

# Диагностика врожденных нарушений функций тромбоцитов: современное состояние вопроса

Д.В. Фёдорова, П.А. Жарков, С.А. Плясунова, Е.А. Серёгина, А.А. Игнатова

ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Врожденные нарушения функций тромбоцитов (тромбоцитопатии) представляют собой крайне гетерогенную и сложную для диагностики группу заболеваний, распространенность которых в популяции, возможно, недооценивается. В большинстве случаев тромбоцитопатии приводят к умеренным и незначительным проявлениям геморрагического синдрома в повседневной жизни, однако могут способствовать жизнеугрожающим кровотечениям при травмах и оперативных вмешательствах, что делает их своевременную диагностику актуальной проблемой. В обзоре представлены данные о диагностических алгоритмах, преимуществах и ограничениях отдельных методов исследования функционального состояния тромбоцитов. Рассмотрены подходы к оценке клинических проявлений геморрагического синдрома, в том числе стандартизованные шкалы оценки кровоточивости. Наибольшее внимание уделено световой агрегометрии и ее модификациям, методам оценки секреции гранул тромбоцитов, проточной цитометрии. Освещены проблемы стандартизации лабораторных тестов. Акцент сделан на соответствии диагностических подходов последним международным рекомендациям *International Society on Thrombosis and Haemostasis*.

**Ключевые слова:** дети, геморрагический синдром, тромбоциты, тромбоцитопатии, световая агрегометрия, проточная цитометрия.

**Контактная информация:**  
Фёдорова Дарья Викторовна,  
врач-педиатр консультативного  
отделения Национального научно-практического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева  
Минздрава России.  
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,  
ул. Саморы Машела, 1  
Тел.: 8 (495) 287-6570, доб. 1702  
E-mail: darya.v.fedorova@gmail.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-83-95

## Modern approach to diagnosis of inherited functional platelet disorders

D.V. Fedorova, P.A. Zharkov, S.A. Plyasunova, E.A. Seregina, A.A. Ignatova

National Scientific and Practical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev

Inherited functional platelet disorders (IFPD) are very heterogeneous group of hemorrhagic diseases that are difficult to diagnose. Prevalence of IFPD in general population is probably underestimated. In most cases IFPD cause mild to moderate bleeding symptoms in everyday life but may result in life-threatening bleeding after trauma and surgical interventions. Rational diagnostic approach is critical to prevent these complications. Data on diagnostic algorithms as well as on benefits and disadvantages of specific laboratory methods are presented in this review. Approach to clinical evaluation is also reviewed with particular attention to bleeding assessment tools. The main emphasis is made on light transmission aggregometry, measurement of platelet granules content and release, flow cytometry. Problems of standardization of platelet functional tests are outlined. Diagnostic algorithms are applied according to the up to date recommendations of International Society on Thrombosis and Haemostasis.

**Key words:** children, bleeding, platelets, inherited, platelet disorders, light transmission aggregometry, flow cytometry.

### Correspondence:

Daria V. Fedorova, MD, pediatrician of  
Outpatient Consultative Unit,  
National Research Practice Center  
of Pediatric Hematology, Oncology,  
and Immunology named after Dmitry  
Rogachev.  
Address: Russia 117997, Moscow,  
Samory Mashela st., 1  
Tel.: +7 (495) 287-6570, ext. 1702  
E-mail: darya.v.fedorova@gmail.com

**Т**ромбоциты играют одну из основополагающих ролей в системе гемостаза, поддерживая целостность сосудистой стенки и инициируя запуск механизмов первичного гемостаза в случаях травмы сосуда. В нормальных физиологических условиях тромбоциты циркулируют в кровотоке, не адгезируя к сосудистой стенке. Однако в ответ на повреждение эндотелия тромбоциты посредством поверхностных гликопротеинов (GPVI, GPIa/IIa и GPIb-IX-V) осуществляют адгезию к компонентам субэндотелиального матрикса (в частности, коллагену, фибронектину, ламинину) и связывание с фактором Виллебранда, который сам по себе способен связывать коллаген. Адгезия тромбоцитов запускает дальнейший каскад сигнальных событий, приводящих к

переходу тромбоцита в активированное состояние [1–3]. В процессе активации происходят реорганизация цитоскелета тромбоцитов, секреция компонентов гранул, экспрессия на поверхности клеток отрицательно заряженных фосфолипидов, облегчающих сборку на поверхности тромбоцитов комплексов факторов свертывания.

Ключевой этап активации – изменения конформации гликопротеина GPIIb/IIIa, приводящие к повышению его аффинности к фибриногену и фактору Виллебранда. Процесс, приводящий к изменению конформации GPIIb/IIIa, описывается термином «*inside-out* сигнализация», поскольку изменения во внеклеточном домене интегрина происходят в ответ на изменения в его внутриклеточном «хвосте» – мишени

различных сигнальных каскадов. Связывание фибриногена с молекулами  $\alpha IIb\beta 3$  интегрина в их активной конформации делает возможным агрегацию тромбоцитов между собой и формирование тромба [1–3].

Альфа-гранулы и плотные гранулы тромбоцитов содержат различные компоненты, выброс которых потенцирует дальнейшую активацию тромбоцитов и формирование тромбоцитарного тромба в месте повреждения сосудистой стенки. К содержимому плотных гранул относятся аденозиндифосфат (АДФ), аденозинтрифосфат (АТФ), серотонин, катехоламины и кальций, к содержимому альфа-гранул – тромбоцитарный фактор 4, фактор Виллебранда, фактор свертывания V и фибриноген. В результате выброса содержимого гранул происходит амплификация ответа на первичный стимул, активируются и рекрутируются дополнительные тромбоциты, структура образовавшегося тромбоцитарного сгустка стабилизируется за счет взаимодействия фибриногена с гликопротеином GPIIb/IIIa на поверхности тромбоцитов. Высвобождаемые из гранул агонисты, в частности АДФ и адреналин, взаимодействуют с соответствующими рецепторами на поверхности тромбоцитов, запуская таким образом внутриклеточные каскады активации. Еще один из основных агонистов – тромбин, образующийся в результате функционирования плазменного звена гемостаза (активности протромбиназного комплекса на поверхности активированных тромбоцитов) [1, 3, 4].

Изменения в любом из описанных выше процессов могут приводить к нарушениям функций тромбоцитов и снижению эффективности гемостатических механизмов [5].

Врожденные нарушения функций тромбоцитов (тромбоцитопатии) представляют собой крайне гетерогенную по тяжести проявлений, распространенности и патогенезу группу заболеваний. Для большинства заболеваний данной группы постановка диагноза – длительный процесс, требующий проведения большого числа лабораторных тестов и их последующей комплексной оценки [5–7].

Считается, что наследственные тромбоцитопатии – крайне редкое заболевание, однако, возможно, их распространенность недооценивается вследствие гиподиагностики [6]. Согласно ежегодному отчету британского регистра UKHCDO (*United Kingdom Hemophilia Centres Doctors' Organisation*) на март 2015 года в регистре состояло 118 пациентов с тромбопатией Гланцмана, 80 – с синдромом Бернара-Сулье и 1975 – с другими наследственными тромбоцитопатиями (<http://www.ukhcdo.org>). Таким образом, приняв численность населения Великобритании за 65 млн человек, можно приблизительно оценить совокупную распространенность наследственных тромбоцитопатий как 1 на 30000 (для тяжелых форм – 1 на

330000). Вместе с тем некоторые опубликованные данные указывают на возможно большую истинную распространенность тромбоцитопатий. Так, согласно результатам, полученным Miller и соавт., среди женщин с меноррагиями доля пациенток с ранее не диагностированными нарушениями функций тромбоцитов может достигать 50% [8].

