the diagnosis of hereditary thrombocytopathies. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2023;22:43–7. (In Russ.)].
- Greinacher A., Pecci A., Kunitshima S., Althaus K., Nurden P., Balduini C.L. et al. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2017;15:1511–21. DOI: 10.1111/jth.13729
- Handtke S., Wesche J., Palankar R., Greinacher A., Thiele T. Function of large and small platelets differs, depending on extracellular calcium availability and type of inductor. *Thromb Haemost* 2020;120:1075–86. DOI:10.1055/s-0040-1712447
- Свешникова А.Н., Степанян М.Г., Пантелеев М.А. Функциональные ответы тромбоцитов и внутриклеточная сигнализация: молекулярные связи. Часть 1: ответы. Системная биология и физиология 2022;1:14–23. [Sveshnikova A.N., Stepanyan M.G., Panteleev M.A. Platelet functional responses and intracellular signaling: molecular interactions. Part 1: responses. *System Biology and Physiology*. 2022;1:14–23. (In Russ.)].
- Мартьянов А.А., Тесаков И.П., Ан О.И., Юшкова Е.В., Подоплелова Н.А., Хачатрян Л.А. и др. *In vitro* и *in silico* исследование CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах пациентов с капюшформной гемангиоэндотелиомой. Системная биология и физиология 2022;1(2):72. [Martyanov A.A., Tesakov I.P., An O.I., Yushkova E.V., Podoplelova N.A., Khachatryan L.A. et al. *In vitro* and *in silico* investigation of CLEC-2-induced signaling in platelets from patients with kaposiform hemangioendothelioma. *System Biology and Physiology*. 2022;1(2):72. (In Russ.)].
- Zaninetti C., Greinacher A. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear. *J Clin Med* 2020;9:539. DOI: 10.3390/JCM9020539.
- Zaninetti C., Leinøe E., Lozano M.L., Rossing M., Bastida J.M., Zetterberg E. et al. Validation of immunofluorescence analysis of blood smears in patients with inherited platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2023;21:1010–9. DOI: 10.1016/J.JTHA.2022.12.031