

На правах рукописи

ПОЛОХОВ ДМИТРИЙ МИХАЙЛОВИЧ

ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

3.1.28. Гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Жарков Павел Александрович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий отделом патологии гемостаза ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Демихов Валерий Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, директор «Научно-клинический центр гематологии, онкологии и иммунологии. ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рукавицын Олег Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, начальник гематологического центра – главный гематолог Министерства обороны Российской Федерации и Главного военно-клинического госпиталя им. Н.Н. Бурденко.

Ведущая организация:

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « __ » _____ 2023г в « __ » часов на заседании диссертационного совета 21.1.025.01 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (117997, Москва, ул. Саморы Машела, д.1) и на сайте <http://www.fnkc.ru>

Автореферат разослан « __ » _____ 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Жуков Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Тромбоциты играют ключевую роль в реализации гемостатических реакций посредством образования тромбоцитарной части тромбов и модулирования образования фибринового сгустка. В норме на поверхности тромбоцита экспрессируется более 45 различных видов рецепторов, а тромбоцитарные α -гранулы содержат порядка 300 белков (хемокины, молекулы адгезии, факторы свертывания и др.) (Пантелеев М.А., 2014; Flaumenhaft, 2017).

Нарушения функций тромбоцитов при врождённых или приобретённых болезнях и состояниях гетерогенны по патогенезу, тяжести проявлений и распространенности. Нарушения количества тромбоцитов (тромбоцитопении или тромбоцитозы), морфологии, фенотипа и сигнальных путей определяют специфику дисфункции тромбоцитарного звена гемостаза (Gresele, 2018). Учитывая многообразие функций, выполняемых тромбоцитами в процессе формирования тромба, клиническая картина при нарушении данного звена гемостаза крайне разнообразна и включает как геморрагические (Knöfler, 2007; Prodan, 2010; Streif, 2010), так и ишемические, тромботические проявления (Prodan et al., 2010; Prodan et al., 2011). Кровотечения различной интенсивности могут наблюдаться при наследственных заболеваниях тромбоцитов (НЗТ), включающих более 50 нозологических единиц и характеризующихся разнообразием качественных (строение и функции) и количественных нарушений тромбоцитов (Bidlingmaier, 2012). С другой стороны, при состояниях, ассоциированных с повышением активности тромбоцитов, может наблюдаться склонность к возникновению тромбозов, а при некоторых хронических миелопролиферативных заболеваниях возможно сочетание повышенной кровоточивости и ишемических проявлений (Connor, 2013; Frenkel et al., 2003; Kubisz et al., 2013).

Известно, что система гемостаза человека с возрастом претерпевает изменения (Maureen, 1987; Monagle, 2006), а маркерный состав тромбоцитов у здоровых взрослых несколько отличается от состава здоровых детей, что делает нецелесообразным использование референсных диапазонов взрослых для детей. Референсные диапазоны тромбоцитарных тестов и свертываемости крови для детей разного возраста недостаточно изучены (Hézar, 2003; Koltsova, 2019; Yip, 2015).

Степень разработанности темы исследования

Многообразие патогенетических механизмов НЗТ, а также значимость клинических проявлений при данных нарушениях, диктует необходимость разработки и внедрения новых методов и подходов к лабораторным исследованиям, делая данный процесс многоступенчатым и требующим участия специализированных лабораторий различного профиля (Knöfler, 2007; Streif, 2010). Одним из важнейших лабораторных методов, позволяющих оценить основные функции тромбоцитов является оптическая агрегометрия (ОА) (Cattaneo, 2013; Gresele, 2015), позволяющая выявлять лишь выраженные нарушения агрегации тромбоцитов, требует больших объемов крови, зависит от количества тромбоцитов в образце, а значит неприменима в случаях тромбоцитопении. Метод проточной цитометрии (ПЦ) позволяет оценить основные рецепторы и гранулы тромбоцитов (Bidlingmaier, 2012; Gresele, 2018). Результат исследования не зависит от количества тромбоцитов в образце. Тем не менее, ПЦ, в классической постановке не предусматривает активации тромбоцитов, а значит, неспособна оценить изменения в клетке при ее активации. С учетом достигнутого прогресса в понимании функций тромбоцитов, на базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва на основании метода ПЦ было разработано лабораторное исследование «Функциональная активность тромбоцитов» (ФАТ). В отличие от «стандартной» ПЦ, исследование ФАТ позволяет оценивать, как нативное (в покое) состояние тромбоцитов, так и их функциональный потенциал (при активации): рецепторы адгезии и агрегации, секрецию двух типов гранул, прокоагулянтную активность и морфологические характеристики по светорассеянию. Широкий охват анализируемых маркеров в сочетании с небольшим объемом образца крови для исследования (20 мкл) делают тест ФАТ привлекательным для диагностики НЗТ, особенно в педиатрии. Выявление нарушений конкретных маркеров функции тромбоцитов

позволяет предположить возможный вклад данного дефекта в формировании клинической картины.

Цель исследования

Оценить диагностические возможности лабораторного исследования «Функциональная активность тромбоцитов» (ФАТ), основанного на методе ПЦ, у детей с различными нарушениями тромбоцитарного гемостаза.

Задачи исследования

1. Изучить возможность применения лабораторного исследования ФАТ для диагностики классифицированных тромбоцитопатий.

2. Изучить возможность применения лабораторного исследования ФАТ для выявления не классифицированных нарушений функции тромбоцитов у пациентов с неуточнённым геморрагическим синдромом.

3. Изучить возможность применения лабораторного исследования ФАТ для выявления ранее не описанных функциональных нарушений тромбоцитов при наследственных заболеваниях тромбоцитов.

4. Изучить возможность применения лабораторного исследования ФАТ для выявления связей между нарушениями функции тромбоцитов и геморрагическим синдромом.

Новизна исследования

1. Проведён комплексный анализ особенностей фенотипа тромбоцитов с использованием исследования ФАТ.

2. Описаны взаимосвязи между количеством, морфологией, фенотипом тромбоцитов и их вкладом в развитие клинической картины.

3. Выявлены специфические нарушения у пациентов с неуточненным геморрагическим синдромом.

Теоретическая значимость работы

Полученные данные позволят углубить фундаментальные знания и понимание морфофункциональных особенностей тромбоцитов у пациентов детского возраста с тромбоцитопатиями/пениями, повышенным количеством тромбоцитов и неуточнённым геморрагическим синдромом.

Практическая значимость работы

1. Определены клиничко-лабораторные паттерны дисфункции тромбоцитов у пациентов с различными НЗТ.

2. Разработаны практические рекомендации по применению исследования ФАТ для диагностики НЗТ у детей, позволяющие оценивать выраженность нарушений маркеров функции тромбоцитов персонализировано, за счёт использования разработанных расчётных индексов в дополнение к референсным диапазонам.

Методология и методы исследования

В ходе работы применялся комплексный методологический подход к изучению характера дисфункции тромбоцитов у детей с различными нарушениями функции тромбоцитов и клиническими проявлениями.

На первом этапе исследования пациенты проходили комплексное клиничко-лабораторное обследование для оценки тяжести гемостатических нарушений и постановки диагноза. Оценка кровоточивости проводилась с использованием Педиатрического опросника кровоточивости.

Большинству пациентов было выполнено генетическое секвенирование нового поколения для выявления патогенных мутаций. Оценка функции тромбоцитов проводилась с использованием метода проточной цитометрии, была набрана возраст-релевантная контрольная группа здоровых добровольцев.

На втором этапе пациенты были разделены на группы в зависимости от размера и количества тромбоцитов, согласно общепринятым классификациям для тромбоцитопатий и тромбоцитопений. Были выделены группы пациентов с нормальным размером и количеством, но нарушенной функцией; с нормальным размером и тромбоцитопенией; с уменьшенным размером и тромбоцитопенией; увеличенным размером и тромбоцитопенией и группа с тромбоцитозами.

На третьем этапе был проведен комплексный анализ выявленных морфофункциональных нарушений тромбоцитов в группах пациентов. Были рассмотрены особенности нарушений тромбоцитов при различных мутациях, выявлена связь между тяжестью кровоточивости и некоторыми нарушениями тромбоцитов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Исследование ФАТ может применяться для диагностики ряда классифицированных тромбоцитопатий.
2. Исследование ФАТ может выявлять патологические изменения тромбоцитов у пациентов с неклассифицированными нарушениями функции тромбоцитов.
3. Исследование ФАТ позволяет выявлять ранее не описанные нарушения среди классифицированных наследственных заболеваний тромбоцитов.
4. Выявленные нарушения прокоагулянтной активности тромбоцитов связаны с тяжестью геморрагического синдрома.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов диссертации подтверждается большим количеством материала — 191 клинический случай обследования детей с нарушениями функции тромбоцитов. Использовались современные методы лабораторных исследований, контроля качества лабораторных анализов, была набрана контрольная группа из 42 здоровых детей. Результаты исследования статистически обработаны с применением актуальных подходов биомедицинской статистики.

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на Объединенном Конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis» совместно с 9-й Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (Санкт-Петербург, октябрь 2018), X Межрегиональном совещании НОДГО (Сочи, апрель 2019), The 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical and Laboratory Medicine – EuroMedLab 2019 (Барселона, май 2019), The third European Congress of Thrombosis and Haemostasis (Глазго, октябрь 2019), 25th Congress of the European Hematology Association (Virtual Edition, июнь 2020), Congress of the International Society on Thrombosis and Hemostasis (Virtual Edition, июль 2020), Российском Форуме по тромбозу и гемостазу (РФТГ) совместно с 10-ой (юбилейной) конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (Virtual Edition, октябрь 2020), Научно-практической конференции «Детская онкология, гематология и иммунология XXI века: от науки к практике» (Москва, май 2021), Congress of the International Society on Thrombosis and Hemostasis (Virtual Edition, июль 2021), II объединенный Конгресс НОДГО и РОДО (Москва, ноябрь 2021).

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, из них 10 в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий Высшей аттестационной комиссии (ВАК) при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 9 в зарубежных журналах, индексируемых реферативными базами данных Web of Science или Scopus.

Результаты проведенного исследования используются в клинической работе ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России и в подготовке ординаторов и

курсантов на кафедрах гематологии, и клеточных технологий, и трансфузиологии, и клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Объём и структура диссертации

Работа изложена на 157 страницах машинописного текста, иллюстрирована 17 таблицами и 46 рисунками. Диссертационная работа состоит из четырёх глав. Первая глава содержит введение, обзор литературы по теме диссертации, вторая глава содержит информацию о материалах и методах исследования, в третьей главе приведены результаты, в четвертой – обсуждение результатов, заключение, выводы и практические рекомендации, список использованной литературы и приложения. Библиография включает 150 источников литературы (10 отечественных, 140 зарубежных).

Участие автора в получении результатов исследования

Автор участвовал в планировании данной работы, постановке цели и задач исследования; самостоятельно анализировал клинический материал и проводил лабораторные исследования пациентов; самостоятельно анализировал полученные данные, готовил публикации и доклады по теме диссертации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основные положения

Данное исследование – наблюдательное, одномоментное, не интервенционное, моноцентровое, проведено на основе анализа результатов обследования 191 пациента, обращавшегося в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в период с февраля 2015 по январь 2021 гг. В исследование включались пациенты с жалобами на проявления геморрагического синдрома или на лабораторно выявленное изменение количества тромбоцитов и отсутствием отклонений со стороны коагуляционного звена гемостаза. Для диагностики и изучения нарушений функции тромбоцитов выполнялись исследования, определенные локальным стандартом обследования детей (основанном на международных рекомендациях по диагностике наследственных нарушений функции тромбоцитов SSC ISTH 2015) (Gresele, 2015).

В лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза был проведен набор контрольной группы (КГ) из 42 здоровых детей. Письменное информированное согласие было получено от всех родителей или от их официальных представителей. Исследование проведено с одобрения Независимого этического комитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Рогачева» (протокол № 8/2016 от 18.10.2016).

Пациентам проводилась клиническая оценка выраженности патологических проявлений, проведен сбор личного и семейного анамнеза, анализировались пол, возраст и тяжесть геморрагического синдрома по шкале Pediatric Bleeding Questionnaire (PBQ) (Bidlingmaier, 2012; Mittal, 2015). Помимо повышенной кровоточивости и изменений количества тромбоцитов, учитывалось наличие симптомов, часто связанных с НЗТ (ослабление слуха; иммунодефицит; почечная дисфункция; пороки сердца; ментальные нарушения; дисморфизм лица, глаз, костей, кожи и др.). Первичное лабораторное обследование включало: общий анализ крови, коагулограмму, агрегометрию тромбоцитов и исследование ФАТ. Дифференциальная диагностика проводилась с коагулопатиями, болезнью Виллебранда, иммунной тромбоцитопенией. Генетическое исследование методом NGS было проведено 66% пациентов.

Всего наблюдался 191 пациент, из них 102 мальчика и 89 девочек (соотношение 1,15: 1). Медиана возраста обращения составила 8,5 лет (от 8 мес. до 18 лет). Количество тромбоцитов варьировало от 6 до $2744 \times 10^9/\text{л}$, с медианой $199 \times 10^9/\text{л}$. Пациенты были разделены на три большие группы исходя из количества тромбоцитов: 1) с нормальным количеством тромбоцитов; 2) с тромбоцитопенией и 3) с повышенным количеством тромбоцитов. Пациенты с нормальным количеством тромбоцитов дополнительно подразделялись на подгруппы: а) пациентов с

установленным диагнозом нормоклеточного наследственного заболевания тромбоцитов и б) пациентов с геморрагическим состоянием неуточнённым (ГСН), предположительно тромбоцитарного генеза. В свою очередь, пациенты с тромбоцитопенией разделялись на три подгруппы по размеру тромбоцитов: а) с нормальным размером (нормотромбоцитопении); б) с уменьшенным размером тромбоцитов (микротромбоцитопения); в) с увеличенным размером (макротромбоцитопении) (Таблица 1). Для систематизации и анализа полученных результатов была создана электронная научная база данных.

Пациенты имели тяжесть геморрагического синдрома от 0 до 19 баллов, с медианой 3 балла по шкале RBQ (Таблица 1). Кровоточивость проявлялась в различных комбинациях у 148 (75%) пациентов в виде экхимозов и петехиальной сыпи, носовых кровотечений (в том числе обильных, требующих госпитализации), кровоточивостью со слизистых ротовой полости, обильных менструальных кровотечений, повышенной кровоточивостью при оперативных вмешательствах и из мелких ран, кровотечений из пуповинного остатка, кровотечениями после удаления зубов, гематурией, желудочно-кишечными кровотечениями, гемартрозами, кефало- и субдуральными гематомами. При этом 33 (17,3%) пациента хотя бы однократно были госпитализированы из-за некупирующихся самостоятельно кровотечений, в том числе в отделения интенсивной терапии, с проведением гемостатической медиакаментозной терапии антифибринолитическими средствами, препаратами факторов свёртывания крови, гемотрансфузий.

Среди 26 пациентов с нормоклеточными НЗТ и геморрагическим синдромом, у 20 была диагностирована тромбастения Гланцмана (ТГ) и у 6 пациентов синдром Германского-Пудлака (СПП). 75 пациентов с тромбоцитопениями были разделены на 3 подгруппы, в зависимости от размера клеток. Среди 25 пациентов с нормотромбоцитопениями, у 14 пациентов была диагностирована RUNX1-связанная тромбоцитопения; у 8 пациентов ANKRD26-связанная тромбоцитопения; у 2 пациентов ETV6-связанная тромбоцитопения; у 1 пациента SYCS-связанная тромбоцитопения. Все 25 пациентов с микротромбоцитопенией имели диагноз синдрома Вискотта-Олдрича (СВО). Среди 25 пациентов с макротромбоцитопенией у 15 пациентов была диагностирована MYH9-связанная тромбоцитопения (среди них 2 пациентам диагностирован синдром Фехтнера); у 6 пациентов синдром Бернара-Сулье (СБС); у 3 пациентов TUBB1-связанная тромбоцитопения; у 1 пациента SLFN14-связанная тромбоцитопения.

Таблица 1 – Характеристика групп пациентов, включенных в исследование (представлена медиана, min и max значения)

Показатель	КГ	Нормокл. НЗТ	Тромбоцитопении			Тромбоцитозы	ГСН
			Нормо	Микро	Макро		
n*	42	26	25	25	25	40	50
Мальчики	18	10	13	25	12	20	22
Девочки	24	16	12	0	13	20	20
Возраст, лет	10 (2–17)	6 (0,8–17)	5 (1–15)	2 (1–18)	9 (1–17)	13 (1,5–18)	9 (2–17)
RBQ, баллы	0	8 (0–19)	2 (0–7)	3 (0–6)	2 (0–16)	0 (0–2)	3 (2–6)
PLT**, x10 ⁹ /л	226 (164–376)	292 (131–467)	77 (24–162)	58 (12–122)	56 (6–153)	1068 (591–2744)	252 (140–385)

*n– количество обследуемых; **PLT – количество тромбоцитов

Среди 40 обследованных пациентов с повышенным количеством тромбоцитов, диагноз эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) был поставлен 27 пациентам и истинная полицитемия (ИП) 13 пациентам. Диагнозы были установлены согласно критериям классификации миелоидных новообразований и острого лейкоза Всемирной организации здравоохранения 2016 года (Arber, 2016). У 50 пациентов с ГСН были исключены тромбоцитопения и нарушения гемостаза плазменного генеза.

Методика выполнения исследования функциональной активности тромбоцитов

Для проведения теста кровь забирали в стандартные пробирки S–Monovette, содержавшие 3,2%–ный раствор цитрата натрия с отношением 1:9. Кровь (20 мкл) разбавлялась 400 мкл буфера А (БА) (NaCl – 1,5 М; KCl – 27 мМ; MgCl₂ – 10 мМ; Na₂HPO – 4 мМ; HEPES– 200 мМ; глюкоза – 50 мМ; BSA – 5%). Далее, образец разделялся на 2 аликвоты: аликвота 1 объемом 300 мкл инкубировалась при комнатной температуре 30 минут; в аликвоту 2 объемом 100 мкл добавлялось 5 мкл раствора мепакрина (Me), с концентрацией 1 мМ; длительность инкубации 30 минут при температуре 37 °С. После инкубации, по 10 мкл образца из аликвот 1 и 2 инкубировались с 10 мкл смеси БА с 2,5 мМ хлорида кальция (БА+Ca); и по 10 мкл образца из аликвоты 1 и 2 инкубировалось с активирующей смесью (AC) пептидных аналогов тромбина (TRAP, агонист PAR-1 рецептора) с концентрацией 12,5 мкМ, коллагена (CRP, агонист гликопротеина VI), в концентрации 20 мкг/мкл и БА+Ca, в течение 10 мин при комнатной температуре.

Далее производилось окрашивание образцов: смесь антител 1 включала PAC1-FITC, CD42b-PE, Annexin V-Alexa 647; смесь антител 2 включала: CD62P-Alexa 647, CD61-PE (Biolegend, США), в течение 10 мин при комнатной температуре. После инкубации образцы разбавлялись дополнительно БА+Ca в 10 раз и раскапывались в планшет для исследования на проточном цитометре. Таким образом, суммарное разбавление крови происходило в 820 раз. Подсчёт количества тромбоцитов в исследуемых образцах является дополнительным параметром теста ФАТ. После сбора образца гейтирование популяции тромбоцитов проводилось по параметрам прямого светорассеяния (FSC – front scatter – размер тромбоцитов), бокового светорассеяния (SSC – side scatter – гранулярность тромбоцитов) и маркерам функции тромбоцитов. В качестве якорных маркеров использовались антигены CD42b и CD61. Исследования производились на проточном цитометре Novocyte (Acea Bioscience, США).

Для уточнения интерпретации полученных данных были введены дополнительные параметры исследования, названные «индексами». Для оценки морфологических характеристик тромбоцитов использованы индексы FSC/SSC в покое и после активации (описывают отношение размера тромбоцитов к их гранулярности). Для оценки выраженности изменений рецепторов, гранул и фосфатидилсерина были введены «индексы активации», как отношение «в покое / после активации», позволившие интегрально и персонализировано оценивать эффективность работы механизмов активации тромбоцитов не зависимо от размера клеток. Пороговые значения (cut-off) для изучаемых показателей проводились по минимальным значениям в КГ. Относительные значения индексов позволили исключить ложную интерпретацию абсолютных значений, в тех случаях, когда при активации, формально, абсолютные значения находились в пределах референсных диапазонов, но в действительности у данного пациента должных изменений фенотипа тромбоцитов не происходило.

Молекулярно-генетическое исследование

Генетические исследования были проведены 126 пациентам для подтверждения диагноза. Анализ ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови, проводился на платформе NextSeq (Illumina, США) методом парно-концевого чтения со средней глубиной прочтения не менее 100х и покрытием целевого региона 99% при глубине прочтения не менее 10х, с использованием таргетной панели генов «Гемостаз», включающей 134 гена: *ABCA1, ABCG5, ABCG8, ACBD5, ACTN1, ACVRL1, ADAMTS13, ANKRD18A, ANKRD26, ANO6, AP3B1, AP3D1, ARPC1B, BLOC1S3, BLOC1S6, CD36, CD83, CHST14, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, CPB2, CYCS, DIAPH1, DTNBP1, ENG, ETV6, F10, F11, F12, F13A1, F13B, F2, F2R, F2RL3, F5, F7, F8, F9, FERMT3, FGA, FGB, FGG, FLII, FLNA, FYB1, GATA1, GFIIB, GGCX, GNAI3, GNAQ, GNAS, GP1BA, GP1BB, GP5, GP6, GP9, HABP2, HOXA11, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, HRG, IFNA17, IFNLRI, IL10, ITGA2, ITGA2B, ITGB3, KLKB1, KNG1, LMAN1, LYST, MASTL, MCFD2, MECOM, MLPH, MPI, MPL, MYH9, MYO5A, NBEAL2, NSMCE3, ORAI1, P2RX1, P2RY1, P2RY12, PLAT, PLAU, PLG, PMM2, PRF1, PRKACG, PROC, PROCR, PROS1, RAB27A, RASGRP2, RBM8A, RGS2,*

RUNX1, SERPINA10, SERPINC1, SERPIND1, SERPINE1, SERPINF2, SLC35A2, SLC46A1, SLFN14, SMAD2, SMAD4, SRC, SRD5A3, STIM1, STX11, STXBP2, TBXA2R, TBXAS1, TFPI, TFR2, THBD, THPO, TMEM165, TPM4, TUBB1, UNC13D, VIPAS39, VKORC1, VPS33B, VWF, WAS.