Диагноз тромбоцитопатий часто устанавливают в подростковом и даже во взрослом возрасте, поскольку умеренные дефекты функций тромбоцитов часто реализуются только в исключительных условиях (травмы, оперативные вмешательства и инвазивные диагностические процедуры, роды) [7]. Тяжесть геморрагических проявлений варьирует даже в пределах одного типа наследственной патологии тромбоцитов и часто не коррелирует со степенью выраженности изменений в лабораторных тестах [9]. Возможно, нетяжелые нарушения функции тромбоцитов – это скорее факторы риска, реализуемые только в случае комбинации с другими, еще не идентифицированными до конца факторами [7].

Одно из главных препятствий на пути выработки общих подходов к диагностике нарушений функций тромбоцитов – плохая воспроизводимость и недостаточная стандартизация большинства используемых лабораторных методик [6]. Кроме того, оценка функций тромбоцитов требует работы исключительно со свежими образцами крови, а крайняя чувствительность тромбоцитов к любым манипуляциям повышает риск возникновения артефактов, затрудняющих адекватную интерпретацию результатов [7].

Диагностика нетяжелых нарушений функций тромбоцитов – актуальная медицинская проблема. Пациенты с такой патологией могут не страдать от проявлений повышенной кровоточивости в повседневной жизни, однако имеют пожизненный риск развития тяжелых кровотечений при выполнении инвазивных манипуляций и оперативных вмешательств. В таких случаях своевременная постановка диагноза может спасти пациента от серьезных осложнений. С другой стороны, гипердиагностика патологии гемостаза подвергает пациента риску потенциальных осложнений от применения гемостатических агентов, а также ухудшает качество жизни, накладывая ненужные ограничения на выбор профессии, занятия спортом и др. [10].

#### **Диагностика наследственных расстройств функций тромбоцитов**

Тяжелые врожденные нарушения функций тромбоцитов встречаются в популяции значительно реже других геморрагических расстройств (иммунной тромбоцитопении, болезни Виллебранда, гемофилии A и B). Поэтому перед началом специализированного обследования на предмет качественной патоло-

гии тромбоцитов необходимо провести ряд скрининговых тестов (клинический анализ крови с подсчетом числа тромбоцитов; определение активированного частичного тромбопластинового времени, протромбинового времени, концентрации фибриногена, ристоцетин-кофакторной активности и концентрации антигена фактора Виллебранда) для исключения более распространенных состояний. В то же время некоторые функциональные нарушения тромбоцитов могут сочетаться с умеренной тромбоцитопенией, и незначительное снижение числа тромбоцитов (особенно врожденное) не должно быть основанием для отказа от обследования на предмет наследственной патологии тромбоцитов [6].

В рекомендациях *International Society on Thrombosis and Hemostasis* по диагностике наследственных нарушений функций тромбоцитов, опубликованных в 2015 году, авторы разделили рекомендованные тесты на три категории [6]. К тестам первого уровня относятся световая трансмиссионная агрегометрия, исследование секреции гранул (оценка выброса АДФ/АТФ и по крайней мере одного из маркеров альфа-гранул) и анализ экспрессии основных поверхностных гликопротеинов посредством проточной цитометрии. Тесты второго уровня, необходимые пациентам, не получившим конкретного диагноза после первого этапа диагностики: агрегометрия с расширенным спектром агонистов (альфа-тромбин, TRAP-6, U46619, CRP, конвульксин, PAR-4 активирующий пептид, PMA, A23287), использование дополнительного спектра антител при проведении проточной цитометрии, тест ретракции сгустка, измерение концентрации TxB2 и трансмиссионная электронная микроскопия. К тестам третьего уровня относятся прежде всего молекулярно-генетические исследования, позволяющие диагностировать редкие нарушения, а иногда выявлять ранее не описанные формы.

При необходимости повторения тестов для исключения влияния внешних приобретенных факторов время их проведения должен разделять период не менее одного месяца [6].

При проведении исследования функций тромбоцитов исключительное значение имеет преаналитический этап. Кровь для проведения исследования должна быть взята максимально атравматичным способом, с использованием игл калибра 19–21 и вакуумных пробирок с цитратным буфером. Первые 3–5 мл забранной крови нельзя использовать для анализа функций тромбоцитов. Недопустимо энергичное встряхивание и перемешивание образцов, отправка их пневмопочтой. Образцы должны находиться в условиях комнатной температуры, их необходимо взять в работу в интервале от 30 мин до 4 ч с момента забора крови. Кроме того, перед проведением исследования необходимо получить полную информацию о принима-

емых пациентом лекарственных препаратах, включая фитотерапевтические [11, 12].

### Анамнез и физикальный осмотр

Первым шагом в направлении диагноза наследственной патологии тромбоцитов должен стать тщательный сбор персонального и семейного анамнезов [6]. К числу типичных проявлений нарушения функций тромбоцитов относятся:

- спонтанное или при незначительном воздействии появление экхимозов и петехий (рис. 1);
- носовые кровотечения, в особенности продолжительностью более 30 мин, приводящие к анемизации и требующие обращения за медицинской помощью;
- меноррагии, в особенности начавшиеся с момента менархе;
- кровотечения со слизистых ротовой полости;
- избыточная кровопотеря в родах, при проведении инвазивных манипуляций;
- избыточная кровоточивость при экстракции зубов [13].

### Рисунок 1

Проявления кожного геморрагического синдрома у пациентки с тромbastенией Гланцмана (собственное наблюдение)



Появление симптомов кровоточивости в раннем возрасте и наличие сходных проявлений у родственников свидетельствуют в пользу наследственной природы кровоточивости. В то же время развитие симптомов у взрослого или заметные изменения в их выраженности в течение жизни заставляют думать прежде всего о приобретенных нарушениях, например, на фоне приема лекарственных препаратов [10, 13]. С другой стороны, внешние причины могут вносить дополнительный вклад в проявления ранее не диагностированной патологии гемостаза и вместе с ней приводить к развитию кровотечений. Тем не менее симптомы кровоточивости не являются специфичными, и физикальный осмотр

имеет ограниченное значение для постановки диагноза, особенно в случае умеренной выраженности проявлений [10].

Если проявления кровоточивости ограничены одной локализацией (например, рецидивирующие носовые кровотечения), необходимо исключить местные причины. Проявления кровоточивости могут быть следствием патологии соединительной ткани, поэтому при физикальном осмотре следует обращать внимание на наличие повышенной эластичности кожи, гипермобильности суставов, обширные атрофические шрамы на коленях, локтях и голенях, характерные для синдрома Элерса–Данло, а также телеангиоэктазии на пальцах, губах, в полости рта и носа, являющиеся проявлением наследственной геморрагической телеангиоэктазии [10].

В части случаев нарушения функций тромбоцитов могут быть одной из составляющих синдромаль-

ной патологии. Поэтому при физикальном исследовании необходимо обращать внимание на проявления экземы, рецидивирующие инфекции, остроту слуха, нарушения пигментации, задержку умственного развития, стигмы дизэмбриогенеза. Кроме того, для ряда наследственных тромбоцитопатий/тромбоцитопений (в частности, связанных с мутациями в генах *RUNX1* и *ETV6*) имеет значение семейный анамнез случаев острого миелоидного лейкоза и миелодиспластического синдрома (табл. 1) [6, 7].

