

© 2021 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 20.11.2020
Принята к печати 02.02.2021

DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-58-65

Особенности пула хранения и морфологии тромбоцитов у детей с неуточненным геморрагическим синдромом

Д.М. Полохов¹, А.В. Пшонкин¹, А.А. Игнатова¹, Е.А. Пономаренко¹, Д.В. Федорова¹,
М.Ю. Алексенко¹, К.А. Воронин¹, Е.А. Серегина¹, А.В. Полетаев¹, Г.А. Новичкова¹,
М.А. Пантелеев¹⁻⁴, П.А. Жарков¹

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

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

⁴ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный

Несмотря на современные возможности лабораторной диагностики геморрагического синдрома, у некоторых пациентов причины кровоточивости остаются неуточненными. Среди данных причин потенциально могут скрываться легкие дефекты тромбоцитарного звена гемостаза. Цель работы: выявить особенности функции тромбоцитарного звена гемостаза у детей с неуточненным геморрагическим синдромом. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Обследованы 50 пациентов в возрасте от 2 до 17 лет с различными проявлениями кровоточивости и отсутствием лабораторных данных за коагулопатию и/или тромбоцитопению, проведена цитофлуориметрия тромбоцитов с активацией. Оценены морфологические характеристики тромбоцитов по размеру/гранулярности (FSC/SSC), плотность рецептора CD62p как маркера секреции α -гранул, δ -гранулы тромбоцитов по флуоресценции загруженного мепакрина. Активация тромбоцитов производилась смесью CRP + TRAP. Сравнение проводили с результатами обследования 50 условно здоровых детей (контрольная группа, КГ) в возрасте от 2 до 17 лет. Выраженность геморрагического синдрома оценивалась при помощи стандартизованной шкалы ISTH BAT. Тяжесть геморрагических проявлений по шкале ISTH BAT составила от 2 до 6 баллов. В результате проведенного исследования были выделены 2 группы пациентов, различающиеся по расчетному параметру отношению FSC/SSC, для неактивированных тромбоцитов. В КГ медиана FSC/SSC составила 1,235 (от 1,1 до 1,4), в группе 1 ($n = 19$) – 0,97 (от 0,9 до 1,05), и в группе 2 ($n = 31$) – 1,24 (от 1,11 до 1,43). Количество тромбоцитов достоверно не различалось между КГ и группами пациентов 1 и 2. В группах пациентов наблюдалась достоверная корреляционная связь между уменьшением количества тромбоцитов и увеличением их размера и гранулярности с сохранением высокой корреляционной связи между размером и гранулярностью. В группе 1 общая гранулярность была повышена независимо от размера и количества тромбоцитов, были увеличены объем плотных гранул и мембранный CD62p, но снижен гранулярный CD62p. Механизм дегрануляции не был нарушен в обеих группах пациентов. Полученные нами результаты убедительно указывают на вклад нарушений пула хранения и морфологии тромбоцитов в развитие геморрагических проявлений у детей с неуточненным геморрагическим синдромом.

Ключевые слова: дети, кровоточивость, геморрагический синдром, тромбоциты, тромбоцитопатия

Полохов Д.М. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2021; 20 (1): 58–65.
DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-58-65

Specificities of the storage pool and morphology of platelets in children with unspecified hemorrhagic syndrome

D.M. Polokhov¹, A.V. Pshonkin¹, A.A. Ignatova¹, E.A. Ponomarenko¹, D.V. Fedorova¹, M.Yu. Aleksenko¹,
K.A. Voronin¹, E.A. Seregina¹, A.V. Poletaev¹, G.A. Novichkova¹, M.A. Panteleev¹⁻⁴, P.A. Zharkov¹

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

²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow

³Lomonosov Moscow State University, Moscow

⁴Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

Despite modern possibilities of laboratory diagnosis of hemorrhagic syndrome, in some patients, the causes of bleeding remain unspecified. Among these reasons, mild defects in the platelet link of hemostasis can potentially be hidden. The aim of the study is to identify the features of the function of the platelet hemostasis in children with unspecified hemorrhagic syndrome. This study is supported by the Independent Ethics Committee and approved by the Academic Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. We examined 50 patients aged 2 to 17 years with various manifestations of bleeding and lack of laboratory data proving coagulopathy and/or thrombocytopenia; platelet cytofluorimetry with activation was performed. The morphological characteristics of platelets in terms of size/granularity (FSC/SSC), the density of the CD62p receptor as a marker of α -granule secretion, and δ -granules of platelets were assessed by the fluorescence of loaded mepacrine. Platelet activation was performed with a CRP + TRAP mixture. Comparison was carried out with the results of examination of 50 healthy children (control group – CG) aged 2 to 17 years. The severity of hemorrhagic syndrome was assessed using the standardized ISTH BAT score. The severity of hemorrhagic manifestations according to BAT ISTH score ranged from 2 to 6 points. As a result of the study, two groups of patients differing in the calculated parameter of the FSC/SSC ratio for non-activated platelets were identified. In the CG, the median FSC/SSC was 1.235 (from 1.1 to 1.4), in group 1 ($n = 19$), the median was 0.97 (from 0.9 to 1.05), and in group 2 ($n = 31$), the median was 1.24 (from 1.11 to 1.43). The number of platelets of the CG and the groups of patients did not differ significantly. A significant correlation between a decrease in the number of platelets and an increase in their size and granularity, while maintaining a high correlation between size and granularity was observed in groups of patients. In group 1, the overall granularity was increased regardless of the size and number of platelets, the volume of dense granules and membrane CD62p was increased, but the granular CD62p was decreased. The degranulation mechanism was not impaired in both groups of patients. Our results indicate convincingly the contribution of the storage pool and platelet morphology disorders to the development of hemorrhagic manifestations in children with unspecified hemorrhagic syndrome.

Key words: children, bleeding, hemorrhagic syndrome, platelets, thrombocytopenia

Polokhov D.M., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2021; 20 (1): 58–65.
DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-58-65

© 2021 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 20.11.2020

Accepted 02.02.2021

Correspondence:
Dmitry M. Polokhov,
pathologist, laboratory of clinical
hemostasis, Dmitry Rogachev National
Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology,
Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: dmitrii.polokhov@gmail.com

Тромбоцитопатии представляют собой гетерогенную группу заболеваний, точная распространенность которых неизвестна, но она может варьировать от 2/1 000 000 для некоторых аутосомно-рецессивных форм до 1/100 для некоторых легких дефектов секреции тромбоцитов [1–3].