Статистическая обработка результатов

Результаты обследования пациентов были собраны и систематизированы в базу данных с использованием программы Microsoft Excel 2013, Microsoft, США. Категориальные переменные были представлены в виде частот (процентов). Для характеристики непрерывных переменных использовались параметры медианы, минимума и максимума. Сравнение независимых выборок порядковых и непрерывных данных проводилось с помощью U-критерия Манна-Уитни. Для анализа линейной зависимости использован метод линейной регрессии. Для корреляционного анализа был рассчитан коэффициент корреляции Пирсона. Данные на графиках представлены в виде точечных диаграмм с линиями регрессии и прямоугольных диаграмм с перекрытием отдельных точек данных. Статистический анализ проведен с использованием программы OriginPro 2016, США.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нарушения количества и морфологии тромбоцитов у пациентов

Оценивалась связь между нарушениями количественных, морфологических и фенотипических характеристик тромбоцитов пациентов и тяжестью кровоточивости. Усиление тяжести геморрагического синдрома умеренно коррелировало с уменьшением количества тромбоцитов только в группе нормоклеточных тромбоцитопений ($-0,4, p = 0,046$) и такая связь отсутствовала в остальных группах пациентов ($p > 0,05$), что косвенно подтверждает значимую роль дисфункции в развитии симптомов кровоточивости в данных группах пациентов. Корреляционная связь между уменьшением количества тромбоцитов и увеличением их размера не наблюдалась только в КГ ($-0,07$) и группе пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича ($-0,12$). Во всех остальных группах пациентов, в покое и после активации, наблюдалась корреляция от умеренной до высокой силы связи (от $-0,39$ до $-0,72, p < 0,05$). Неоднородность морфологических и количественных характеристик тромбоцитов связывают с особенностями их созревания и возрастом. Описано два варианта продукции тромбоцитов. Первый - это нормальный тромбоцитопоз (Junt, 2007). Второй вариант продукции реализуется в ответ на острое истощение тромбоцитов или воспалительные стимулы (Nishimura, 2015). При этом происходит острый разрыв мегакариоцитов (МК) с фрагментацией на тромбоциты. Интересно, что ретикулярные тромбоциты, образованные этим способом, имели тенденцию быть больше по размеру, что могло бы объяснить наблюдаемую нами морфологическую гетерогенность тромбоцитов (Nishimura, 2015).

Другим возможным признаком нарушения созревания тромбоцитов у обследованных нами пациентов является нарушение корреляционной связи между размером и гранулярностью (по FSC-SSC), наблюдавшееся у части пациентов во всех группах, за исключением СВО, в разных пропорциях (Таблица 2). Так, корреляция была ослаблена в группах нормоклеточных НЗТ, нормотромбоцитопений, с повышенным количеством тромбоцитов и неутонченным геморрагическим синдромом; корреляционная связь была выше, чем в КГ только при макротромбоцитопениях.

Таблица 2 – Сила корреляционных связей размера и гранулярности тромбоцитов в группах

–	КГ	Нормоклет. НЗТ	Тромбоцитопении			Тромбо- цитозы	ГСН
			Нормо	Микро	Макро		
Корр. Пирсона	0,85, $p < 0,001$	0,73, $p < 0,001$	0,61, $p = 0,001$	0,88, $p < 0,001$	0,93, $p < 0,001$	0,43, $p = 0,005$	0,68 $p < 0,001$

Параметр FSC отражает размер тромбоцитов. Увеличение размера тромбоцитов сопровождается увеличением количества всех рецепторов и объёма / количества гранул; уменьшение размера – напротив, уменьшением всех значений. При активации размер тромбоцитов уменьшается, что обусловлено сокращением актомиозинового комплекса и демонстрирует способность тромбоцитов к ретракции. Параметр SSC отражает гранулярность тромбоцитов, которая формируется тремя видами гранул: плотными, α -гранулами и лизосомами, а также другими структурами (открытой и плотной канальцевыми системами, митохондриями и т.п.) влияющими на общую гранулярность. В норме при активации тромбоцитов происходит высвобождение гранул тромбоцитов, что приводит к снижению их гранулярности. Нарушения гранулярности указывают на функциональные и структурные аномалии тромбоцитов.

Об аномалиях внутриклеточных органелл, возникающих вследствие нарушений мегакариопоэза ранее сообщалось для ряда тромбоцитопатий, например, при синдроме белых тромбоцитов - тромбоциты увеличены, в клетках обнаруживались комплексы Гольджи, вакуоли, избыточно развитые канальцевые сети и центриоли (White, 2004); при синдроме серых тромбоцитов размер часто увеличен, отсутствуют α -гранулы, большое количество митохондрий, обилие вакуолей и элементов открытой канальцевой системы, мембранные комплексы в центре связанные с плотной канальцевой системой, остаточные фрагменты комплекса Гольджи и микротрубочек (Nurden et al., 2007); при ANKRD26-связанной тромбоцитопении размер тромбоцитов нормальный, но сообщалось об уменьшении α -гранул и увеличении канальцевой сети (Botero et al., 2016). Модель мутации *MYH9* на мышах (Léon, 2007) показала гетерогенность формы тромбоцитов от нормальной дискоидной до овоидной морфологии. Тромбоциты содержали большое количество грубого эндоплазматического ретикулума, типичного для молодых незрелых клеток (15,3% тромбоцитов при *MYH9* против 0,5% тромбоцитов в контроле). В данной работе время полужизни тромбоцитов *in vivo* в контроле и при *MYH9* не различалось, что позволило предположить, что тромбоцитопения не являлась результатом ускоренного выведения тромбоцитов из кровотока и, что увеличенная доля ретикулярных клеток в основном отражает дефект в образовании зрелых тромбоцитов.

Интегральная оценка морфологических характеристик тромбоцитов проводилась с использованием индекса FSC/SSC. В КГ в покое значение индекса FSC/SSC было $\geq 1,1$, что позволило установить пороговое значение $< 1,1$ для выявления нарушений внутриклеточной архитектуры тромбоцитов у части пациентов во всех группах, а группа пациентов с диагнозом ГСН была разделена на подгруппы для дальнейшего изучения (Рисунок 1, Таблица 3).

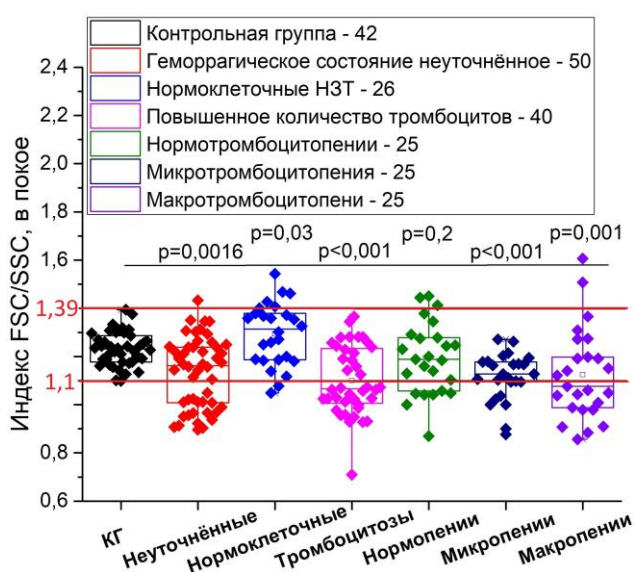


Рисунок 1 – Индекс FSC/SSC в состоянии покоя в исследуемых группах. Панель демонстрирует достоверные морфологические различия между КГ и группами пациентов.

Таблица 3 – Клинико-лабораторные характеристики подгрупп пациентов (представлена медиана, min и max значения)

Группы	Подгруппы	PBQ ² , баллы	PLT ³ , x10 ⁹ /л	Индекс FSC/SSC, в покое
Контрольная группа (n ¹ =42)		0	226 (164–376)	1,2 (1,1–1,4)
Нормоклеточные НЗТ (n=26)	Тромбастения Гланцмана (n=20)	8 (4–19)	296 (134–467)	1,3 (1,05–1,47)
	Синдром Германского-Пудлака (n=6)	3 (0–9)	160 (131–334)	1,3 (1,18–1,54)
Нормотромбоцитопении (n=25)	ANKRD26-связанная тромбоцитопения (n=8)	4 (0–5)	49 (24–141)	1,24 (1,04–1,45)
	RUNX1-связанная тромбоцитопения (n=14)	2 (0–7)	105 (30–141)	1,17 (0,87–1,44)
	ETV6-связанная тромбоцитопения (n=2)	2; 3	69; 84	1,13–1,25
	CYCS-связанная тромбоцитопения (n=1)	1	162	1,23
Микротромбоцитопения (n=25)	Синдром Вискотга-Олдрича (n=25)	3 (0–6)	58 (12–122)	1,13 (0,88–1,27)
Макротромбоцитопении (n=25)	MYH9-связанная тромбоцитопения (n=15)	2 (0–3)	49 (6–140)	1,04 (0,86–1,2)
	Синдром Бернара-Сулье (n=6)	2,5 (0–13)	56 (26–98)	1,32 (0,91–1,61)
	TUBB1-связанная тромбоцитопения (n=3)	2 (1–3)	103 (93–153)	1,27 (1,19–1,31)
	SLFN14-связанная тромбоцитопения (n=1)	16	42	0,91
Повышенное количество тромбоцитов (n=40)	Эссенциальная тромбоцитемия (n=27)	0 (0–2)	1184 (603–2744)	1,07 (0,93–1,37)
	Истинная полицитемия (n=13)	0 (0–1)	866 (591–1455)	1,06 (0,71–1,28)
Геморрагич. состояние неуточнённое (n=50)	FSC/SSC < 1,1 (n=19)	3 (2–5)	239 (140–377)	0,97 (0,9–1,05)
	FSC/SSC ≥ 1,1 (n=31)	4 (2–6)	258 (166–385)	1,22 (1,1–1,43)

n¹ – количество обследуемых; PBQ² – педиатрический опросник кровоточивости; PLT³ – количество тромбоцитов.

Известно, что для консолидации тромба в просвете сосуда активированные тромбоциты осуществляют ретракцию, что проявляется в уменьшении их размера (Aslan, 2017). Для интегральной оценки эффективности перестройки цитоскелета тромбоцитов и способности тромбоцитов к ретракции, был использован индекс FSC в покое / после активации, который позволил косвенно оценить эффективность работы механизмов ретракции. Было определено пороговое значение равное 1,19, показавшее нарушение индекса FSC у 16 (8%) пациентов из разных групп, что указывает на возможное нарушение способности клеток к ретракции (Рисунок 2 А). Известно, что при активации тромбоцитов происходит снижение общей гранулярности за счёт высвобождения гранул и реорганизации канальцевых систем (Flaumenhaft, 2017). Для интегральной оценки изменения гранулярности был использован индекс SSC в покое / после активации, который позволил косвенно оценить эффективность работы механизмов

дегрануляции и сопутствующих морфологических изменений. Было определено пороговое значение равное 1,04, показавшее нарушения индекс SSC у 57 (30%) пациентов из разных групп, у которых индекс SSC не уменьшался или даже увеличивался при активации (Рисунок 2 Б). При этом у этих пациентов происходило ожидаемое уменьшение размера по FSC. Наиболее выраженные нарушения индексов размера и гранулярности наблюдались у пациентов с микро- и нормотромбоцитопениями.