### Шкалы оценки кровоточивости

Симптомы умеренных нарушений функций тромбоцитов (в частности, легкое появление экхимозов) неспецифичны и могут быть минимально выражены в повседневной жизни. В таких случаях при сборе анамнеза сложно определить, является ли кровоточивость патологической, поскольку существует

**Таблица 1**

Наследственные нарушения функций тромбоцитов в рамках синдромальной патологии [14, 15]

| Нозология                                                                  | Дефекты тромбоцитов                                                              | Изменение других систем и органов                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Синдром Вискотта–Олдрича                                                   | Микротромбоцитопения, снижение количества гранул, нарушения агрегации            | Экзема, первичный иммунодефицит                                                        |
| Синдром Пари–Труссо                                                        | Тромбоцитопения, гигантские альфа-гранулы, нарушения агрегации                   | Пороки сердца и лицевого черепа, задержка умственного развития                         |
| Синдром Чедиака–Хигаши                                                     | Дефицит плотных гранул, включения в тромбоцитах и лейкоцитах                     | Глазо-кожный альбинизм, иммунодефицит, органомегалия, неврологические нарушения        |
| Синдром Германского–Пудлака                                                | Дефицит плотных гранул                                                           | Глазо-кожный альбинизм, гранулематозный колит, легочный фиброз, нейтропения            |
| Синдром Грисцелли                                                          | Умеренная тромбоцитопения, нарушения агрегации                                   | Альбинизм, иммунодефицит, неврологические нарушения                                    |
| Синдром «серых» тромбоцитов                                                | Макротромбоцитопения, дефицит альфа-гранул                                       | Спленомегалия, миелосфиброз                                                            |
| ARC-синдром ( <i>arthrogryposis, renal dysfunction, cholestasis</i> )      | Увеличение размера тромбоцитов, дефицит белков альфа-гранул, нарушения агрегации | Контрактуры суставов, аномалии лицевого скелета, холестаз, почечный канальцевый ацидоз |
| <i>MYH9</i> -ассоциированные синдромы (синдром Фехтнера, синдром Эпштейна) | Макротромбоцитопения, нарушения агрегации                                        | Наследственный нефрит, тугоухость                                                      |
| Макротромбоцитопения, ассоциированная с мутацией в гене филамина А         | Макротромбоцитопения, нарушения агрегации и секреции                             | Задержка умственного развития, скелетная дисплазия, дистрофия клапанов сердца          |

частичное перекрытие симптомов между здоровой популяцией и пациентами с нетяжелыми тромбоцитопатиями [13, 16]. Так, согласно данным недавнего анкетирования 500 взрослых здоровых добровольцев, у 25% опрошенных были отмечены носовые кровотечения, у 19% – примесь крови в стуле, у 18% – легкое появления экхимозов, еще у 18% – длительное кровотечение после экстракции зубов; 47% опрошенных женщин сообщали о наличии меноррагий, 23% – получали лечение по данному поводу [17].

В течение последних лет значительно возрос интерес к использованию так называемых шкал оценки кровоточивости, призванных стандартизировать субъективную оценку выраженности геморрагических проявлений. Данные шкалы представляют собой опросники, позволяющие присвоить каждому проявлению кровоточивости определенную балльную оценку. Сумма набранных баллов помогает провести границу между здоровой популяцией и пациентами с патологией гемостаза и таким образом идентифицировать пациентов, нуждающихся в дальнейшем обследовании [6, 10].

Первой широко используемой шкалой оценки кровоточивости стала разработанная *F. Rodeghiero* и

*соавт. Vicenza Bleeding Score*, первоначально предназначенная для диагностики первого типа болезни Виллебранда во взрослой популяции [18]. Позже шкала была адаптирована для использования в детской популяции и используется в виде Педиатрического опросника кровоточивости (*Pediatric Bleeding Questionnaire*) [19].

В 2010 году рабочая группа ISTH предложила собственную шкалу оценки кровоточивости у детей и взрослых – ISTH-BAT [20]. Применимость данной шкалы для диагностики наследственной патологии тромбоцитов исследована в работе *Lowe* и *соавт.* Суммарная балльная оценка по этой шкале была достоверно выше у когорты обследуемых пациентов по сравнению со здоровыми добровольцами. Однако балльная оценка не коррелировала с последующим обнаружением снижения агрегации тромбоцитов в тесте световой агрегометрии [9].

В нашей недавней работе, посвященной диагностике тромбоцитопатий у детей, для оценки выраженности клинических проявлений использовался расчетный клинический индекс кровоточивости (КИК), позволяющий оценивать мультисистемность и тяжесть геморрагического синдрома [21].

**Таблица 2**

Аномалии, выявляемые в мазке периферической крови [5]

| Параметр                                    | Результат                                               | Нозология                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Размер тромбоцитов                          | Меньше нормального                                      | Синдром Вискотта–Олдрича                                                                                                                                                                                               |
|                                             | Больше нормального                                      | Синдромы Бернара–Сулье, Пари–Труссо, «серых» тромбоцитов, «белых» тромбоцитов, MYH9-ассоциированные расстройства, GATA1-ассоциированная тромбоцитопения, MGPS ( <i>Medich giant platelet syndrome</i> ), филаминопатия |
| Морфология тромбоцитов                      | «Серые», или «бледные», тромбоциты                      | Синдром «серых» тромбоцитов, ARC-синдром (артрогрипоз, почечная дисфункция, холестаза)                                                                                                                                 |
| Морфология других клеточных элементов крови | Тельца Howell–Jolly в эритроцитах                       | Синдром Сторморкен                                                                                                                                                                                                     |
|                                             | Гигантские гранулы в эозинофилах, базофилах и моноцитах | Синдром Чедиака–Хигаши                                                                                                                                                                                                 |
|                                             | Признаки дизэритропоэза                                 | Синдром «серых» тромбоцитов, GATA1-ассоциированная тромбоцитопения                                                                                                                                                     |
|                                             | Включения в лейкоцитах                                  | MYH9-ассоциированные синдромы (в том числе аномалия Мея–Хегглина, см. рис. 2)                                                                                                                                          |

### Исследование мазка периферической крови

Число тромбоцитов в периферической крови должно быть определено во всех случаях перед проведением функциональных тестов. Помимо того что снижение числа тромбоцитов может само по себе приводить к появлению геморрагического синдрома, результаты большинства функциональных методик (за исключением проточной цитометрии) зависят от числа тромбоцитов. Большинство автоматических анализаторов выделяет тромбоцитарный гейт с помощью импедансного метода, что может привести к ошибкам в подсчете при аномалиях размеров тромбоцитов. Например, в случае синдрома Бернара–Сулье и *MYH9*-ассоциированных расстройств степень тромбоцитопении может быть переоценена из-за того, что крупные тромбоциты не попадают в эритроцитарный гейт. Напротив, при синдроме Вискотта–Олдрича мелкие тромбоциты могут попадать при анализе в категорию клеточного дебриса [5, 13].

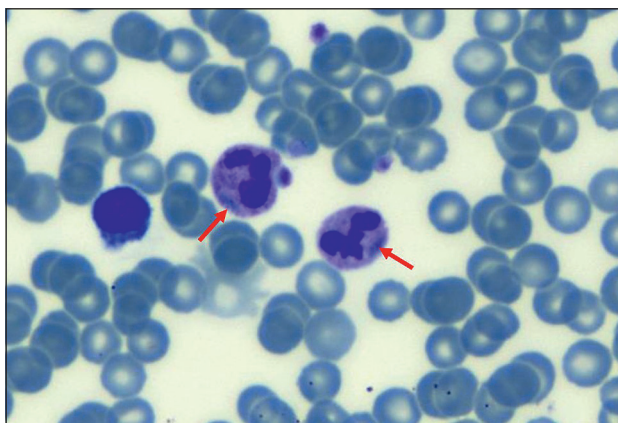
Исследование мазка периферической крови позволяет не только точно определить число тромбоцитов, но и обнаружить аномалии их размера и строения, а также особенности морфологии других клеток крови (например, стоматоцитоз при сидостеролемии, включения в нейтрофилах при *MYH9*-ассоциированных тромбоцитопениях), которые могут оказаться диагностически значимыми (табл. 2, рис. 2) [6, 13].