На сегодняшний день такие тромбоцитопатии, как тромбоастения Гланцмана или синдром Бернара–Сулье, довольно легко идентифицировать, диагностика большинства других форм затруднена и требует комплексного анализа. Однако единые диагностические критерии для редких и особенно неклассифицированных тромбоцитопатий до сих пор не разработаны. Многие лабораторные методы, используемые для оценки, недостаточно стандартизованы, технически сложны и плохо воспроизводимы [4, 5]. В международном исследовании с участием 202 лабораторий из 37 стран описаны результаты обследования > 14 000 пациентов с диагнозом: врожденные нарушения функции тромбоцитов. Среди обследованных пациентов ~ у 60% (~ 8600 пациентов) не было выявлено нарушение функции тромбоцитов, а среди остальных больных (~ 5800) у 53,9% (~ 3100 пациентов) были обнаружены известные ранее тромбоцитопатии, однако, несмотря на установленные функциональные особенности, конкретный дефект тромбоцитарного звена не был верифицирован у 34,1% (~ 2200 пациентов) [1].

Нарушения количества тромбоцитов, их морфологии, фенотипа и внутриклеточных механизмов передачи сигналов определяют специфику дисфункции тромбоцитарного звена гемостаза и клиническую картину. Пациенты с микроциркуляторными кровоизлияниями в анамнезе (семейными или нет), у которых были исключены приобретенные лекарственные причины дисфункции тромбоцитов, иммунная тромбоцитопения, болезнь Виллебранда и нарушения плазменного звена гемостаза, нуждаются в лабораторных исследованиях для выявления тромбоцитопатии.

Оптическая агрегометрия (ОА) остается «золотым стандартом» для тестирования функции тромбоцитов из-за ее низкой стоимости и широкой распространенности, но преимущества проточной цитометрии для обнаружения фенотипа новых, ранее нераспознанных форм дисфункции тромбоцитов очевидны [4, 6]. Проточная цитометрия требует небольшого объема образца крови и позволяет оценивать количество, размер и гранулярность тромбоцитов, их функциональные маркеры, такие как гликопротеин Ib/V/IX, гликопротеин IIb/IIIa, CD62p, плотные гранулы (δ -гранулы), прокагулянтная активность и др., их изолированные или сочетанные нарушения в покое и после активации [4, 6–9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведено ретроспективное исследование, одобренное независимым этическим комитетом (протокол №8/2016 от 18.10.2016) и утвержденное решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. В качестве контрольной группы (КГ) были использованы образцы крови 50 условно здоровых добровольцев в возрасте 2–17 лет (медиана 10 лет), которые проходили плановое лабораторное обследование в условиях Центра по причинам, не связанным с жалобами на повышенную кровоточивость или другое заболевание крови (обследование в рамках ежегодных диспансеризаций или при необходимости проведения плановых оперативных вмешательств). В период с марта 2016 г. по февраль 2019 г. под наблюдением находились 50 пациентов с геморрагическим синдромом неустановленной этиологии, которым по результатам проведенного обследования были исключены диагнозы: коагулопатия, тромбоцитопения или болезнь Виллебранда. Проявления геморрагического синдрома были задокументированы в соответствии с требованием стандартизированной шкалы BAT от ISTH SSC [10]. Письменное информированное согласие было получено от всех официальных представителей пациентов и участников КГ.

Функциональная активность тромбоцитов: проточная цитометрия

В цитометрическом исследовании мы проанализировали морфологические характеристики тромбоцитов по прямому (FSC), характеризующему размер, и боковому (SSC) светорассеянию, характеризующему гранулярность клетки в состоянии покоя и после активации. Активацию проводили смесью TRAP-6 (аналог тромбина, агонист рецептора PAR-1) и CRP (аналог коллагена, агонист гликопротеина VI). CD62p (P-селектин) является маркером α -секреции, а мепакрин использован для идентификации нарушений δ -гранул тромбоцитов. После активации высвобождение α -гранул оценивалось с помощью определения отношения экспансированного (гранулярного) CD62p к мембранному CD62p (индекс дегрануляции α -гранул). Индекс дегрануляции плотных гранул определяли как отношение флуоресценции мепакрина в покое и после активации. Определение описанных маркеров было проведено на оборудовании и по методике, описанным ранее [7, 11, 12]. Для характеристики соотношения размера и гранулярности тромбоцитов был введен параметр FSC/SSC до и после активации. Количество тромбоцитов определяли с использованием проточного цитометра одновременно с фенотипированием образцов. Сравнение проводили с результатами обследования лиц КГ.

Статистический анализ

Анализ статистических различий проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни с уровнем значимости $p < 0,05$. Для корреляционного анализа был рассчитан коэффициент корреляции Пирсона и 95% доверительные интервалы (ДИ). Для анализа линейной зависимости использовалась линейная регрессия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика пациентов по количеству тромбоцитов, клинической картине и оценке кровоточивости

Обследованы 22 мальчика и 28 девочек (соотношение 1:1,27). Медиана возраста обращения составила 9 (2–17) лет. Количество тромбоцитов варьировало от 141 до 470 тыс/мкл с медианой 307 тыс/мкл. КГ составили 23 мальчика и 27 девочек (соотношение 1:1,17). Медиана возраста составила 10 (2–17) лет. Количество тромбоцитов варьировало от 157 до 459 тыс/мкл с медианой 274 тыс/мкл.

Пациенты имели тяжесть геморрагического синдрома от 2 до 6 баллов. Кровоточивость проявлялась в различных комбинациях экхимозов и петехиальной сыпи, носовых кровотечений (в том числе обильных, требующих госпитализации), кровоточивостью со слизистых ротовой полости, меноррагиями, повышенной кровоточивостью при оперативных вмешательствах и из мелких ран, после удаления зуба, гематурией, желудочно-кишечным кровотечением (прожилки крови в кале), гемартрозами. У 25 пациентов симптомы кровоточивости оценивались в 2 балла, у 25 – от 3 до 6 баллов по шкале BAT.