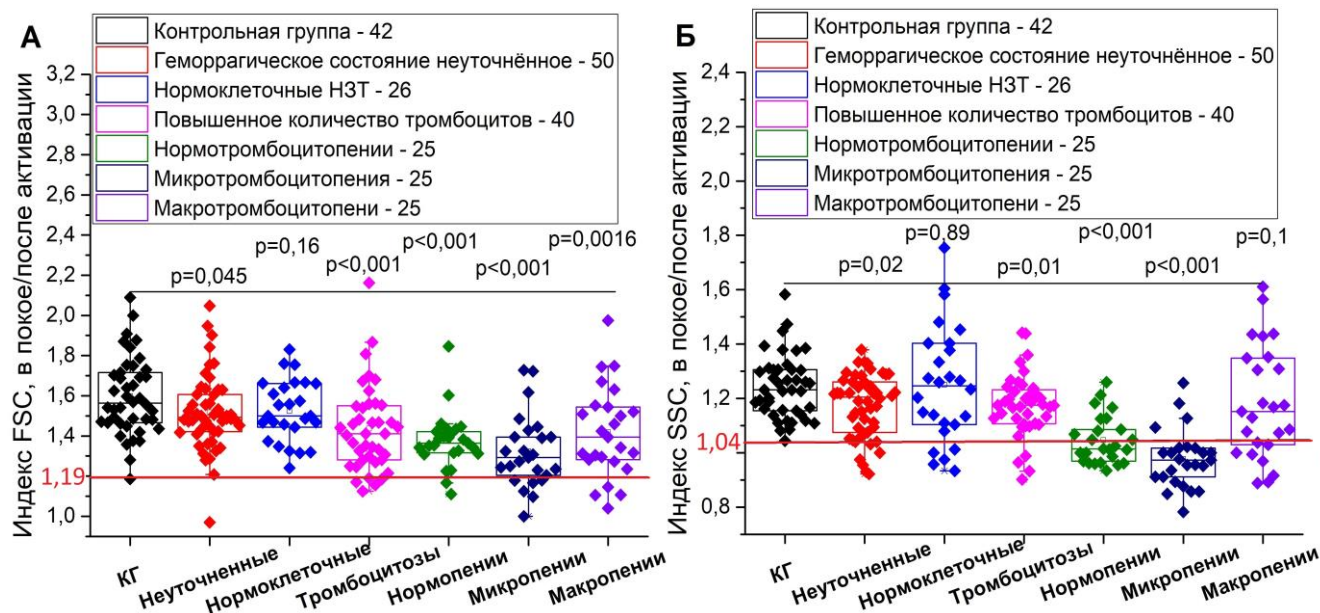


Рисунок 2 – Индексы активации FSC и SSC. Ослабление способности тромбоцитов к уменьшению размера (панель А) и гранулярности (панель Б), при активации, у части пациентов во всех группах указывает на их структурные и функциональные нарушения.

Связь между размером и функциональной активностью тромбоцитов

Известно, что в норме крупные тромбоциты характеризуются повышенным количеством плотных гранул, повышенной плотностью рецептора фибриногена, усиленным агрегаторным ответом (Karpatkin, 1978; Thompson, 1982) и формируют субпопуляцию ретикулярных тромбоцитов (Cesari, 2008; Guthikonda, 2008), содержащих больше РНК и количественно определяемые счетчиками клеток крови, как фракция незрелых тромбоцитов (Briggs, 2004) с увеличенным средним размером. Ряд клинических работ по анализу крупных форм тромбоцитов (Chaoui, 2005; Richards, 1996; Richards et al., 1995), в частности при иммунной тромбоцитопении и тромбоцитарной тромбоцитопенической пурпуре (Abe, 2006; Harrison et al., 2008; Kickler, 2006), показали, что в условиях тромбоцитопении, увеличение содержания РНК тромбоцитов напрямую коррелирует с активностью мегакариоцитопоэза. У детей с иммунной тромбоцитопенией и очень низким количеством тромбоцитов более высокое содержание крупных тромбоцитов было связано со снижением риска тяжелого или опасного для жизни кровотечения (McDonnell, 2018). Определение количества крупных форм тромбоцитов дает возможность определить вызвана ли тромбоцитопения недостаточностью костного мозга или повышенной периферической деструкцией / потреблением. Прогнозируется, что количество крупных тромбоцитов будет повышаться при заболеваниях, сопровождающихся повышенной деструкцией или потреблением тромбоцитов. В норме доля увеличенных тромбоцитов составляет примерно до 4,5% от общего количества тромбоцитов (Harrison et al., 2008). Увеличенный размер тромбоцитов был связан с большей вероятностью множества состояний и событий, среди которых были инфаркт миокарда (Klovaite, 2011), венозные тромбоэмболии (Braekkan et al., 2010), смертности у пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии (Zampieri, 2014) и др. Остается спорным, указывает ли эта связь на причинный эффект увеличения размера, то есть повышение реактивности тромбоцитов, или является следствием,

связанным с другими воспалительными или сосудистыми событиями (Jobe, 2017). По литературным данным, не было выявлено связи между размером тромбоцитов и возрастом тромбоцитов во время нормального кроветворения (Thompson et al., 2021), что косвенно подтверждается отсутствием корреляции между количеством и размером клеток в КГ (-0,07, $p = 0,64$). Это контрастирует с ситуацией, наблюдаемой у пациентов с иммунной тромбоцитопенией и, соответственно, повышенной компенсаторной продукцией тромбоцитов (Nishimura, 2015).

Полученные с использованием исследования ФАТ результаты впервые убедительно продемонстрировали связь между уменьшением количества и увеличением размера тромбоцитов во всех изученных группах, кроме группы микротромбоцитопении (пациенты с синдромом Вискотта-Олдрича). Это подтверждает озвученное в литературе предположение о том, что увеличение размера тромбоцитов при разных заболеваниях, характеризует этот феномен скорее, как статический маркер риска осложнений (Jobe, 2017), который не обязательно прямо связан с протромботическими или геморрагическими проявлениями.

Группа пациентов с нормоклеточными наследственными заболеваниями тромбоцитов

Группу нормоклеточных НЗТ составили 20 пациентов с тромбастенией Гланцмана (у 10 пациентов генетически подтверждены мутации в генах *ITGA*) и 6 пациентов с синдромом Германского-Пудлака (генетически подтверждены мутации в генах *HPS*). Тяжесть геморрагического синдрома не коррелировала с количеством тромбоцитов (0,33, $p = 0,1$). Индекс FSC/SSC в покое был $< 1,1$ только у 2 субсов с ТГ, мутацией в гене *ITGA2B*, кровоточивостью в 8 и 10 баллов. А у 6 пациентов (4 с ТГ и 2 с СГП), напротив, индекс FSC/SSC был $\geq 1,4$ (Рисунок 1 А), что отражается в ослаблении корреляционной связи FSC/SSC в сравнении с КГ (0,73, $p < 0,001$). Выявлена умеренная корреляционная связь между уменьшением количества тромбоцитов и увеличением их размера (-0,39, $p = 0,048$) и гранулярности (-0,48, $p = 0,01$), что ранее не описывалось в литературе для этих заболеваний.

Для ТГ патогномичен дефицит GPIIb/IIIa (Bennett, 2017), что наглядно было продемонстрировано и среди обследованных пациентов по дефициту CD61 (Рисунок 3 А-В) и связыванию с антителом PAC1 ($p < 0,001$). ТГ 1 типа была диагностирована 12 пациентам и ТГ 2 типа 8 пациентам, характеризующихся дефицитом GPIIb/IIIa менее 5% и менее 20%, соответственно. Обратило на себя внимание достоверное снижение CD62p после активации ($p < 0,001$) при сохранном индексе дегрануляции α -гранул ($p = 0,24$), что указывает на относительно меньшее количество α -гранул при ТГ.

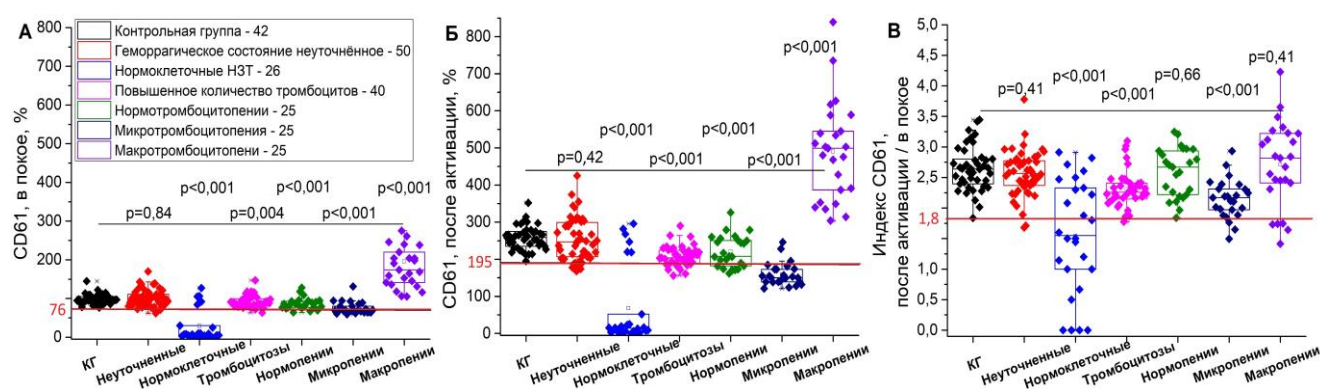


Рисунок 3 – Рецептор CD61. CD61 в покое и после активации достоверно не отличался от КГ у пациентов с ГСН, но был снижен у пациентов с нормоклеточными НЗТ (за счёт пациентов с ТГ), в группе с повышенным количеством тромбоцитов, нормотромбоцитопениями, микротромбоцитопенией и был повышена у пациентов с макротромбоцитопениями (А и Б). Экспонирование CD61 при активации не отличалось от КГ в группах с ГСН, нормотромбоцитопениями и макротромбоцитопениями; было снижено в группах пациентов с нормоклеточными НЗТ (за счёт пациентов с ТГ), повышенным количеством тромбоцитов и микротромбоцитопенией (В).

Был проведён ROC-анализ на 42 здоровых добровольцах и 76 пациентах с нормоклеточными НЗТ и ГСН, показавший специфичность и чувствительность равную 100% для анализа CD61 в покое и после активации для диагностики ТГ. Индекс CD61 отражающий эффективность выставления ГП Пв/Па на поверхность мембраны показал меньшие значения специфичности (81%) и чувствительности (90%) (Таблица 4).