### Время кровотоечения

Время кровотоечения – старейший из методов оценки функции тромбоцитов [22], который, несмотря на инвазивность и межоператорскую вариабельность, применяется до сих пор [23]. Время кровотоечения может возрастать при некоторых нетяжелых тромбоцитопатиях, однако результаты зависят не только от функции тромбоцитов, но и от возраста, гематокрита, особенностей сосудистой стенки и техники оператора [24].

### Рисунок 2

Мазок периферической крови пациента с аномалией Мея–Хегглина и умеренной тромбоцитопенией (собственное наблюдение): базофильные включения в цитоплазме гранулоцитов



В последние годы продемонстрирована неудовлетворительная чувствительность и специфичность метода для диагностики патологии тромбоцитов. Так, в работе *T. Quiroga* и соавт. увеличение времени кровотоечения отмечено только у 42% пациентов с функциональными расстройствами тромбоцитов [25]. Аналогичный результат (чувствительность метода – 33%) получен *G.M. Podda* и соавт. [26]. В результате методика определения времени кровотоечения была исключена из последних международных рекомендаций по диагностике тромбоцитопатий [6].

### Анализатор функций тромбоцитов PFA-100

Прибор PFA-100 был разработан в качестве *in vitro* альтернативы определению времени кровотоечения [27, 28]. Прибор использует минимальный объем цельной крови (800 мкл), который с высокой скоростью пропускается через отверстие в мембране, покрытой коллагеном и АДФ или коллагеном и адреналином. Тромбоциты после активации и адгезии к мембране вызывают окклюзию апертуры. Прибор фиксирует время до полного прекращения тока крови через апертуру – «время закрытия». Простота и быстрота выполнения теста, а также потребность только в минимальном объеме крови делают привлекательным использование PFA-100 в качестве скринингового метода [5]. Однако этот метод не продемонстрировал требуемой чувствительности в случае тромбоцитопатий с умеренной кровоточивостью [25, 26, 29] и также был исключен из последних рекомендаций ISTH [6].

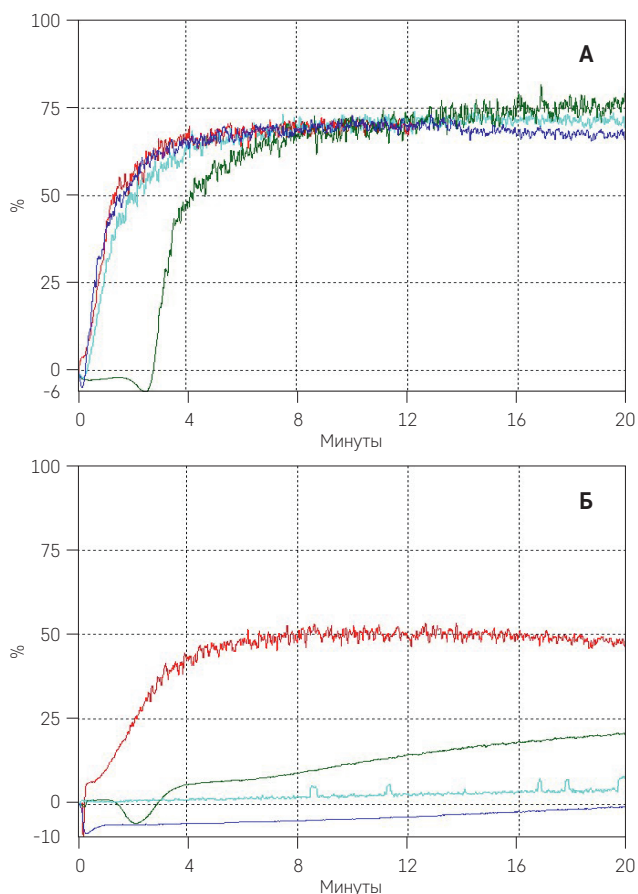
### Световая трансмиссионная агрегометрия

Световая трансмиссионная агрегометрия используется в клинике с начала 1960-х годов [30]. За это время методика не претерпела существенных изменений, модификации коснулись в основном портативности приборов и представления результатов в цифровом виде. Принцип метода основан на увеличении светопропускания через богатую тромбоцитами плазму после того, как добавление агониста приводит к активации тромбоцитов и образованию агрегатов. Одно из дополнительных преимуществ световой агрегометрии – возможность регистрации в динамике двухфазного ответа с инициальной агрегацией, вызванной добавленным агонистом и второй волной агрегации вследствие выброса агонистов из плотных гранул и секреции тромбоксана A<sub>2</sub> [5] (рис. 3).

Световая трансмиссионная агрегометрия до сих пор остается золотым стандартом диагностики нарушений функций тромбоцитов. Ограничивает применение этого метода его невысокая чувствительность [10]. Так, в работе *C.P. Hayward* и соавт. 47% пациентов с наследственными тромбоцитопатиями не имели отклонений, по данным агрегометрии. Этот процент

**Рисунок 3**

Образцы агрегатограмм здорового донора (А) и пациента с тромбоастенией Гланцмана (Б): у пациента с тромбоастенией Гланцмана отмечается отсутствие агрегации с АДФ (синий график), коллагеном (зеленый график), адреналином (голубой график); агрегация с ристоцетином (красный график) сохранена


**Таблица 3**

Изменения в агрегации со стандартными агонистами при различной патологии тромбоцитов [5]

| Агонист              | Результат          | Нозология                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Адреналин            | Снижение агрегации | Тромбастения Гланцмана, синдром Вискотта–Олдрича (+/-), дефициты плотных гранул, синдром «белых» тромбоцитов (+/-), дефицит фосфолипазы A2, синдром Квебек, дефект альфа2-адренергического рецептора                                                   |
| АДФ                  |                    | Тромбастения Гланцмана, дефект P2Y12, синдром «серых» тромбоцитов, синдром Вискотта–Олдрича (+/-), дефициты плотных гранул, дефицит фосфолипазы A2                                                                                                     |
| Арахидоновая кислота |                    | Дефицит ЦОГ-1, тромбоастения Гланцмана, синдром «белых» тромбоцитов (+/-), дефект P2Y12, дефициты плотных гранул                                                                                                                                       |
| Коллаген             |                    | Тромбастения Гланцмана, дефект P2Y12, GPVI, синдром «серых» тромбоцитов, синдром Вискотта–Олдрича (+/-), дефициты пула хранения, филаминопатия (+/-), синдром «белых» тромбоцитов (+/-), GATA1-ассоциированная тромбоцитопения, дефицит фосфолипазы A2 |
| Ристоцетин           |                    | Тромбоцитарный тип болезни Виллебранда, синдром Бернара–Сулье, GATA1-ассоциированная тромбоцитопения                                                                                                                                                   |

был выше среди пациентов с нарушениями секреции и выброса АДФ (56%) и дефицитом плотных гранул (86%) [31]. B.B. Dawood и соавт. не обнаружили изменения в агрегатограммах у 42% пациентов, обследованных в связи с подозрением на наличие тромбоцитопатии [32].