Проточная цитометрия

Анализ морфологии по FSC и SSC тромбоцитов в когорте пациентов позволил выделить 2 группы (рисунк 1А). В КГ медиана FSC/SSC для неактивированных тромбоцитов составила 1,235 (от 1,1 до 1,4), в группе из 19 (38%) пациентов (группа 1) – 0,97 (от 0,9 до 1,05), в группе из 31 (62%) пациента (группа 2) – 1,24 (от 1,11 до 1,43) (рисунк 1). Отношение FSC/SSC в группе 1 было достоверно ниже при сравнении с КГ и группой 2 ($p < 0,001$). Корреляция Пирсона между FSC и SSC тромбоцитов в состоянии покоя в КГ здоровых детей была высокой и достоверной ($p < 0,001$), в группах 1 и 2 – весьма высокой и достоверной ($p < 0,001$) (рисунк 1А).

Группы пациентов 1 и 2 достоверно не отличались от КГ по количеству тромбоцитов ($p = 0,62$ и $p = 0,45$ соответственно) (рисунк 2А) и FSC в покое ($p = 0,34$ и $p = 0,9$ соответственно) (рисунк 2Б). В группе 1 значение SSC в покое было достоверно выше по сравнению с КГ и группой 2 ($p < 0,001$) (рисунк 2Б), что позволило сделать вывод о том, что у пациентов группы 1 гранулярность повышена независимо от размера и количества тромбоцитов.

В КГ не наблюдалось достоверной корреляции Пирсона между количеством тромбоцитов и FSC ($p = 0,5$) (рисунк 3А), SSC ($p = 0,6$) (рисунк 3Б) и отношением FSC/SSC ($p = 0,67$) (рисунк 3В). У пациентов в группе 1 наблюдалась заметная и достоверная корреляция Пирсона между уменьшением количества тромбоцитов и увеличением FSC ($p = 0,01$) (рисунк 3А) и SSC ($p = 0,04$) (рисунк 3Б), но корреляция между количеством тромбоцитов и отношением FSC/SSC была недо-

Рисунок 1

Различия FSC и SSC между КГ и группами пациентов

Панели А и В показывают различия в FSC, SSC и отношении FSC/SSC между КГ и группами пациентов. Данные представлены в виде графиков аппроксимированных кривых (А) и прямоугольных диаграмм с перекрытием отдельных точек данных (Б)

Figure 1

The differences in FSC and SSC between the control group (CG) and groups of patients

Panel A and B show the differences in FSC, SSC and FSC/SSC ratio between the control group (CG) and the groups of patients. The data are presented in the form of a fitted line plot (A) and a box plot with some overlapping data points (B).