Таблица 4 – Результаты ROC-анализа плотности рецептора CD61 у пациентов с тромбастенией Гланцмана

Показатель	Cut-off	Sp (%)	Se (%)	AUC (95%-й, ДИ)
CD61, в покое	46	100	100	1 (-)
CD61, акт.	110	100	100	1 (-)
Индекс CD61	2,32	81	90	0,93 (0,88-0,98)

Синдром Германского-Пудлака. При СГП тромбоциты характеризуются отсутствием плотных гранул (Huizing et al., 2021). У пациентов СГП, параметры флуоресценции загруженного мепакрина плотных гранул были достоверно снижены ($p < 0,001$) (Рисунок 4 А - В).

Был проведён ROC-анализ на 42 здоровых добровольцах и 76 пациентах с нормоклеточными НЗТ и ГСН, показавший специфичность 99,1% и чувствительность 100% для анализа флуоресценции мепакрина плотных гранул в покое и индекса дегрануляции плотных гранул для диагностики СГП. Мепакрин после активации показал удовлетворительные значения чувствительности (74,1%) и специфичности (100%) (Таблица 5).

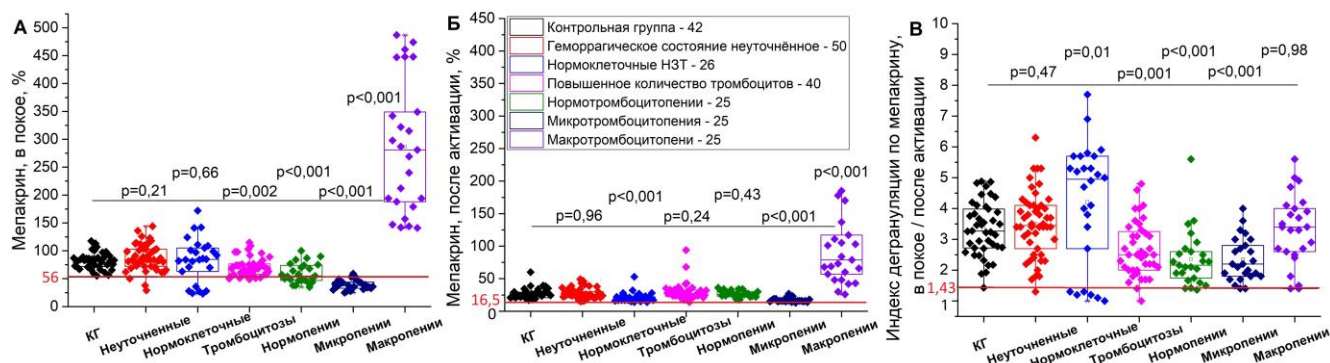


Рисунок 4 – Флуоресценция загруженного мепакрина плотных гранул. Мепакрин в покое достоверно не отличался от КГ у пациентов с ГСН и нормоклеточными НЗТ (за счёт пациентов с тромбастенией Гланцмана), был снижен в группах с повышенным количеством тромбоцитов, нормо- и микро-тромбоцитопениями и был повышен у пациентов с макро-тромбоцитопениями (панель А). Мепакрин при активации не отличался от КГ в группах с ГСН, тромбоцитозами и нормотромбоцитопениями; был снижен в группах с нормоклеточными НЗТ, микро-тромбоцитопенией и повышен в группе макро-тромбоцитопений (панель Б). Индекс дегрануляции по мепакрину достоверно не отличался от КГ у пациентов с ГСН и макро-тромбоцитопениями, был снижен в группах с тромбоцитозом, нормотромбоцитопениями, микро-тромбоцитопенией и был повышен у пациентов с нормоклеточными НЗТ (за счёт пациентов с ТГ) (панель В).

Таблица 5 – Результаты ROC-анализа флуоресценции мепакрина плотных гранул у пациентов с синдромом Германского-Пудлака

Показатель	Cut-off	Sp (%)	Se (%)	AUC (95%-й, ДИ)
Мепакрин, в покое	37	99,1	100	0,998 (0,99-1,01)
Мепакрин, акт.	19,7	74,1	100	0,5 (0,19-0,82)
Индекс дегрануляции	1,36	99,1	100	0,998 (0,98-1,01)

Так же у пациентов было обнаружено достоверное повышение CD62p после активации, что указывает на относительное увеличение количества α -гранул ($p = 0,007$). Была ослаблена способность генерировать прокоагулянтные тромбоциты ($p = 0,03$), что может быть связано с отсутствием аутокринной активации тромбоцитов АДФ, АТФ и серотонином при СГП (Huizing et al., 2021). Выявленные нарушения потенциально могут вносить вклад в развитие клинической картины геморрагического синдрома при данных заболеваниях и, насколько нам известно, ранее не описывались в литературе.

Нормоклеточные тромбоцитопении

Группа наследственных тромбоцитопений с нормальным размером тромбоцитов включает более 10 заболеваний (Noris et al., 2017), которые характеризуются нарушениями мегакариоцитопоэза, созревания, структуры и функции тромбоцитов. Тромбоцитопении, обусловленные мутациями *RUNX1*, *ANKRD26* и *ETV6* характеризуются повышенным риском развития миелоидных новообразований (Galera, 2019). Группу нормотромбоцитопений составили 25 пациентов с *RUNX1*-связанной тромбоцитопенией (56%), *ANKRD26*-связанной тромбоцитопенией (32%), *ETV6*-ассоциированной тромбоцитопенией (8%) и *CYCS*-связанной тромбоцитопенией (4%) (Таблица 3).

RUNX1-связанная тромбоцитопения так же называется семейным заболеванием тромбоцитов со склонностью к острому миелоидному лейкозу. Описаны функциональные и структурные нарушения тромбоцитов при мутациях *RUNX1*. Мутация сопровождается снижением экспрессии рецептора тромбопоэтина (ТНРО), нарушением дифференцировки, созревания МК и образования протромбоцитов. Сообщалось о серьезном снижении агрегации тромбоцитов, дефекте активации ГП IIb/IIIa и комбинированном дефиците пула хранения α - и плотных гранул. Однако, в то время как количество плотных гранул было заметно уменьшено, содержание α -гранул было неоднородным (Badin, 2017; Latger-Cannard, 2016). Сообщалось о тенденции к ослаблению распластывания тромбоцитов и нарушении фосфорилирования интегрин β_3 (ГП IIIa, CD61), что отражает изменение передачи сигналов снаружи-внутри при связывании ГП IIb/IIIa с фибриногеном (Glembotsky, 2014). Показано, что *RUNX1* положительно регулирует *TREML1* и *ITGA2*, и эта регуляция отменяется после удаления сайтов *RUNX1*. Подавляемые гены «включали» TREM-подобный транскрипт (TLT-1 - мембранный рецептор α -гранул тромбоцитов, способный усиливать активацию тромбоцитов) и субъединицу интегрин α_2 (ITGA2) рецептора коллагена $\alpha_2\beta_1$, которые участвуют в агрегации тромбоцитов и адгезии к коллагену, соответственно (Glembotsky et al., 2019).

Роль гена *ANKRD26* в мегакариоцитопоэзе плохо определена. В норме связывание *RUNX1* и *FLII* ингибирует функцию *ANKRD26* во время последних фаз нормального мегакариоцитопоэза. Мутация *ANKRD26* приводит к потере сайленсинга, индуцированного *RUNX1* и *FLII* во время созревания МК и вызывает стойкую передачу сигналов пути ТНРО / MPL, что приводит к дисмегакариоцитопоэзу и нарушению образования протромбоцитов (Galera, 2019). Сообщалось о функциональных и структурных нарушениях тромбоцитов у пациентов с *ANKRD26*-связанной тромбоцитопенией, таких как нарушение активации тромбоцитов тромбином (Boutroux, 2015; Rabbolini, 2020), ослабление агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой и адреналином, пограничное снижение количества плотных гранул; у некоторых пациентов наблюдалось снижение количества α -гранул и увеличение количества вакуолей и канальцевых сетей, снижение поверхностной экспрессии ГП Ib (Botero et al., 2016; Noris, 2011; Rabbolini, 2020).

При тромбоцитопении, связанной с поломкой гена *ETV6*, наблюдается нарушение созревания МК и дефект образования протромбоцитов *in vitro* (Galera, 2019). *ETV6* действует как супрессор транскрипции, он ингибирует активность ряда факторов транскрипции, важных для развития МК, такого, например, как *FLII* (Kwiatkowski, 2000). При мутации гена *ETV6* сообщалось о нарушении агрегации с низкими концентрациями АДФ, ристоцетина и коллагена; проточная цитометрия тромбоцитов не выявляла каких-либо устойчивых дефектов основных гликопротеинов на поверхности клеток; исследования активации тромбоцитов не выявили каких-

либо конкретных дефектов; однако способность к адгезии и распластыванию на фибриногеновой подложке была ослаблена (Melazzini, 2016).

Из выше сказанного следует, что при нормальном тромбоцитопоэзе гены *RUNX1*, *ANKRD26* и *ETV6* работают согласованно, а мутации в любом из них реализуются в сходных по характеру нарушениях. На этом основании 25 пациентов с нормотромбоцитопениями были объединены в общую группу. Были выявлены общие признаки нарушений согласующиеся с литературными данными (Botero et al., 2016; Léon, 2007; Nurden et al., 2007; White, 2004). После активации, тромбоциты пациентов не показали должного уменьшения размера и гранулярности (Рисунок 2 А и Б), характерных для КГ, в сочетании с ослаблением отщепления CD42b ($p = 0,0017$) (Рисунок 9 Б и В), что согласуется с сообщениями о нарушениях строения цитоскелета, агрегации и распластывания тромбоцитов у пациентов с мутациями *RUNX1*, *ANKRD26* и *ETV6* (Badin, 2017; Botero et al., 2016; Glembotsky, 2014; Glembotsky et al., 2019; Latger-Cannard, 2016; Melazzini, 2016; Noris, 2011; Rabbolini, 2020). Наблюдавшаяся повышенная гранулярность после активации ($p < 0,001$) может быть обусловлена увеличением количества вакуолей и канальцев, что требует подтверждения методом ТЭМТ. Флуоресценция мепакрина плотных гранул в покое и индекс дегрануляции были снижены ($p < 0,001$, Рисунок 4 А и В). CD62p был повышен в покое и снижен после активации, дегрануляция ослаблена ($p = 0,005$) и достоверно связана с тяжесть геморрагического синдрома ($p = 0,01$). Полученные результаты согласуются с описанными ранее нарушениями пула хранения у пациентов с мутациями генов *RUNX1* и *ANKRD26* (Badin, 2017; Botero et al., 2016; Latger-Cannard, 2016; Noris, 2011; Rabbolini, 2020). Насколько нам известно, ранее в литературе не сообщалось о снижении доли фосфатидилсерин-положительных (ФС+) тромбоцитов после активации, то есть ослаблении способности генерировать прокоагулянтные формы при нормотромбоцитопениях ($p < 0,001$). Усиление тяжести геморрагического синдрома у пациентов коррелировало с уменьшением количества тромбоцитов ($-0,4$, $p = 0,046$) и у 9 (36%) пациентов с долей ФС+ тромбоцитов ниже cut-off 5% (Рисунок 5 Б, $-0,7$, $p = 0,03$). Выявленные при активации нарушения могут вносить вклад в развитие геморрагических симптомов, что наглядно продемонстрировано с помощью применения разработанных функциональных индексов. Кроме того, наблюдавшиеся лабораторные изменения достаточно четко укладываются в общее представление о крупных нарушениях, затрагивающих процессы внутриклеточной сигнализации у пациентов с мутациями *RUNX1*, *ANKRD26* и *ETV6*.