Оптимальное число используемых агонистов и их концентраций до сих пор остаются предметом дискуссий. Расширение спектра агонистов потенциально повышает чувствительность метода, однако требует значительного количества крови и увеличивает затраты времени [5]. В работе C.P. Hayward и соавт. чувствительность теста практически не отличалась (47% против соответственно 49 и 51% ложноотрицательных результатов) при использовании полной панели агонистов (коллаген в концентрациях 1,25 и 5 мкг/мл; АДФ – 2,5 и 5 мкМ; арахидоновая кислота – 1,6 мМ; U46619 – 1 мкМ; ристоцетин – 0,5 и 1,25 мг/мл; адреналин – 6 и 100 мкМ), тех же агонистов, взятых в оптимальной концентрации (1,25 мкг/мл – коллаген; 2,5 мкМ – АДФ; 1,6 мМ – арахидоновая кислота; 1 мкМ – U46619; 1,25 мг/мл – ристоцетин; 6 мкМ – адреналин), и при использовании трех «лучших» агонистов (1,25 мкг/мл – коллаген; 1,6 мМ – арахидоновая кислота; 6 мкМ – адреналин). Результат считался аномальным при снижении агрегации хотя бы с одним из агонистов. Авторы пришли к выводу, что комбинация пяти вышеуказанных индукторов (коллаген, адреналин, АДФ, арахидоновая кислота и аналог тромбосана U46619) в единственной концен-

трации достаточна для рутинного применения [31]. *B.B. Dawood и соавт.* обнаружили изменения в агрегатограммах у 58% пациентов при использовании расширенной панели агонистов (АДФ, адреналин, коллаген, CRP, агонисты рецепторов PAR-1 и PAR-4, арахидоновая кислота, U46619, ристоцетин), каждый из которых был добавлен в различных концентрациях. Впоследствии авторы провели ретроспективный «ослепленный» анализ, в ходе которого выявлено, что в 90% случаев отмеченные нарушения функций тромбоцитов могли быть обнаружены с применением меньшего спектра агонистов. В качестве оптимизированной панели индукторов *B.B. Dawood и соавт.* предложили использовать АДФ, адреналин, арахидоновую кислоту, коллаген, ристоцетин и PAR1-специфичный пептид (SFLRN) в единственной концентрации [32].

Согласно рекомендациям ISTH ограниченное число агонистов (ристоцетин, АДФ, коллаген, адреналин, арахидоновая кислота) является достаточным в качестве теста первой линии в диагностике наследственной патологии тромбоцитов [6]. Снижение агрегации с адреналином часто выявляется при скрининге и не служит основанием для дальнейшего обследования, если это изолированная аномалия (табл. 3) [6].

Помимо недостаточной чувствительности, к недостаткам световой агрегометрии относятся ее трудоемкость, чувствительность к погрешностям преаналитического этапа, зависимость от числа тромбоцитов, а также потребность в значительном количестве материала для исследования. Для проведения тестов только со стандартной панелью агонистов требуется около 6–9 мл крови. Исследования часто необходимо повторять для исключения влияния погрешностей преаналитики, особенно в случаях, когда выявляется снижение агрегации только с одним из агонистов [5, 10, 24]. В последнее время стали доступны рекомендации, призванные стандартизировать методику агрегометрии, позволяя сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях [11, 12, 33].

Достоверность результатов агрегометрии зависит от числа тромбоцитов в исследуемом образце: в общем считается, что проведение анализа возможно при числе тромбоцитов в пробе, равном 150–600 тыс/мкл, в противном случае трактовка результатов теста может быть затруднительна. Кроме того, адекватная интерпретация невозможна для образцов с выраженной гипербилирубинемией, липемией, гемолизом [11, 12].

### Модификации агрегометрии

Как отмечено выше, к недостаткам агрегометрии относится время- и трудозатратность, а также потребность в значительном количестве крови, что особенно затрудняет проведение исследования у детей младшего возраста. Для преодоления этих ограничений

была разработана модификация метода с применением 96-луночного прибора *Optimul*, использующего лиофилизированные реагенты. Прибор позволяет проводить одновременную оценку агрегации большого количества образцов с несколькими агонистами в малом объеме PRP [34].

Метод продемонстрировал чувствительность и специфичность, сравнимую с традиционной методикой световой агрегометрии в исследовании *M. Lordkipanidze и соавт.*, что позволяет рассматривать его как перспективный инструмент скрининга [35].

Еще одна модификация агрегометрии – так называемая импедансная агрегометрия, проводимая на образцах цельной крови. В этом случае прибор измеряет электрический импеданс (комплексное сопротивление) между двумя электродами, помещенными в кювету с исследуемым образцом. Импеданс возрастает по мере агрегации тромбоцитов [36]. Преимущества этого метода по сравнению с традиционной методикой: требуется меньшее количество крови и меньшее число манипуляций с образцами, однако опыт применения этой методики крайне ограничен, что делает интерпретацию полученных результатов затруднительной [12].

### Исследование секреции гранул

Выброс гранул – важный механизм амплификации ответа тромбоцитов на первичный стимул. Дефицит гранул или нарушение их мобилизации часто обнаруживают у лиц с умеренными проявлениями кровоточивости [5]. Традиционным методом оценки секреции гранул стала люмиагрегометрия, основанная на детекции АТФ, высвобождаемого из плотных гранул. Оценка концентрации АТФ проводится с помощью биolumинесценции [12].

Альтернативный метод оценки секреции плотных гранул – захват и последующее высвобождение серотонина, меченного радиоактивной меткой. Несмотря на хорошую чувствительность и воспроизводимость [37], метод не получил широкого распространения из-за необходимости манипуляций с радиоактивным веществом. Кроме того, секрецию серотонина можно оценить посредством иммуноферментного метода (ELISA) и высокоэффективной жидкостной хроматографии, хотя обе методики технически сложные и имеют ограниченное применение в клинике [5].

Необходимо отметить, что люмиагрегометрия не позволяет различать дефицит плотных гранул и дефекты их мобилизации, когда число и содержимое гранул не изменены, однако нарушен их выброс в процессе активации тромбоцитов. Поэтому, если полученные данные свидетельствуют о снижении секреции гранул, содержание серотонина или нуклеотидов должно быть оценено в лизате тромбоцитов для диф-

ференциальной диагностики дефицита пула хранения и дефектов мобилизации гранул [12].

В последние годы для оценки секреции гранул широко применяется проточная цитометрия [5].

### Проточная цитометрия

Проточная цитометрия – мощный диагностический инструмент для получения информации о фенотипическом статусе тромбоцитов. Метод позволяет давать количественную оценку экспрессии поверхностных рецепторов и компонентов гранул, взаимодействия тромбоцитов с другими типами клеток и компонентами плазменного гемостаза. Проточная цитометрия может применяться для диагностики наследственных тромбоцитопатий, патологической активации тромбоцитов (в частности, в контексте ишемической болезни сердца и цереброваскулярной патологии), а также для оценки эффективности антиагрегантов [38, 39] (рис. 4).

Методика проточной цитометрии позволяет использовать цельную кровь, богатую тромбоцитами плазму (PRP) и отмытые тромбоциты. Однако использование PRP и отмытых тромбоцитов несет в себе риск *in vitro* активации тромбоцитов в момент проведения сепарационных процедур. Использование цельной крови позволяет минимизировать этот риск и является более физиологичным, поскольку позволяет оценивать состояние тромбоцитов в их естественном «соседстве» с другими клеточными элементами (эритроцитами, лейкоцитами) и плазмой [39, 40]. Важное преимущество этого метода – очень малый объем цельной крови (минимально – около 5 мкл), необходимый для проведения исследования. Эта особенность очень важна, если невозможен забор большого количества крови (например, у детей грудного возраста). Кроме того, метод можно использовать даже у пациентов с глубокой тромбоцитопенией [5, 39].