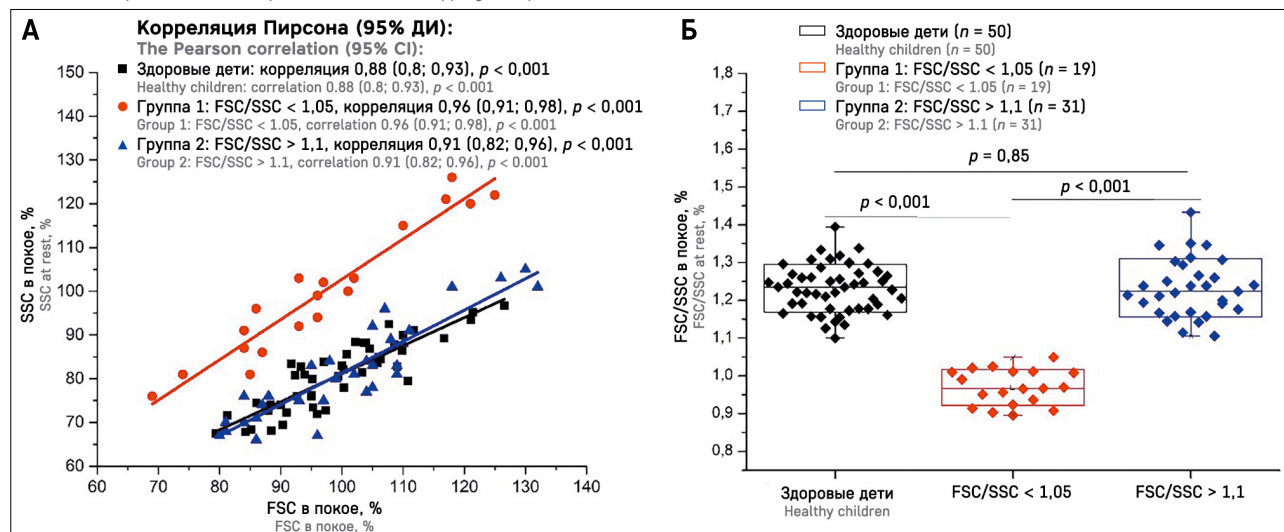


Рисунок 2

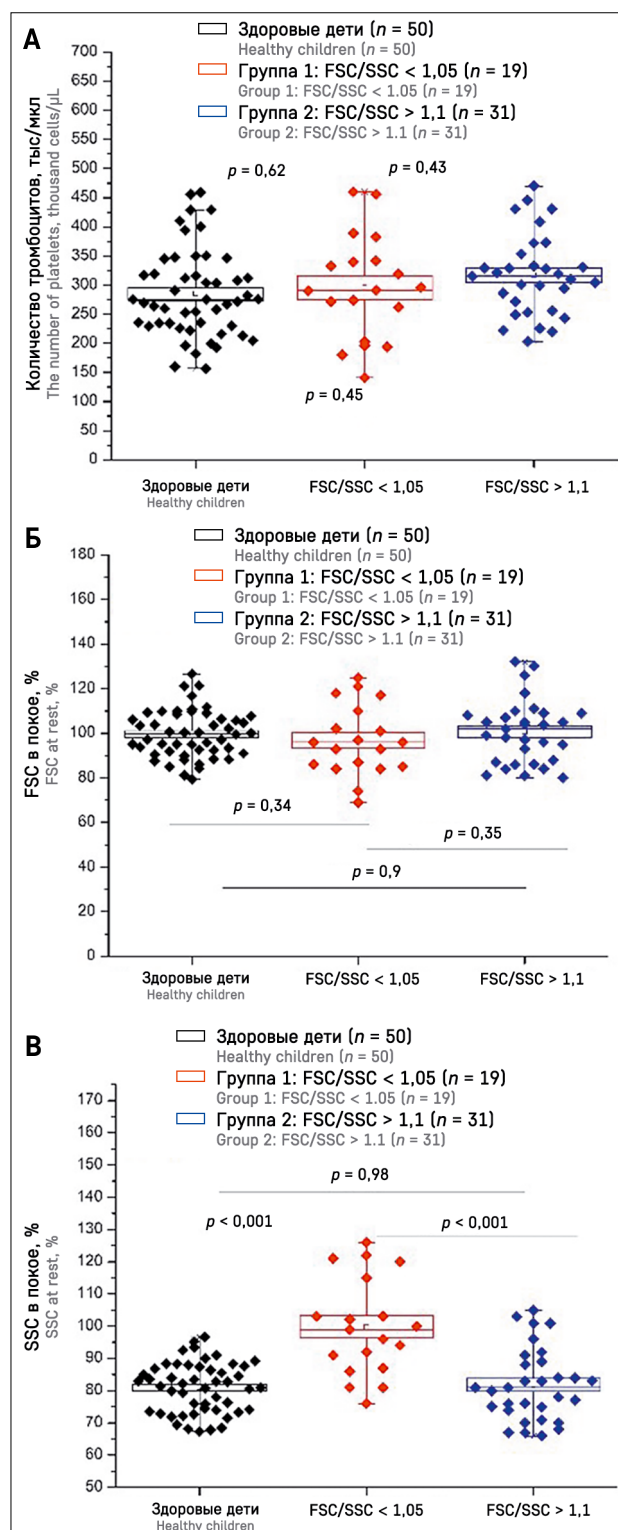
Количественные и морфологические характеристики тромбоцитов здоровых добровольцев и групп пациентов

Панели А и Б показывают отсутствие различий в количестве тромбоцитов и FSC между КГ и группами пациентов. Панель В демонстрирует повышенный уровень SSC в группе 2. Данные представлены в виде прямоугольных диаграмм с перекрытием отдельных точек данных

Figure 2

Quantitative and morphological characteristics of platelets in healthy volunteers and the groups of patients

Panel A and B show no differences in the number of platelets and FSC between the CG and the groups of patients. Panel C shows an increased SSC level in group 2. The data are presented in the form of box plots with some overlapping data points



верной ($p = 0,1$) (рисунок 3B). В группе 2 также наблюдалась заметная и достоверная корреляция Пирсона между уменьшением количества тромбоцитов и увеличением FSC ($p = 0,01$) (рисунок 3A) и SSC ($p = 0,006$) (рисунок 3Б), но корреляция между количеством тромбоцитов и отношением FSC/SSC отсутствовала (рисунок 3B). Таким образом, сходно с детьми из КГ у пациентов групп 1 и 2 корреляция между размером и количеством тромбоцитов, а также между гранулярностью и количеством тромбоцитов является независимой, т. е. нет прямой связи между уменьшением количества тромбоцитов, их размером и гранулярностью.

В группе 1 на нестимулированных тромбоцитах мембранный CD62p был достоверно выше при сравнении с КГ ($p < 0,001$) и группой 2 ($p = 0,003$). КГ и группа 2 достоверно не различались ($p = 0,67$) (рисунок 4A). Индекс дегрануляции α -гранул по CD62p в группе 1 был достоверно ниже, чем в КГ ($p < 0,001$) и группе 2 ($p = 0,003$), но достоверно не различался между КГ и группой 2 ($p = 0,28$) (рисунок 4Б). После активации в КГ наблюдалась умеренная достоверная корреляция Пирсона между CD62p и FSC ($p = 0,002$), CD62p и SSC ($p < 0,001$) (рисунок 4B, Г). В группе 1 корреляция Пирсона между CD62p и FSC, CD62p и SSC отсутствовала ($-0,07$ и $0,008$ соответственно) (рисунок 4Г). В группе 2 наблюдалась слабая недостоверная корреляция Пирсона между CD62p и FSC ($p = 0,13$) и умеренная достоверная корреляция CD62p и SSC ($p = 0,02$) (рисунок 4B, Г). Таким образом, выявлено, что у пациентов в группе 1 мембранный CD62p повышен, а гранулярный снижен.

Флуоресценция мепакрина плотных гранул была достоверно повышена в группе 1 по сравнению с КГ ($p = 0,04$), но достоверных различий не наблюдалось между КГ и группой 2 ($p = 0,35$) и между группами пациентов ($p = 0,38$) (рисунок 5A). После активации различий не наблюдалось между КГ и группами пациентов ($p > 0,05$) (рисунок 5Б). Индекс дегрануляции плотных гранул достоверно не различался между КГ и группами пациентов ($p > 0,05$), но был достоверно снижен в группе 2 по сравнению с группой 1 ($p = 0,02$) (рисунок 5Б). Таким образом, объем плотных гранул был увеличен у пациентов в группе 1, а секреция плотных гранул сохранна у пациентов в обеих группах. В покое в КГ корреляционная связь между флуоресценцией мепакрина плотных гранул и SSC была заметной и достоверной ($p < 0,001$), у пациентов группы 1 корреляция была умеренной и достоверной ($p = 0,05$), в группе 2 – высокой и достоверной ($p < 0,001$) (рисунок 5Г). Корреляция между флуоресценцией мепакрина плотных гранул и отношением FSC/SSC отсутствовала в КГ, была слабой и недостоверной ($p = 0,3$) в группе 1, но была умеренной и достоверной ($p = 0,007$) в группе 2 (рисунок 5Е).