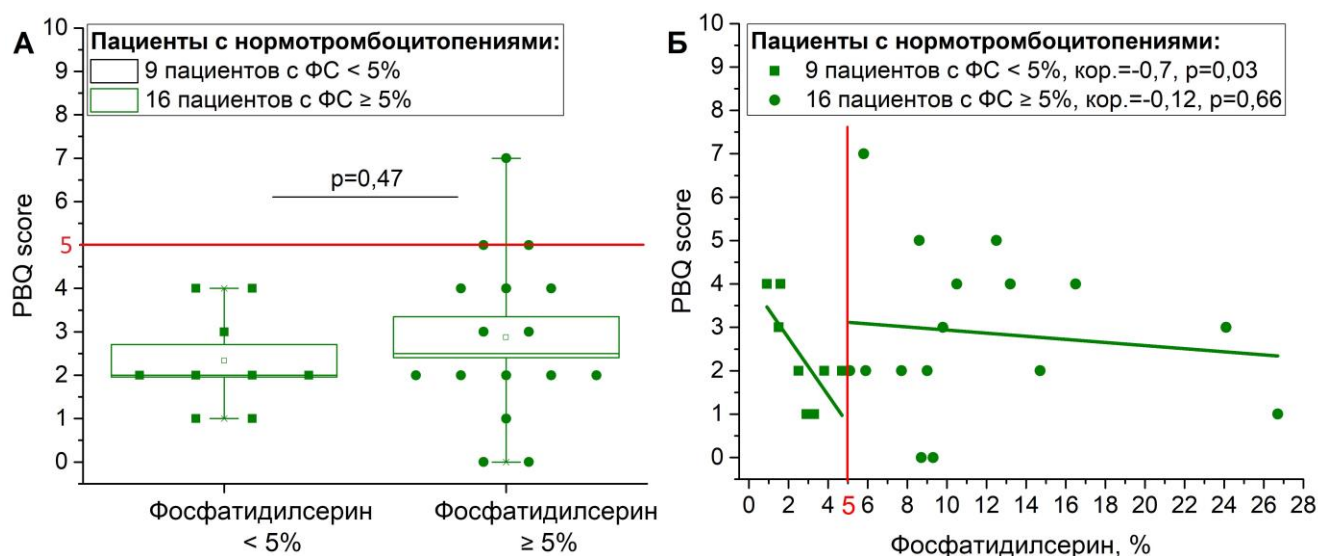


Рисунок 5 – Тяжесть геморрагического синдрома у пациентов с нормотромбоцитопениями в зависимости от доли прокоагулянтных тромбоцитов. Пациенты с долей ФС+ тромбоцитов < 5 и > 5 % не различались достоверно по количеству баллов PBQ (панель А), но у пациентов с снижением доли ФС+ тромбоцитов < 5 % наблюдалась сильная корреляционная связь с усилением кровоточивости (панель Б).

Микротромбоцитопения (синдром Вискотта-Олдрича)

СВО развивается по причине мутации в гене *WAS*, кодирующем белок синдрома Вискотта-Олдрича (*WASp*), который специфически экспрессируется в гемопоэтических клетках и участвует в полимеризации актина. Пациенты с СВО имеют низкое количество тромбоцитов с уменьшенным размером (Moulding, 2013). Эпизоды кровотечений случаются у большинства пациентов и могут привести к смерти у 4–10% этих пациентов (Imai, 2004; Sullivan, 1994), патогенез дефектов тромбоцитов плохо изучен (Sereni, 2018). Уменьшенный размер тромбоцитов затрудняет интерпретацию характера нарушений их фенотипа и функции. Ранее сообщалось о серьезных изменениях ультраструктуры с уменьшением содержания плотных гранул, увеличением количества вакуолей и увеличением ОКС. Эти особенности были расценены авторами как признаки преактивации тромбоцитов (Sereni, 2019). Описанное нарушение морфологии коррелирует с полученными результатами снижения флуоресценции мепакрина плотных гранул, нарушением их высвобождения (Рисунок 4 В, $p < 0,001$), нарушением способности к ретракции и изменению общей гранулярности при активации (Рисунок 2 А и Б, $p < 0,001$), однако, корреляционная связь размера и гранулярности, в покое и после активации, не отличалась от КГ (0,88, $p < 0,001$ и 0,84, $p < 0,001$). Так же ранее сообщалось, что CD62p и PAC1 были значительно увеличены у пациентов с СВО и авторы пришли к выводу о преактивации тромбоцитов, которая может способствовать их периферическому удалению (Sereni et al., 2018). У обследованных нами пациентов, при сравнении с КГ, в покое, не наблюдалось достоверных различий по CD62p и PAC1, но тромбоциты при СВО были меньше по размеру, чем в КГ, что предполагает и меньшее количество рецепторов на мембране и согласуется с предположением о внутрисосудистой преактивации (ВАТ). Индекс отщепления CD42b был ниже cut-off 1,2 у 16 (64%) пациентов (Рисунок 9 В, $p < 0,001$), индекс активации PAC1 был меньше значения cut-off 11 у 17 (68%) пациентов, а индекс дегрануляции α -гранул так же принимал значения ниже cut-off 11,2 у 11 (44%) пациентов, что указывает на нарушение механизмов перестройки цитоскелета, активации ГП Пб/Ша и высвобождения α -гранул, соответственно. Ранее сообщалось о повышении доли FC+ тромбоцитов у пациентов с СВО в покое (Shcherbina, 1999), а в недавнем исследовании (Obydenyi et al., 2020) тромбоцитов при СВО было показано легкое экспонирование FC посредством митохондриально-зависимого некротического механизма, связанного с меньшим размером тромбоцитов и меньшим количеством митохондрий, что может способствовать развитию тромбоцитопении за счёт ускорения клиренса клеток. У обследованных нами пациентов доля FC+ тромбоцитов в покое достоверно не отличалась от КГ ($p = 0,11$). Наблюдаемые расхождения с литературными данными могут объясняться высокой генетической гетерогенностью СВО (Stenson, 2020). Не было выявлено прямой связи между тяжестью геморрагических проявлений и отдельными показателями в подгруппах пациентов: количеством тромбоцитов ($p = 0,69$), нарушениями морфологии по индексу FSC/SSC ($p = 1$), индексу SSC ($p = 0,7$), нарушениями пула хранения плотных ($p = 0,8$) и α -гранул ($p = 0,85$), но у 10 (40%) пациентов снижение FC+ < 5% коррелировало с увеличением тяжести кровоточивости (Рисунок 6 Б, -0,65, $p = 0,04$).

Таким образом, среди пациентов с СВО, было выявлено уменьшение размера тромбоцитов с сопутствующим уменьшением маркеров функции. При этом выявлено относительное повышение CD62p и PAC1 в покое. После активации у пациентов не происходило должного уменьшения общей гранулярности, было ослаблено высвобождения плотных и α -гранул. Были снижены: индекс отщепления CD42b, индекс активации PAC1 (т.е. ослаблена активация ГП Пб/Ша) и доля FC+ тромбоцитов, что указывает на нарушение механизмов перестройки цитоскелета, активации ГП Пб/Ша и снижение способности генерировать прокоагулянтные тромбоциты.

Макротромбоцитопения

Группу макротромбоцитопений составили 25 пациентов с диагнозами: MYH9-связанной тромбоцитопенией (60%), Синдромом Бернара-Сулье (24%), TUBB1-связанной

тромбоцитопенией (12%) и SLFN14-ассоциированной тромбоцитопенией (4%) (Таблица 3). Патогенез этих расстройств гетерогенен, а клинические проявления варьировали от отсутствия

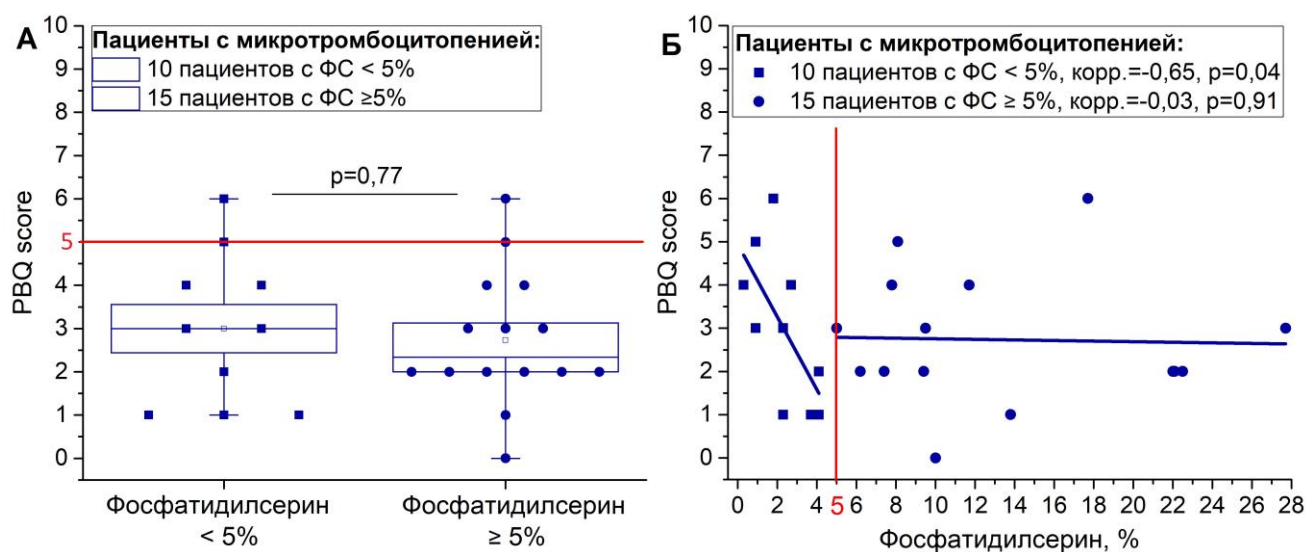


Рисунок 6 – Тяжесть геморрагического синдрома у пациентов с СВО в зависимости от доли прокагулянтных тромбоцитов. Пациенты с долей ФС+ тромбоцитов < 5 и ≥ 5 % не различались достоверно по количеству баллов PBQ (панель А), но у пациентов с долей ФС+ тромбоцитов < 5 % наблюдалась заметная корреляция между уменьшением количества ФС+ тромбоцитов и усилением кровоточивости (панель Б).

симптомов до тяжелых кровотечений. Считается, что при многих макротромбоцитопениях дифференцировка и созревание мегакариоцитов в значительной степени сохранены, а тромбоцитопения возникает из-за изменений в вытягивании и высвобождении протромбоцитов из зрелых мегакариоцитов и / или превращении протромбоцитов в тромбоциты в кровотоке. Большинство этих нарушений вызваны мутациями генов, кодирующих компоненты актомиозинового цитоскелета или системы микротрубочек (Thon, 2012). Для определения количества тромбоцитов при этих заболеваниях часто требуется ручной подсчет тромбоцитов (Lambert et al., 2019), либо использование ПЦ. Увеличенный размер тромбоцитов сопровождается увеличением количества маркеров функции, что затрудняет интерпретацию возможных механизмов нарушений функции при активации и оценку их вклада в развитие геморрагических проявлений. Результаты исследований функции для многих макротромбоцитопений представлены в литературе крайне скудно в виде описания случаев (Jurk et al., 2021) и животных моделей (Léon, 2007).