Проточная цитометрия позволяет подтверждать такие диагнозы, как синдром Бернара–Сулье и тромбоастения Гланцмана – наследственные тромбоцитопатии, связанные с нарушением экспрессии

поверхностных интегринов. В первом случае используются моноклональные антитела к GPIb (CD42b), GPIX (CD42a), GPV (CD42d). Использование цельной крови позволяет избежать проблем сепарации гигантских тромбоцитов, приближающихся по размеру к эритроцитам и даже лейкоцитам. В случае тромбоастении Гланцмана использование моноклональных антител к  $\alpha$ IIb (GPIIb, CD41) и  $\beta$ 3 (GPIIIa, CD61) позволяет быстро установить диагноз как в случае гомозиготного, так и гетерозиготного наследования [39–41]. Дополнительно можно оценивать экспрессию других поверхностных гликопротеинов – GPIa/IIa (CD31 и CD49b), GPIV (CD36), GPVI [6].

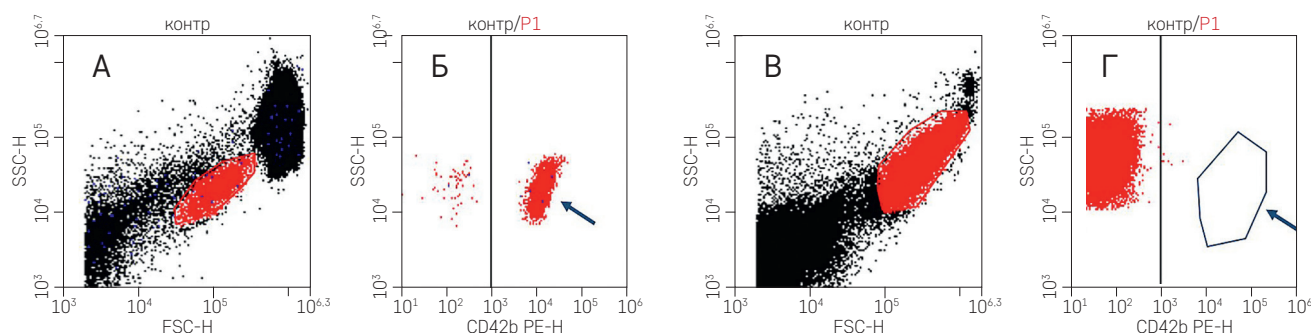
В процессе активации тромбоцитов экспрессия поверхностных антигенов подвергается изменениям. Одно из основных преимуществ проточной цитометрии – возможность обнаруживать активированное состояние циркулирующих тромбоцитов и оценивать реакцию тромбоцитов на добавление специфических агонистов. В качестве активаторов можно использовать тромбин, пептид-агонист тромбинового рецептора (TRAP), аденозиндифосфат (АДФ), коллаген [40]. Лабораторные маркеры активации тромбоцитов включают конформационные изменения интегрин  $\alpha$ 2 $\beta$ 3 (рецептор фибриногена и фактора Виллебранда), поверхностную экспрессию компонентов гранул и секретируемых тромбоцитами белков и сборку комплексов факторов свертывания на поверхности тромбоцитов [39–41].

После активации тромбоцитов интегрин  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 претерпевает конформационные изменения, позволяющие связывать молекулы фибриногена. Появление на поверхности ранее скрытого эпитопа делает его доступным для связывания с моноклональными антителами PAC1 [39–41].

Проточная цитометрия с успехом применяется для диагностики дефицитов гранул и нарушений их мобилизации [5]. P-селектин (CD62P) – компонент мембран альфа-гранул, который не экспрессируется на поверхности покоящихся тромбоцитов. Его появление на поверхности тромбоцитов свидетельствует о дегра-

### Рисунок 4

Оценка экспрессии GPIb (CD 42b) на поверхности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии (А, Б – здоровый донор; В, Г – пациентка с синдромом Бернара–Сулье): у пациентки с синдромом Бернара–Сулье увеличены размеры тромбоцитов (сравнить величину рассеяния света под малыми углами (FSC-H) на графиках А и В), отсутствует экспрессия GPIb (сравнить Б и Г)



нуляции в процессе активации [39–41]. В качестве маркера выброса плотных гранул используют CD63 – белок, содержащийся в мембранах плотных гранул и лизосом, также появляющийся на поверхности тромбоцитов после дегрануляции [39–41].

Посредством проточной цитометрии можно проводить оценку захвата и выброса мепакрина – красителя, селективно связывающегося с адениновыми нуклеотидами в плотных гранулах. Методика позволяет дифференцировать дефицит плотных гранул и дефекты их мобилизации [42, 43]. Альтернативный вариант оценки связывания мепакрина – флуоресцентная микроскопия, однако этот метод значительно более трудоемкий и субъективный [5].

Прокоагулянтная функция тромбоцитов также может быть исследована посредством проточной цитометрии [6, 5]. После стимуляции тромбоцитов сильными агонистами (например, комбинацией коллагена с тромбином или CRP) анионные фосфолипиды, в том числе фосфатидилсерин, перемещаются из внутреннего во внешний липидный слой клеточной мембраны, сообщая внешней поверхности отрицательный заряд. Отрицательный заряд способствует сборке на липидной мембране комплексов факторов свертывания, ответственных за генерацию тромбина. Экстернализация фосфатидилсерина может быть измерена с помощью специальных проб с Аннексином V и используется для диагностики состояний с повышенной (синдром Стормокен) и сниженной (синдром Скотта) прокоагулянтной активностью [6, 5].

В большинстве случаев проточная цитометрия проводится на нефиксированных образцах, а значит, пробу необходимо взять в работу вскоре после забора крови. Таким образом, проведение проточной цитометрии, как и большинства других тестов тромбоцитарных функций, возможно лишь в крупных клинических и исследовательских центрах, поскольку транспор-

тировать образцы из одной клиники в другую нельзя. Для решения этой проблемы в 2007 году был разработан и запатентован фиксирующий раствор, PAMFix (*Platelet Solutins, Ltd., Nottingham, UK*), позволяющий хранить образцы цельной крови в течение 9 суток без нарушения экспрессии поверхностных маркеров (в частности, P-селектина) [44].

Весьма интересен и пока недостаточно изучен вопрос о корреляции результатов проточной цитометрии и степени выраженности клинических проявлений кровоточивости. В нашей недавней работе была обнаружена прямая зависимость между выраженностью геморрагического синдрома, степенью активации интегрина  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  и выбросом плотных гранул ( $p < 0,05$ ). Однако статистически достоверной связи между выраженностью кровоточивости и изолированными нарушениями со стороны альфа- и плотных гранул выявить не удалось, возможно, из-за небольшого размера выборки [21].

### Электронная микроскопия

Трансмиссионная электронная микроскопия обеспечивает увеличение порядка  $10^5$  и разрешение 0,2 нм. Метод позволяет получать информацию прежде всего об аномалиях количества и строения гранул тромбоцитов (табл. 4) [45].