Тяжесть проявлений геморрагического синдрома по ВАТ в группе 1 варьировала от 2 до 6 баллов с медианой 2 балла, в группе 2 – от 2 до 5 баллов с медианой 3 балла, группы достоверно не различались статистически ($p = 0,52$) (рисунки 5Е), что указывает на неоднозначность взаимосвязей между выявленными нарушениями морфологии и пула хранения с тяжестью геморрагических проявлений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основная цель данной работы заключалась в выявлении возможных связей между морфологическими характеристиками тромбоцитов и признаками нарушений пула хранения у пациентов с неуточненным геморрагическим синдромом.

В ходе проведенного анализа нами было убедительно продемонстрировано, что, исходя из морфологических и функциональных характеристик, возможно выделение подгруппы пациентов с характерными лабораторными особенностями. Выявлено, что у 38% детей с неуточненным геморрагическим синдромом (группа 1)

имеется ряд общих специфических черт морфофункциональных особенностей тромбоцитов, таких как: 1) повышение гранулярности тромбоцитов за счет увеличения количества плотных гранул вне зависимости от размера и количества тромбоцитов; 2) повышение количества CD62p как потенциального маркера внутрисосудистой активации тромбоцитов и его снижение после активации тромбоцитов *in vitro*.

Насколько нам известно, ранее в литературе не описывалась такая взаимосвязь между количественными и морфологическими изменениями тромбоцитов в сочетании с признаками нарушений их гранул у пациентов с неуточненным геморрагическим синдромом. При обследовании пациентов индивидуально выявленные отклонения малозаметны ввиду своей неинтенсивной выраженности и мозаичности, но они достоверны при изучении когорт пациентов.

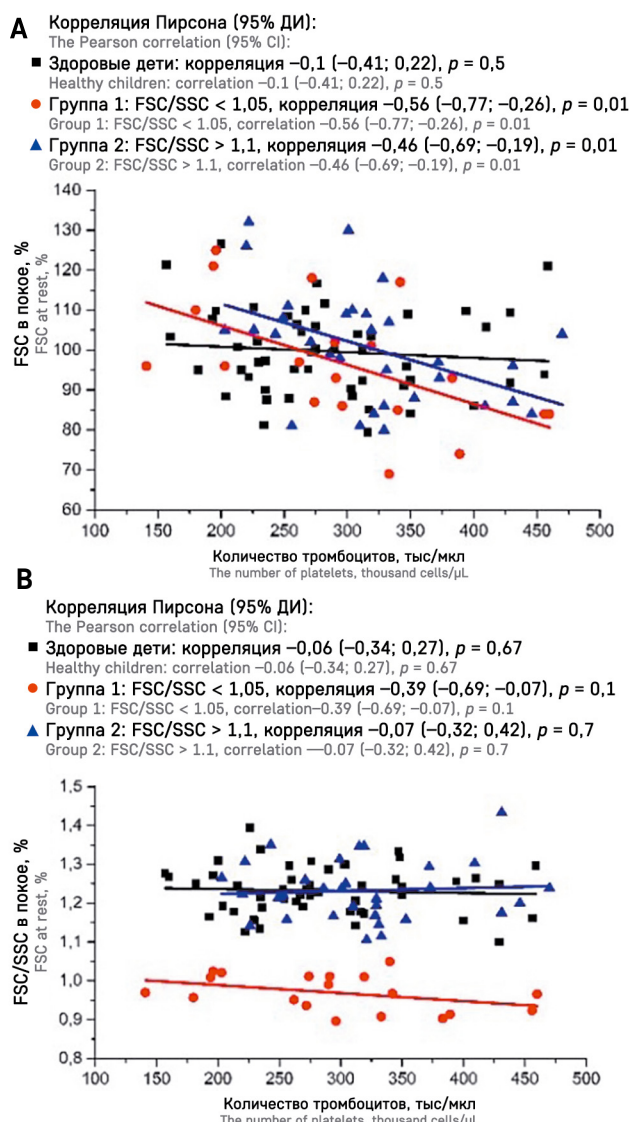
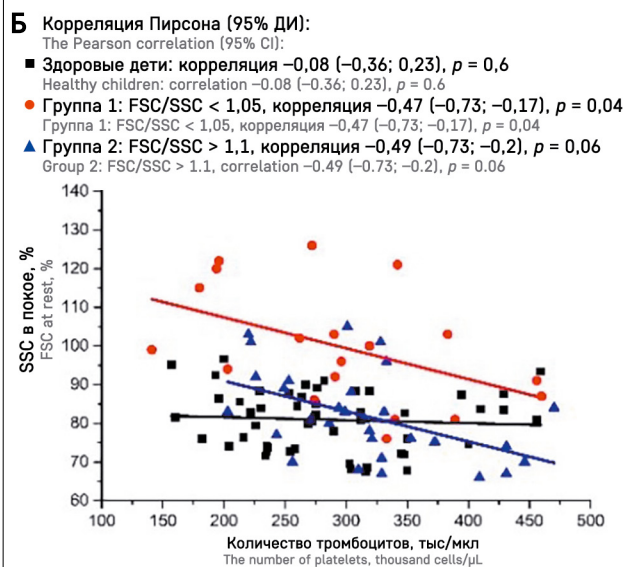
Известно, что размер тромбоцитов может увеличиваться при тромбоцитопенических состояниях, в том числе вследствие изменений характера тромбоцитопоэза [13]. У пациентов, включенных в исследование, тромбоцитопения не наблюдалась, но размер

Рисунок 3

Корреляционные связи между количеством, размером и гранулярностью тромбоцитов у здоровых добровольцев и групп пациентов. Панели А и Б показывают отсутствие связей между FSC, SSC и количеством тромбоцитов в КГ, но демонстрируют наличие достоверных корреляционных связей между ними в группах пациентов. Панель В демонстрирует отсутствие корреляционных связей между FSC/SSC и количеством тромбоцитов во всех группах. Данные представлены в виде графиков аппроксимированных кривых

Figure 3

Correlation between the number, size and granularity of platelets in healthy volunteers and the groups of patients. Panel A and B show that there is no significant correlation between FSC, SSC and the number of platelets in the CG, unlike in the groups of patients. Panel B shows no correlation between FSC/SSC and the number of platelets in all groups. The data are presented in the form of fitted line plots



тромбоцитов увеличивался при уменьшении их количества, что позволяет заподозрить повышение темпов клиренса тромбоцитов подобно тому, как это происходит у пациентов с иммунной тромбоцитопенией [7], и, возможно, обуславливает наблюдаемые аномалии и клиническую картину.