Пациенты с макротромбоцитопениями так же разделились на подгруппы относительно значения FSC/SSC < 1,1 или ≥ 1,1 (Рисунок 1) и в обеих подгруппах, были пациенты с мутациями генов *MYH9*, *TUBB1* и синдром Бернара-Сулье. Тяжесть геморрагического синдрома не зависела от конкретного диагноза и не коррелировала с количеством тромбоцитов (-0,25, $p = 0,24$). В подгруппе из 13 (52%) пациентов с FSC/SSC < 1,1 суммарное количество плотных гранул было достоверно выше ($p < 0,05$), чем в КГ и подгруппе из 12 (48%) пациентов с FSC/SSC ≥ 1,1, но индекс дегрануляции достоверно не отличался в обеих подгруппах пациентов в сравнении с КГ ($p > 0,05$), что указывает на сохранность механизма высвобождения плотных гранул. Связи между тяжестью кровоточивости и высвобождением плотных гранул не наблюдалось ($p > 0,05$).

Ранее сообщалось о нормальной активации ГП IIb/IIIa, индуцированной тромбином и конвульксином у пациентов с *MYH9*-связанной тромбоцитопенией и Синдром Бернара-Сулье (Jurk et al., 2021), что согласуется с полученными результатами индекса PAC1 не отличавшегося от КГ ($p = 0,37$). CD62p в покое был в большей степени повышен в подгруппе FSC/SSC < 1,1 (Рисунок 7 А, $p < 0,001$), что указывает на возможную ВАТ, по сравнению с подгруппой FSC/SSC ≥ 1,1 (Рисунок 7 А, $p = 0,005$). Но, увеличенный размер клеток, влияющий на плотность CD62p,

затрудняет однозначную, изолированную, интерпретацию этих различий. Ясность вносит сниженный индекс дегрануляции α -гранул в подгруппе FSC/SSC < 1,1 достоверно не отличавшийся от КГ (Рисунок 7 В, $p = 0,07$), что согласуется с тяжестью геморрагического синдрома для пациентов, имевших 3-16 баллов (Рисунок 7 Е, $p = 0,05$) и подтверждает предположение о ВАТ и частичной десенситизации тромбоцитов в подгруппе FSC/SSC < 1,1.

В подгруппе FSC/SSC $\geq 1,1$ индекс дегрануляции α -гранул был достоверно выше, чем в КГ (Рисунок 7 В, $p < 0,001$), что согласуется с тяжестью проявлений геморрагического синдрома для пациентов, имевших 0-2 балла (Рисунок 7 Е, $p < 0,001$). Таким образом, у части пациентов наблюдалась тенденция к усилению геморрагического синдрома при ослаблении высвобождения α -гранул.

Ранее сообщалось о повышении доли прокоагулянтных тромбоцитов в состоянии покоя при МУН9-связанной тромбоцитопении и синдроме Бернара-Сулье (Rand, 2008; Rand, 2010), что подтверждается полученными результатами для группы пациентов с макротромбоцитопениями (Рисунок 8 А и Г, $p < 0,05$). Считается, что повышение FC+ тромбоцитов в покое является маркером ВАТ. Наблюдалось ослабление способности генерировать FC+ тромбоциты после активации в подгруппе FSC/SSC < 1,1 (Рисунок 8 Б, $p = 0,006$) и в подгруппе, имевшей 3-16 баллов по PBQ (Рисунок 8 Д, $p = 0,02$). Индекс изменения прокоагулянтной активности был снижен во всех подгруппах пациентов (Рисунок 8 В и Е, $p < 0,05$), что указывает на потенциальную роль ослабления прокоагулянтной активности, у части пациентов, в развитии геморрагического синдрома.

МУН9-связанная тромбоцитопения. На мышиных моделях МУН9 было показано нарушение агрегации (при низких концентрациях агонистов) и расплывания тромбоцитов, что может объяснять кровоточивость независимо от тяжести тромбоцитопении (Léon, 2007). У пациентов с макротромбоцитопениями наблюдалось ослабление изменения формы тромбоцитов по индексу FSC в покое / после активации (Рисунок 2 А, $p = 0,0016$), что подтверждает описанные в литературе функциональные аномалии перестройки цитоскелета.

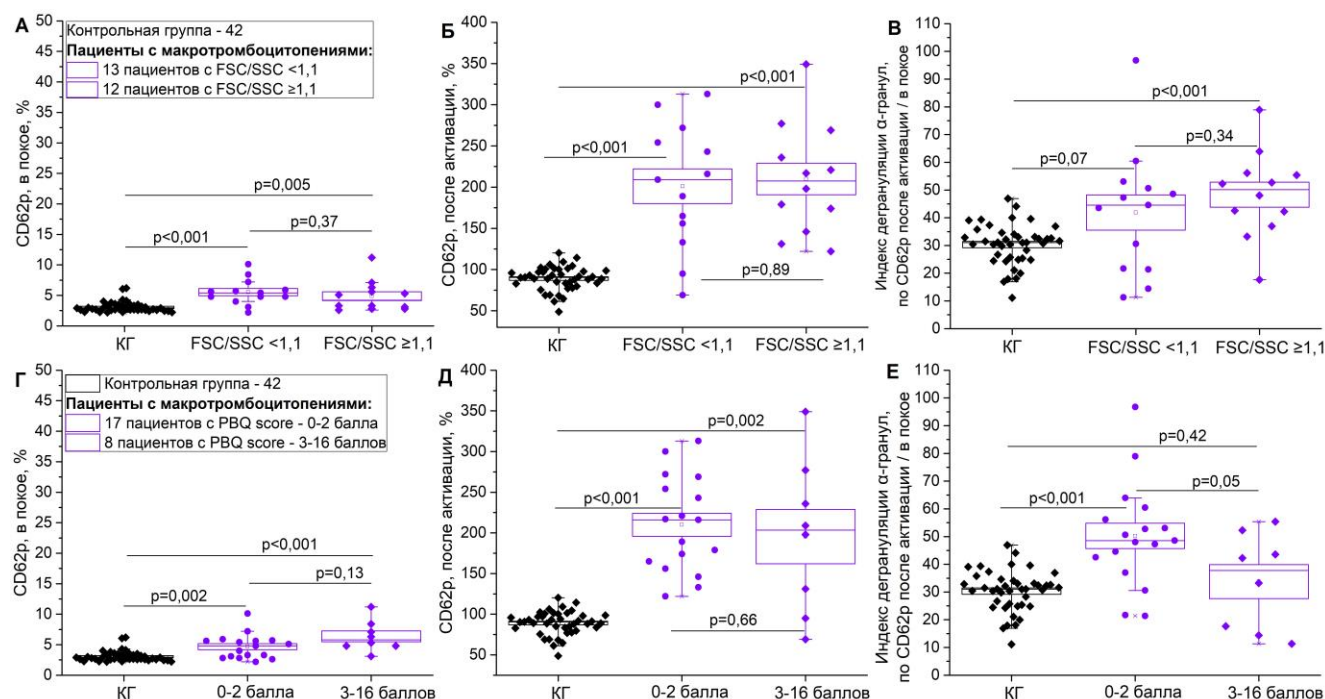


Рисунок 7 – Рецептор CD62p тромбоцитов в подгруппах пациентов с макротромбоцитопениями. При сравнении с КГ CD62p был достоверно повышен в обеих подгруппах пациентов, различавшихся по индексу FSC/SSC и PBQ, в покое и после активации (панели А, Б и Г, Д). Индекс дегрануляции был достоверно повышен при сравнении с КГ только в подгруппах FSC/SSC $\geq 1,1$ и PBQ 0-2 балла, но при этом подгруппы пациентов достоверно не различались между собой (панели В и Е).

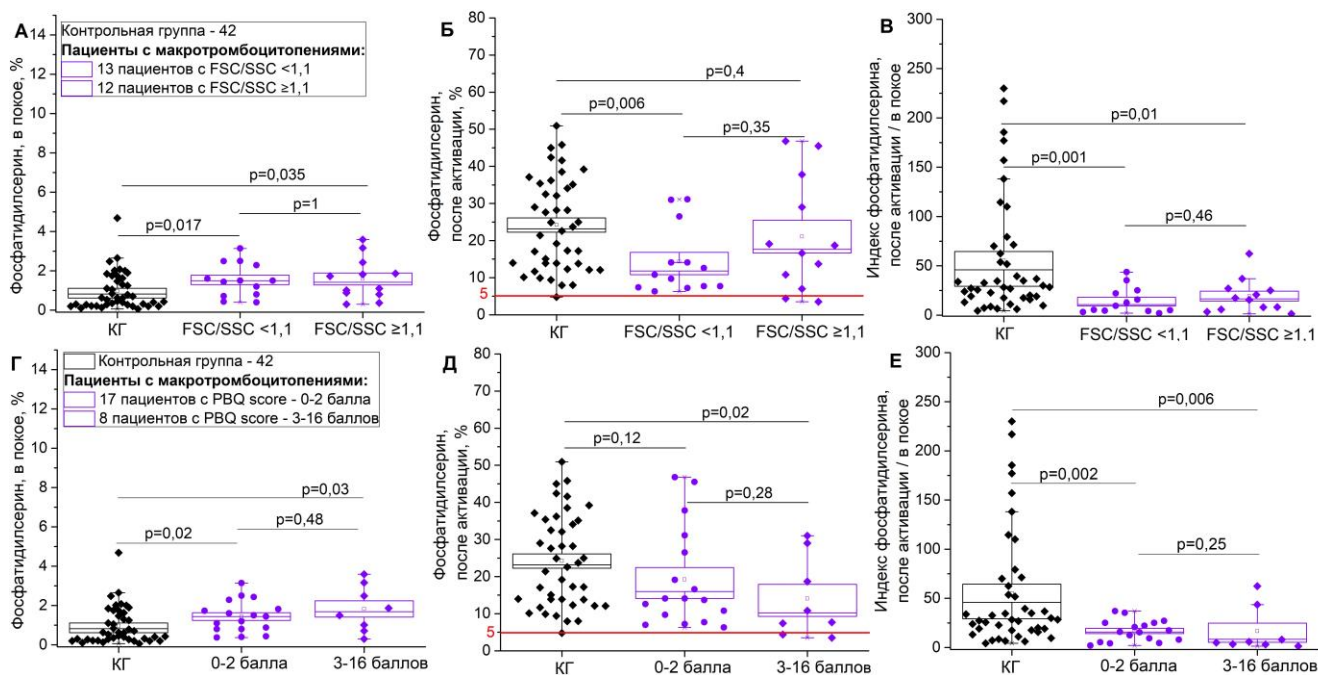


Рисунок 8 – Прокоагулянтная активность тромбоцитов в подгруппах пациентов с макротромбоцитопениями. Панели А и Г демонстрируют повышение доли FC⁺ тромбоцитов во всех подгруппах в покое; панели Б и Д демонстрируют гетерогенность в генерации FC⁺ между подгруппами пациентов в зависимости от FSC/SSC и баллами PBQ; панели В и Е показывают ослабление способности генерировать FC⁺ в ответ на активирующие стимулы.