### Особенности оценки функций тромбоцитов у новорожденных и детей первого года жизни

В течение первого года жизни большинство детей не сталкивается с ситуациями, представляющими «серьезное испытание» для состоятельности системы гемостаза. Благодаря этому патологические состояния с умеренными и незначительными проявлениями кровоточивости, к числу которых относится большая часть тромбоцитопатий, могут не иметь клинических проявлений в грудном возрасте. В то же время тяже-

**Таблица 4**

Аномалии строения тромбоцитов, выявляемые посредством трансмиссионной электронной микроскопии [5]

| Параметр                    |                | Результат                | Нозология                                                                                |
|-----------------------------|----------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Содержание гранул           | Альфа          | Снижено                  | Синдром «серых» тромбоцитов, ARC-синдром, MGPS ( <i>Medich giant platelet syndrome</i> ) |
|                             | Дельта         |                          | Дефициты пула хранения (дельта)                                                          |
|                             | Альфа и дельта |                          | Сочетанные дефициты пула хранения                                                        |
| Морфология гранул           |                | Гигантские альфа-гранулы | Синдром Пари-Труссо, филаминопатия                                                       |
| Другие структурные аномалии |                | Мембранозные включения   | MGPS                                                                                     |
|                             |                | Аномалии органелл        | Синдром «белых» тромбоцитов                                                              |
|                             |                |                          | Синдром Йорк                                                                             |

лая патология гемостаза может проявиться уже в первые часы и сутки жизни в виде развития кефалогематом, внутричерепных кровоизлияний, кровотечений из пуповинного остатка [46].

Помимо сложностей венозного доступа и невозможности забора большого количества крови для анализа, оценка функций тромбоцитов у новорожденных и грудных детей дополнительно затрудняется отсутствием общепринятых референсных значений [47, 48]. По этическим соображениям забор венозной крови у здоровых новорожденных для использования в качестве нормального контроля практически не производится. Во многих случаях данные о функциональных особенностях тромбоцитов новорожденных детей были получены на образцах пуповинной крови [49]. Впрочем, по данным *A.G. Sitaru и соавт.*, экспрессия интегрина  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , Р-селектина и связывание PAC1 с активированной формой  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  не различались в сериях образцов, взятых из пуповинной и венозной крови новорожденных в первые сутки жизни. Также в работе была продемонстрирована меньшая по сравнению со взрослой популяцией экспрессия интегрина  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  у новорожденных. Кроме того, имели место различия в экспрессии поверхностных гликопротеинов у доношенных и недоношенных новорожденных. Дети с гестационным возрастом менее 30 недель имели достоверно более низкие показатели экспрессии интегрина  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  [50].

В то время как число и средний объем тромбоцитов у новорожденных не отличаются от таковых у людей других возрастных групп, существуют данные о ряде ультраструктурных отличий. В частности, у новорожденных описано меньшее по сравнению со взрослыми количество альфа-гранул, псевдоподий и видимых микротубулярных структур [51].

По-видимому, референсные интервалы функциональных тестов тромбоцитов у детей в возрасте старше 1 года не отличаются от таковых у взрослых [52]. Однако у новорожденных в течение первых двух недель жизни отмечается снижение агрегации в ответ на добавление стандартных агонистов (адреналина, коллагена, АДФ, тромбина, аналогов тромбоксана A2), снижение мобилизации кальция и секреции гранул в ответ на добавление индукторов, а также снижение связывания PAC1 после активации. Напротив, адгезия и аглютинация с ристоцетином усилены по сравнению с этими показателями в старших возрастных группах [47].

### Заключение

Наследственные нарушения функций тромбоцитов, в особенности нетяжелые их формы, представляют крайне сложную задачу для постановки точного диагноза. Доступные методики оценки функций тромбоцитов до сих пор плохо стандартизированы, требуют

соответствующей оснащенности лаборатории и квалификации сотрудников. Учитывая необходимость проведения анализа в течение ближайшего времени после венопункции, данный диагностический поиск возможен исключительно в специализированных центрах. При этом сохраняется возможность недооценки распространенности наследственной патологии тромбоцитов в популяции [5, 13, 16].

Одним из наиболее перспективных направлений в диагностике наследственных тромбоцитопатий представляется использование проточной цитометрии. Эта методика позволяет исследовать сразу несколько аспектов функций тромбоцитов, в том числе у пациентов с выраженной тромбоцитопенией. Еще одно явное преимущество проточной цитометрии – потребность в крайне малом количестве крови, что особенно важно для педиатрических пациентов [5].

Одно из новых направлений в диагностике наследственной патологии тромбоцитов, активно развивающееся в последние годы, – молекулярно-генетическая диагностика. Подробное рассмотрение данного направления не входит в рамки настоящего обзора, информацию о нем можно найти в недавних публикациях [7, 15, 53, 54]. Развитию молекулярно-генетической диагностики способствовали успехи технологии *next-generation sequencing (NGS)*, позволившие одновременно анализировать большое число образцов, снижая таким образом финансовые и временные затраты на проведение исследования [55]. Возможно, в ближайшем будущем молекулярно-генетическая диагностика вытеснит функциональные тесты из первой линии диагностики тромбоцитопатий [15, 53]. Однако результаты секвенирования часто сложны для интерпретации, а связь обнаруженной мутации с фенотипическими проявлениями кровоточивости не всегда может быть однозначно доказана. Кроме того, нетяжелые геморрагические проявления часто являются комплексным состоянием, реализующимся в результате сонаследования нескольких дефектов, каждый из которых в отдельности не вызывает проявлений кровоточивости [6].

Таким образом, на сегодняшний день поэтапное проведение функциональных тестов в соответствии с опубликованными международными рекомендациями остается основой диагностики наследственных тромбоцитопатий [15].