Маркером внутрисосудистой преактивации тромбоцитов является мембранный CD62p, но поскольку этот рецептор быстро растворяется *in vivo*, трудно увидеть его значительное увеличение на мембране тромбоцитов без стимуляции [14, 15]. Мы предполагаем, что у пациентов группы 1, повышение CD62p в покое, его достоверное снижение после активации и отсутствие корреляции с FSC и SSC может быть обусловлено частичным внутрисосудистым высвобождением α -гранул тромбоцитов [15].

Ранее N. Boknäs и соавт. в своей работе показали наличие некоторого предиктивного потенциала использования панели агонистов, включающей аденозиндифосфат, TRAP и CRP в низких концентрациях, для выявления нарушений связывания фибриногена и выставления CD62p у пациентов с геморрагическими проявлениями различной тяжести [8]. Возможно, что наблюдаемые маркеры преактивации тромбоцитов могут быть связаны с их последующей частичной десенсибилизацией и гипореактивностью *in vivo*, подобно тому как это было показано на мышиных моделях [16] и у пациентов с диабетом [17]. Однако *in vitro* мы не наблюдали выраженного нарушения самого механизма дегрануляции α - и δ -гранул, возможно, по причине использования высоких концентраций агонистов для стимуляции.

Рисунок 4

Нарушения α -гранул тромбоцитов, оцениваемые по CD62p

Панель А показывает увеличение мембранного CD62p на нестимулированных тромбоцитах, а панель Б – снижение гранулярного CD62p после активации в группе 1 при сравнении с КГ и группой 2. Панели В и Г показывают наличие достоверной корреляционной связи между увеличением FSC, SSC и гранулярного CD62p в КГ, но отсутствие таких корреляций в группе 1. В группе 2 достоверная корреляционная связь наблюдается только между CD62p и SSC. Данные на рисунках А и Б представлены в виде прямоугольных диаграмм с перекрытием отдельных точек данных, на В и Г – в виде графиков аппроксимированных кривых

Figure 4

Disorders of platelet α -granules assessed by CD62p

Panel A shows an increase in membrane CD62p on non-activated platelets, and panel B shows a decrease in granular CD62p after activation in group 1 in comparison with the CG and group 2. Panel B and G show significant correlation between an increase in FSC, SSC and granular CD62p in the CG, but no such correlation is found in group 1. In group 2, significant correlation is observed only between CD62p and SSC. The data are presented in the form of box plots with some overlapping data points (on panel A and B) and in the form of fitted line plots (on panel B and G)

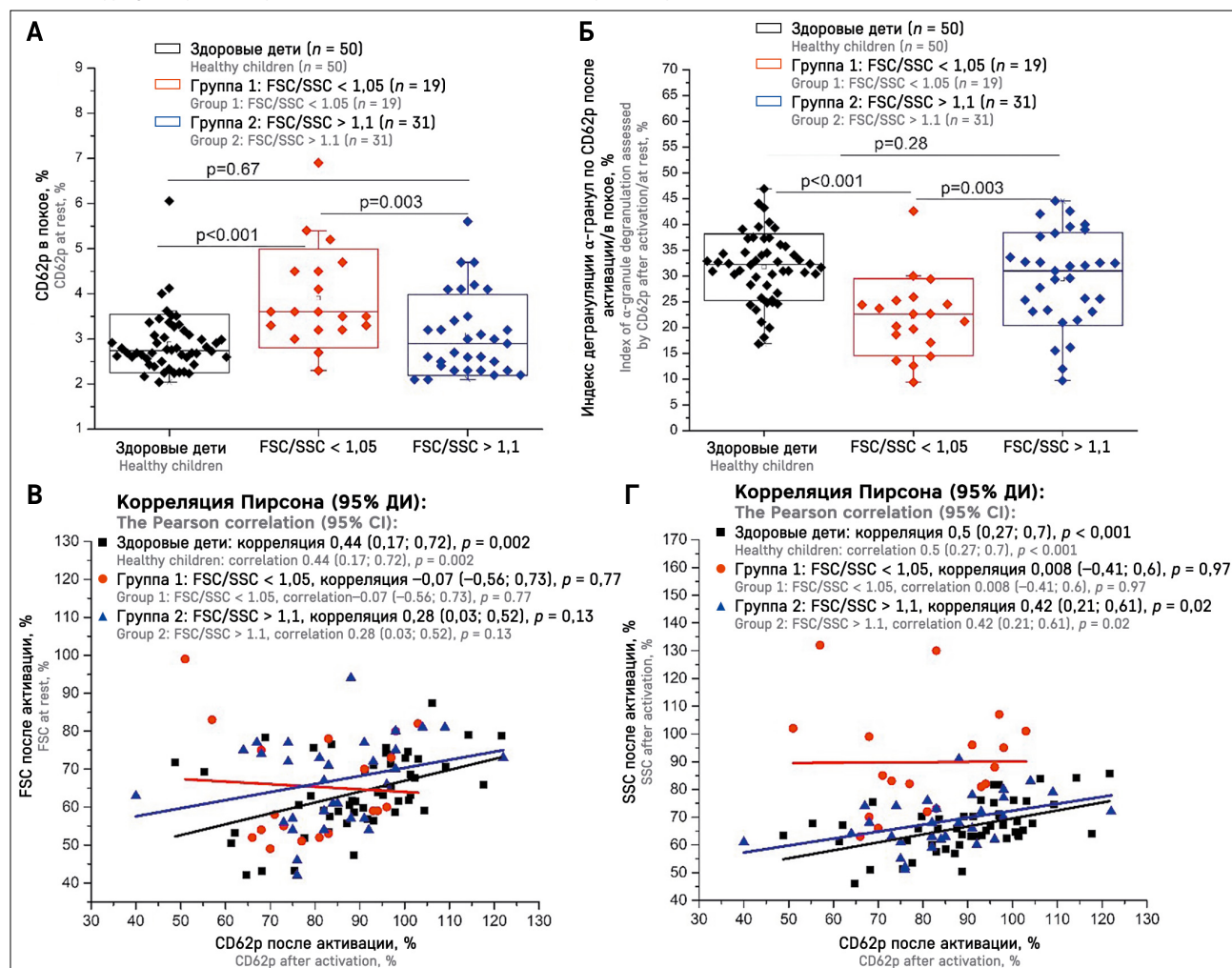


Рисунок 5

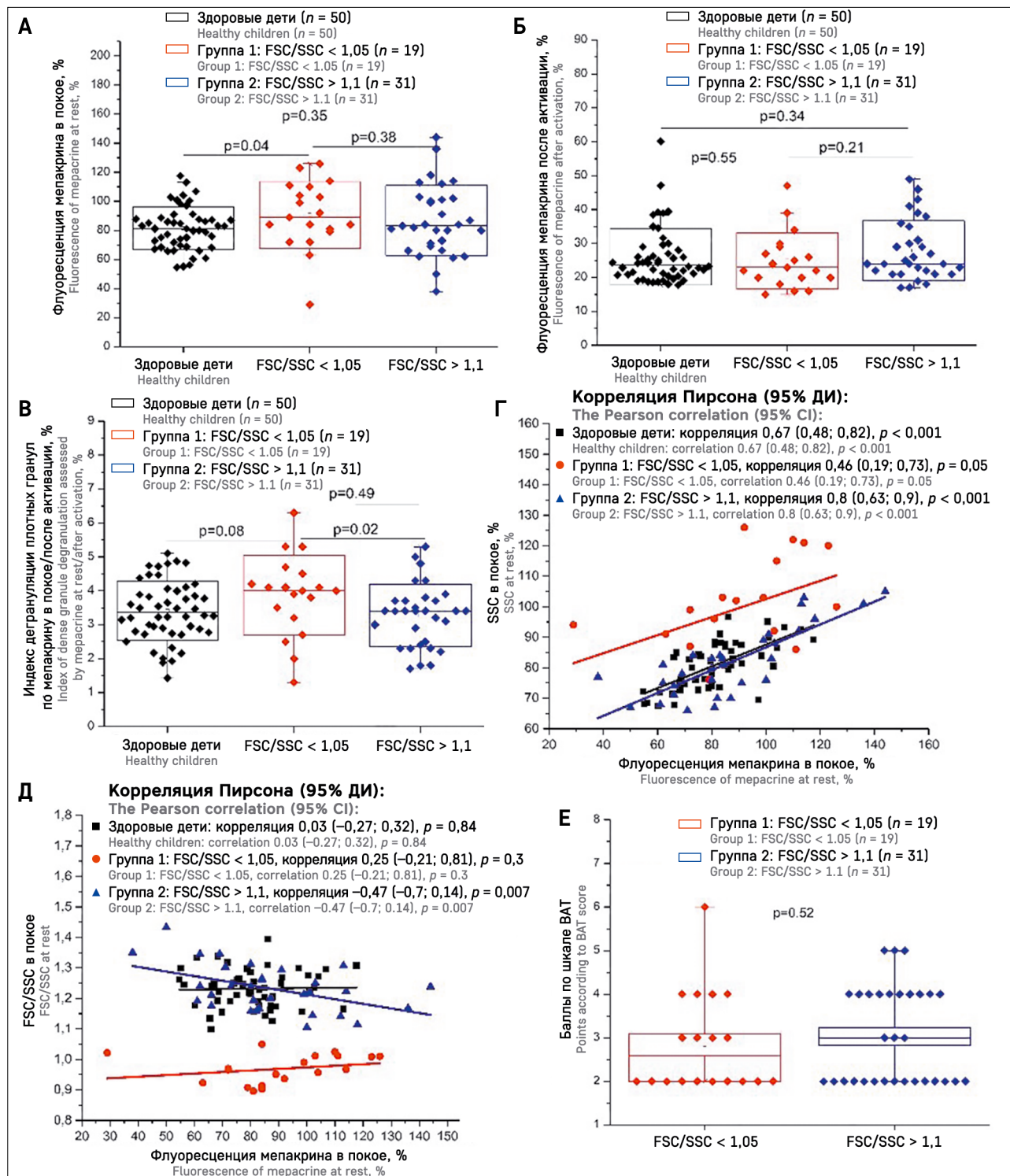
Нарушения δ -гранул тромбоцитов, оцениваемые по флуоресценции мепакрина, и сравнение тяжести геморрагического синдрома в группах пациентов

Панель А показывает достоверное увеличение объема плотных гранул в нестимулированных тромбоцитах у пациентов группы 1 по сравнению с КГ. Панели Б и В демонстрируют отсутствие различий между КГ и группами пациентов по остаточной флуоресценции мепакрина и индексу дегрануляции плотных гранул, что указывает на сохранность ее механизма. Панель Г демонстрирует корреляционную связь между увеличением общей гранулярности и объемом плотных гранул; панель Д показывает отсутствие корреляции между объемом плотных гранул и FSC/SSC в КГ и группе 1, наличие такой корреляции в группе 2. Панель Е демонстрирует отсутствие достоверных различий в тяжести геморрагических проявлений в группах пациентов. Данные на панелях А, Б, В и Е представлены в виде прямоугольных диаграмм с перекрытием отдельных точек данных; Г и Д – в виде графиков аппроксимированных кривых

Figure 5

Disorders of platelet δ -granules assessed by the fluorescence of mepacrine and the comparison of the severity of hemorrhagic syndrome in the groups of patients

Panel A shows a significant increase in the volume of dense granules in non-activated platelets of the patients from group 1 in comparison with the CG. Panel B and C show no difference between the CG and the groups of patients as assessed by the residual fluorescence of mepacrine and the index of degranulation of dense granules, which indicates that the mechanism of degranulation of dense granules is retained. Panel D shows correlation between an increase in the overall granularity and the volume of dense granules; panel E shows no correlation between the volume of dense granules and FSC/SSC in the CG and group 1; in group 2, such correlation is observed. Panel F shows no significant difference in the severity of hemorrhagic manifestations in the groups of patients. In panel A, B, C, F, the data are presented in the form of box plots with some overlapping data points, in panel D and E – in the form of fitted line plots



Подходы к выявлению нарушений функции тромбоцитов у детей осложняются недостаточной изученностью возраст-зависимых различий. В частности, есть сообщения о том, что функциональные маркеры тромбоцитов, определяемые методом проточной цитометрии, могут быть значительно уменьшены [7, 18–20] или увеличены [20, 21] у детей по сравнению со взрослыми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проблема диагностики дисфункции тромбоцитов сегодня требует корректировки и валидации локальных (в рамках медицинского учреждения) тестов, основанных на методах проточной цитометрии и агрегометрии, позволяющих охватить до 80% известных нозологий и имеющих диагностический потенциал для выявления новых форм нарушений [4, 6, 8]. Перспективным представляется использование низких концентраций агонистов для выявления нарушений активации тромбоцитов.