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### ORCID

Д.В. Фёдорова <http://orcid.org/0000-0003-4567-1871>

## Литература

- Gremmel T., Frelinger A.L. 3rd, Michelson A.D. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):191–204.
- Broos K., Feys H.B., De Meyer S.F., Vanhoorelbeke K., Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* 2011;25(4):155–167.
- Linden M.D. Platelet Physiology. In: Clifton N.J., ed. *Methods in Molecular Biology*. Clifton, NJ: Humana Press; 2013:13–30.
- Golebiewska E.M., Poole A.W. Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 2015;29(3):153–162.
- Dovlatova N. Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders. *Br J Haematol.* 2015;170(2):150–161.
- 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. *J Thromb Haemost.* 2015;13(2):314–322.
- 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 Suppl 1:351–363.
- Miller C.H., Philipp C.S., Stein S.F., Kouides P.A., Lukes A.S., Heit J.A. et al. The spectrum of haemostatic characteristics of women with unexplained menorrhagia. *Haemophilia.* 2011;17(1):e223–e229.
- Lowe G.C., Lordkipanidzé M., Watson S.P.; UK GAPP study group. Utility of the ISTH bleeding assessment tool in predicting platelet defects in participants with suspected inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2013;11(9):1663–1668.
- Boender J., Kruip M.J., Leebeek F. A diagnostic approach to mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2016;14(8):1507–1516.
- Cattaneo M., Cerletti C., Harrison P., Hayward C.P., Kenny D., Nugent D. et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013;11:1183–1189.
- Harrison P., Mackie I., Mumford A., Briggs C., Liesner R., Winter M. et al.; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol.* 2011;155(1):30–44.
- Bolton-Maggs P.H., 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(5):603–633.
- Diz-Küçükaya R. Inherited platelet disorders including Glanzmann thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2013;2013:268–275.
- Gresele P., Bury L., Falcinelli E. Inherited Platelet Function Disorders: Algorithms for Phenotypic and Genetic Investigation. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):292–305.
- Quiroga T., Mezzano D. Is my patient a bleeder? A diagnostic framework for mild bleeding disorders. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:466–474.
- Mauer A.C., Khazanov N.A., Levenkova N., Tian S., Barbour E.M., Khalida C. et al. Impact of sex, age, race, ethnicity and aspirin use on bleeding symptoms in healthy adults. *J Thromb Haemost.* 2011;9(1):100–108.
- Rodeghiero F., Castaman G., Tosetto A., Batlle J., Baudo F., Cappelletti A. et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost.* 2006;4(4):2619–2626.
- Bowman M., Riddel J., Rand M.L., Tosetto A., Silva M., James P.D. Evaluation of the diagnostic utility for von Willebrand disease of a pediatric bleeding questionnaire. *J Thromb Haemost.* 2009;7(8):1418–1421.
- 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. *J Thromb Haemost.* 2010;8(9):2063–2065.
- Жарков П.А., Демина И.А., Пантелеев М.А. Использование метода функциональной активности тромбоцитов для диагностики тромбоцитопатий у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2016;15(2):40–46.
- Duke W. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. Description of a method for determining the bleeding time and the coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by blood transfusion. *JAMA.* 1910;55:1185–1192.
- Gresele P., Harrison P., Bury L., Falcinelli E., Gachet C., Hayward C.P. et al. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014;12(9):1562–1569.
- Norman J.E., Westbury S.K., Jones M.L., Mumford A.D. How should we test for nonsevere heritable platelet function disorders? *Int J Lab Hematol.* 2014;36(3):326–333.
- Quiroga T., Pereira J., Mezzano D. Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. *J Thromb Haemost.* 2004;2(6):892–898.
- Podda G.M., Bucciarelli P., Lussana F., Lecchi A., Cattaneo M. Usefulness of PFA-100 testing in the diagnostic screening of patients with suspected abnormalities of hemostasis: comparison with the bleeding time. *J Thromb Haemost.* 2007;5(12):2393–2398.
- Kratzer M., Born G. Simulation of primary haemostasis in vitro. *Haemostasis.* 1985;15(6):357–362.
- Kundu S.K., Heilmann E.J., Sio R., Garcia C., Davidson R.M., Ostgaard R.A.

- Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21 Suppl 2:106–112.
29. Hayward C.P., Harrison P., Cattaneo M., Ortel T.L., Rao A.K.; Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Platelet function analyzer PFA-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost.* 2006;4(2): 312–319.
30. Born G. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962;9(194):927–929.
31. Hayward C.P., Pai M., Liu Y., Moffat K.A., Seecharan J., Webert K.E. et al. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J Thromb Haemost.* 2009;7(4):676–684.
32. Dawood B.B., Lowe G.C., Lordkipanidzé M., Bem D., Daly M.E., Makris M. et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood.* 2012;120(25):5041–5049.
33. Hayward C.P., Moffat K.A., Raby A., Israels S., Plumhoff E., Flynn G. et al. Development of North American consensus guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using light transmission aggregometry. *Am J Clin Pathol.* 2010;134(4):955–963.
34. Chan M.V., Armstrong P.C., Papalia F., Kirkby N.S., Warner T.D. Optical multi-channel (optimul) platelet aggregometry in 96-well plates as an additional method of platelet reactivity testing. *Platelets.* 2011;22(7):485–494.
35. Lordkipanidz M., Lowe G.C., Kirkby N.S., Chan M.V., Lundberg M.H., Morgan N.V. et al.; UK Genotyping and Phenotyping of Platelets Study Group. Characterization of multiple platelet activation pathways in patients with bleeding as a high-throughput screening option: use of 96-well Optimul assay. *Blood.* 2014;123(8):e11–e22.
36. Israels S.J. Laboratory testing for platelet function disorders. *Int J Lab Hematol.* 2015; 37 Suppl 1:18–24.
37. Quiroga T., Goycoolea M., Matus V., Zúñiga P., Martínez C., Garrido M. et al. Diagnosis of mild platelet function disorders. Reliability and usefulness of light transmission platelet aggregation and serotonin secretion assays. *Br J Haematol.* 2009;147(5):729–736.
38. Демина И.А., Жарков П.А., Пантелеев М.А. Использование метода исследования функциональной активности тромбоцитов у детей с геморрагическим синдромом. *Гематология и трансфузиология. Восточная Европа.* 2015; 1:157–164.
39. Linden M.D. Platelet flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2013;992:241–262.
40. Michelson A.D. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2006;35(1–2): 67–82.
41. Carubbi C., Masselli E., Gesi M., Galli D., Mirandola P., Vitale M. et al. Cytofluorimetric platelet analysis. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(1):88–98.
42. Wall J.E., Buijs-Wilts M., Arnold J.T., Wang W., White M.M., Jennings L.K., Jackson C.W. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol.* 1995;89(2):380–385.
43. Cai H., Mullier F., Frotscher B., Briquel M.E., Toussaint M., Massin F. et al. Usefulness of Flow Cytometric Mepacrine Uptake / Release Combined with CD63 Assay in Diagnosis of Patients with Suspected Platelet Dense Granule Disorder. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):282–291.
44. Fox S.C., May J.A., Shah A., Neubert U., Heptinstall S. Measurement of platelet P-selectin for remote testing of platelet function during treatment with clopidogrel and/or aspirin. *Platelets.* 2009;20(4):250–259.
45. Clauser S., Cramer-Borde E. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2009;35(2):213–223.
46. Nowak-Göttl U., Limperger V., Bauer A., Kowalski D., Kenet G. Bleeding issues in neonates and infants – update 2015. *Thromb Res.* 2015;135: S41–3.
47. Israels S.J. Diagnostic evaluation of platelet function disorders in neonates and children: an update. *Semin Thromb Hemost.* 2009;35(2):181–188.
48. Knöfler R., Streif W. Strategies in Clinical and Laboratory Diagnosis of Inherited Platelet Function Disorders in Children. *Transfus Med Hemother.* 2010;37(5):231–235.
49. Schlegel N., Bardet V., Kenet G., Muntean W., Zieger B., Nowak-Göttl U.; Working Group on Standardisation in Perinatal and Pediatric Hemostasis. Diagnostic and therapeutic considerations on inherited platelet disorders in neonates and children. *Klin Padiatr.* 2010;222 (3): 209–214.
50. Sitaru A.G., Holzhauser S., Speer C.P., Singer D., Obergefell A., Walter U. et al. Neonatal platelets from cord blood and peripheral blood. *Platelets.* 2005;16(3–4):203–210.
51. Strauss T., Sidlik-Muskatell R., Kenet G. Developmental hemostasis: Primary hemostasis and evaluation of platelet function in neonates. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2011;16(6):301–304.
52. Bonduel M., Frontroth J.P., Hepner M., Sciuccati G., Feliu-Torres A. Platelet aggregation and adenosine triphosphate release values in children and adults. *JThrombHaemost.* 2007;5(8):1782–1783.
53. Daly M.E., Leo V.C., Lowe G.C., Watson S.P., Morgan N.V. What is the role of genetic testing in the investigation of patients with suspected platelet function disorders? *Br J Haematol.* 2014;165(2):193–203.
54. Lentaigne C., Freson K., Laffan M.A., Turro E., Ouwehand W.H.; BRIDGE-BPD Consortium and the ThromboGenomics Consortium. Inherited platelet disorders: toward DNA-based diagnosis. *Blood.* 2016;127(23):2814–2823.
55. Leo V.C., Morgan N.V., Bem D., Jones M.L., Lowe G.C., Lordkipanidzé M et al. Use of next-generation sequencing and candidate gene analysis to identify underlying defects in patients with inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2015;13(4):643–650.