Выявленные нами достоверные различия между КГ и пациентами с геморрагическими проявлениями разной степени тяжести убедительно указывают на

вклад нарушений пула хранения и морфологии тромбоцитов в развитии геморрагических проявлений. Одновременно данные результаты указывают на перспективность диагностического поиска в данном направлении исследований для неклассифицированных тромбоцитопатий, в том числе у детей с неуточненным геморрагическим синдромом.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Polokhov D.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6905-2878>

Pshonkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2057-2036>

Ignatova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5217-3937>

Ponomarenko E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8697-7570>

Fedorova D.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4567-1871>

Aleksenko M.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2521-5353>

Voronin K.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7578-9657>

Seregina E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7534-3863>

Poletaev A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5209-2099>

Novichkova G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Zharkov P.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4384-6754>

Литература

- Gresele P., Harrison P., Bury L., Falcinelli E., Gachet C., Hayward C.P., et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a world-wide survey. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1562–9.
- Gresele P., Falcinelli E., Bury L. Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders. *Int J Lab Hem* 2018; 40 (Suppl 1): 34–45.
- Quiroga T., Goycoolea M., Panes O., Aranda E., Martínez C., Belmont S., et al. High prevalence of bleeders of unknown cause among patients with inherited mucocutaneous bleeding. A prospective study of 280 patients and 299 controls. *Haematologica* 2007; 92 (3): 357–65.
- Andres O., Henning K., Straub G., Pflug A., Manukjan G., Schulze H. Diagnosis of platelet function disorders: A standardized, rational, and modular flow cytometric approach. *Platelets* 2018; 29 (4): 347–56.
- Rand M.L., Reddy E.C., Israels S.J. Laboratory diagnosis of inherited platelet function disorders. *Transfus Apher Sci* 2018; 57: 485–93.
- Ramström S., Södergren A.L., Tynngård N., Lindahl T.L. Platelet Function Determined by Flow Cytometry: New Perspectives? *Semin Thromb and Hemost* 2016; 42 (3): 268–81.
- Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Polokhov D.M., Suntsova E.V., Zharkov P.A., Fedorova D.V., et al. Flow cytometry for pediatric platelets. *Platelets* 2019; 30 (4): 428–37.
- Boknäs N., Ramström S., Faxälv L., Lindahl T.L. Flow cytometry-based platelet function testing is predictive of symptom burden in a cohort of bleeders. *Platelets* 2018; 29: 512–9.
- Gresele P., Harrison P., Gachet C., Hayward C., Kenny D., Mezzano D., et al. Diagnosis of inherited platelet function disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 314–22.
- Rodeghiero F., Tosetto A., Abshire T., Arnold D.M., Collier B., James P., et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *JTH* 2010; 8 (9): 2063–5.
- Suntsova E.V., Demina I.M., Ignatova A.A., Ershov N.M., Trubina N.M., Dobrynina J., et al. Bleeding tendency and platelet function during treatment with romiplostim in children with severe immune thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2017; 105: 841–8.
- Ignatova A.A., Karpova O.V., Trakhtman P.E., Rumiantsev S.A., Panteleev M.A. Functional characteristics and clinical effectiveness of platelet concentrates treated with riboflavin and ultraviolet light in plasma and in platelet additive solution. *Vox Sang* 2016; 110: 244–52.
- Balduini C.L., Melazzini F., Pecci A. Inherited thrombocytopenias – recent advances in clinical and molecular aspects. *Platelets* 2017; 28: 3–13.
- Michelson A.D., Barnard M.R., Krueger L.A., Valeri C.R., Furman M.I. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of *in vivo* platelet activation than platelet surface P-selectin. *Circulation* 2007; 104: 1533–7.
- Michelson A.D., Barnard M.R., Krueger L.A., Frelinger A.L. 3rd, Furman M.I. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 2000; 21 (3): 259–70.
- Chaudhary P.K., Kim S., Jee Y., Lee S.H., Park K.M., Kim S. Role of GRK6 in the regulation of platelet activation through selective G protein-coupled receptor (GPCR) desensitization. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1–14.
- Mahmoodian R., Salimian M., Hamidpour M., Khadem-Maboudi A.A., Gharehbaghian A. The effect of mild agonist stimulation on the platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord* 2019; 19: 1–8.
- Koltsova E.M., Balashova E.N., Ignatova A.A., Poletaev A.V., Polokhov D.M., Kuprash A.D., et al. Impaired platelet activity and hypercoagulation in healthy term and moderately preterm newborns during the early neonatal period. *Pediatr Res* 2019; 85 (1): 63–71.
- Hézar N., Potron G., Schlegel N., Amory C., Leroux B., Nguyen P. Unexpected persistence of platelet hyporeactivity beyond the neonatal period: a flow cytometric study in neonates, infants and older children. *Thromb Haemost* 2003; 90 (1): 116–23.
- Polokhov D.M., Ershov N.M., Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Gaskova M.A., Zharkov P.A., et al. Platelet function and blood coagulation system status in childhood essential thrombocythemia. *Platelets* 2019; 31 (8): 1001–11.
- Yip C., Linden M.D., Attard C., Monagle P., Ignjatovic V. Platelets from children are hyper-responsive to activation by thrombin receptor activator peptide and adenosine diphosphate compared to platelets from adults. *Br J Haematol* 2015; 168: 526–32.