Для диагностики MYH9-связанной тромбоцитопении был проведён ROC-анализ на 42 здоровых добровольцах и 75 пациентах с тромбоцитопениями, показавший специфичность 99 % и чувствительность 87 % при анализе FSC в покое. FSC после активации и индекс FSC показали меньшие значения специфичности и чувствительности (Таблица 6). Однако диагностическая полезность полученного результата ограничена маленькой выборкой пациентов с макротромбоцитопениями в данном исследовании.

Таблица 6 – Результаты ROC-анализа размера тромбоцитов по FSC у пациентов с MYH9-связанной тромбоцитопенией

Показатель	Cut-off	Sp (%)	Se (%)	AUC (95%-й, ДИ)
FSC, в покое	255	99	87	0,99 (0,97-1,02)
FSC, акт.	222	98	53	0,99 (0,95-1,03)
Индекс FSC	1,57	72	7	0,39 (0,23-0,56)

Синдром Бернара-Сулье. При СБС макротромбоцитопения возникает в результате нарушения взаимодействий GPIb-IX-V с актомиозиновым цитоскелетом, необходимым для сохранения структуры цитоскелета мегакариоцитов и реорганизации цитоскелета. Этот комплекс через цитоплазматический домен связан с элементами цитоскелета, такими как филламин А, адаптерными и сигнальными белками, такими как 14-3-3ζ и кальмодулин. У пациентов с СБС GPIb-IX-V отсутствует или дисфункционален, что считается основным механизмом развития геморрагического синдрома (Ghasemi et al., 2018). У 4 пациентов наблюдался глубокий дефицит CD42b, что соответствует I типу СБС (Рисунок 9), но выраженный геморрагический синдром в 5 и 13 баллов наблюдался только у 2 из них. У 2 пациентов CD42b был снижен умеренно что соответствует III типу СБС (Рисунок 9 Б).

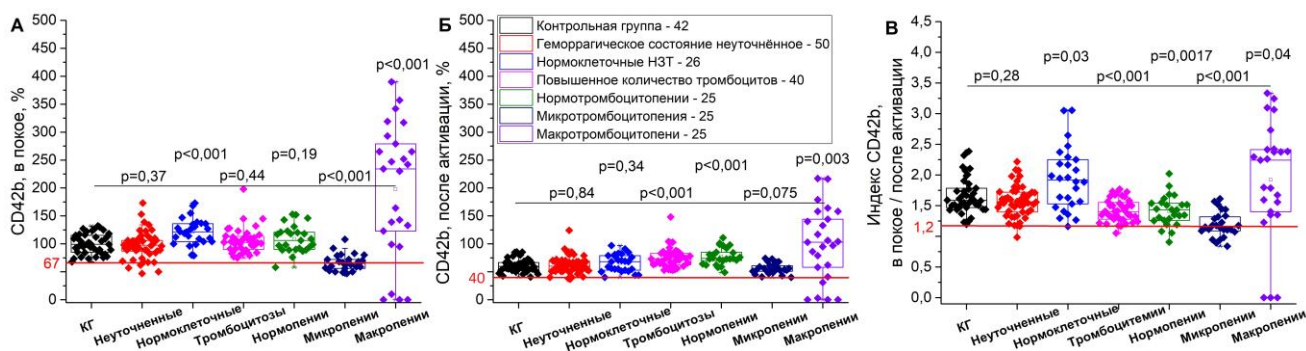


Рисунок 9 – Плотность рецептора CD42b. CD42b в покое (панель А) достоверно не отличался от КГ в группах пациентов с ГСН, повышенным количеством тромбоцитов и нормотромбоцитопениями; был повышен в группах пациентов с нормоклеточными НЗТ и макротромбоцитопениями и снижен в группе с микротромбоцитопенией. CD42b при активации (панель Б) не отличался от КГ в группах с ГСН и нормоклеточными НЗТ, был увеличен в группах пациентов с повышенным количеством тромбоцитов, нормотромбоцитопениями и макротромбоцитопениями, снижен у пациентов, микротромбоцитопенией. Отщепление CD42b при активации (панель В) достоверно не отличалось от КГ в группе пациентов с ГСН, было повышено в группах пациентов с нормоклеточными НЗТ и макротромбоцитопениями и ослаблено в группах с повышенным количеством тромбоцитов, нормотромбоцитопениями и микротромбоцитопенией.

Был проведён ROC-анализ на 42 здоровых добровольцах и 75 пациентах с тромбоцитопениями, показавший специфичность 97,3% и чувствительность 100% при анализе плотности рецептора CD42b после активации для диагностики СБС. CD42b в покое и индекс CD42b показали меньшие значения специфичности и чувствительности (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты ROC-анализа плотности рецептора CD42b у пациентов с синдромом Бернара-Сулье

Показатель	Cut-off	Sp (%)	Se (%)	AUC (95%-й, ДИ)
CD42b, в покое	99	50	100	0,84 (0,7-0,98)
CD42b, акт.	41,9	97,3	100	0,996 (0,98-1,02)
Индекс CD42b	0,42	100	50	0,51 (0,41-0,61)

Таким образом, был выявлен характерный комплекс нарушений, для макротромбоцитопений, сочетающий структурные нарушения FSC/SSC < 1,1, ослабление способности тромбоцитов к ретракции (по индексу FSC), снижение индекса дегрануляции α-гранул, ослабление прокоагулянтной активности и, как следствие, увеличение тяжести геморрагического синдрома. Схожий паттерн дисфункции наблюдался у пациентов с ГСН, в подгруппе FSC/SSC < 1,1.

Повышенное количество тромбоцитов

Тромбоз и кровоточивость являются частью естественного течения ХМПЗ с повышенным количеством тромбоцитов. Ранее сообщалось, что среди 708 взрослых пациентов с ХМПЗ, тромбозы и кровотечения были зарегистрированы у 20,6% и 7,5% пациентов с ИП, 15,1% и 9% пациентов с ЭТ, соответственно (Soyez, 2017). Среди 40 наших пациентов детского возраста ЭТ была диагностирована у 27 и ИП у 13 пациентов (Таблица 3). Клинические проявления наблюдались у 21 (52,5%) пациента. Симптомы микроциркуляторных нарушений (головные боли, головокружения, тошнота, нарушения зрения / выпадение полей зрения, преходящие транзиторные церебральные ишемические атаки, слабость, нарушение походки, быстрая утомляемость; парестезии различной локализации, онемение щек и кончика языка, зуд в области головы и пальцев ног; боли за грудиной и в животе) наблюдались у 14 (35%) пациентов,

кровоточивость (носовые кровотечения, легкое появление экхимозов на конечностях и туловище) - у 4 (10%) пациентов, смешанная симптоматика - у 3 (7,5%) пациентов (Таблица 8). Среди этих пациентов, также наблюдалось разделение на две подгруппы с индексами FSC/SSC менее и более 1,1 (Рисунок 1 А).

Таблица 8 – Клинические проявления у пациентов с повышенным количеством тромбоцитов в зависимости от значения индекса FSC/SSC

Клинические проявления	FSC/SSC < 1,1 (n = 23, 57,5%)	FSC/SSC ≥ 1,1 (n = 17, 42,5%)
Без клинических проявлений	10 (25%)	9 (22,5%)
Микроциркуляторные симптомы	8 (20%)	6 (15%)
Геморрагический синдром	2 (5%)	2 (5%)
Микроциркуляторные + геморрагические проявления	3 (7,5%)	0
ВСЕГО пациентов с симптомами:	13 (32,5%)	8 (20%)

Ранее сообщалось, что у взрослых пациентов с ЭТ уровни CD42b и CD41 (ГП Пб/Ша) в состоянии покоя были достоверно ниже по сравнению со здоровыми добровольцами (Falanga, 2007). Связывание PAC1 (Connor, 2013), CD63 плотных гранул (Karakantza, 2004) и CD62p (Connor, 2013; Falanga, 2007; Karakantza, 2004) были повышены, что является признаком ВАТ. После стимуляции CD41, CD62p (Falanga, 2007) и CD63 (Connor, 2013; Falanga, 2007) были снижены по сравнению с нормальными значениями, что согласуется с предположением о ВАТ и предполагает нарушение функции тромбоцитов. PAC1 после активации достоверно не отличался от здоровых добровольцев (Connor, 2013).

У наших пациентов детского возраста, несмотря на достоверно меньший размер тромбоцитов ($p < 0,001$), плотность CD42b в покое не отличалась от КГ, но было нарушено отщепление CD42b после активации (Рисунок 9 Б и В, $p < 0,001$). Плотность CD61 (ГП Пб/Ша) в покое и после активации, и индекс CD61 были достоверно снижены (Рисунок 3 А, Б и В, $p < 0,001$). PAC1 был повышен в покое, снижен после активации ($p = 0,006$), а индекс активации достоверно не отличался от КГ ($p = 0,78$). Флуоресценция мепакрина в покое и индекс дегрануляции были снижены (Рисунок 4 А и В, $p = 0,002$ и $p = 0,001$). CD62p и фосфатидилсерин достоверно не отличались в покое и после активации ($p > 0,05$) от КГ. Таким образом, не наблюдалось убедительных признаков ВАТ в группе пациентов с тромбоцитозами, что согласуется с менее выраженными клиническими проявлениями у детей, отсутствием тромбозов и выраженной кровоточивости.

Выраженная ВАТ у взрослых пациентов с повышенным количеством тромбоцитов клональной природы, по сравнению с детьми, вероятно, вызвана большим количеством возрастных факторов риска, особенно наличием сердечно-сосудистых заболеваний (Falanga, 2007; Karakantza, 2004; Korivnikar et al., 2013). Таким образом, в этой группе пациентов было выявлено уменьшение размера тромбоцитов и определены две подгруппы, различающиеся по морфологическим индексам FSC/SSC < 1,1 и FSC/SSC ≥ 1,1. В группе наблюдались признаки нарушения активации тромбоцитов: ослаблено отщепление CD42b, снижено выставление CD61 (ГП Пб/Ша), снижен индекс дегрануляции плотных гранул. Описанный комплекс нарушений можно рассматривать в качестве паттерна дисфункции тромбоцитов пациентов детского возраста с первичными тромбоцитозами.

Геморрагическое состояние неуточнённое

На основании проведенного поликлинического обследования 50 пациентам с геморрагическим синдромом не удалось установить точный диагноз. У 19 (38%) пациентов выявлен ряд общих черт изменения ФАТ: 1) повышение общей гранулярности тромбоцитов с индексом FSC/SSC < 1,1, что может являться признаком нарушения созревания тромбоцитов (Рисунок 10 А и Б, $p < 0,001$); 2) повышение CD62p в покое ($p < 0,001$), и его снижение после

активации, как признак возможной внутрисосудистой преактивации тромбоцитов ($p = 0,04$) (Рисунок 11 А и Б); 3) снижение доли прокоагулянтных тромбоцитов после активации (Рисунок 12 Б, $p = 0,036$), что указывает на ослабление вклада тромбоцитов в генерацию тромбина.

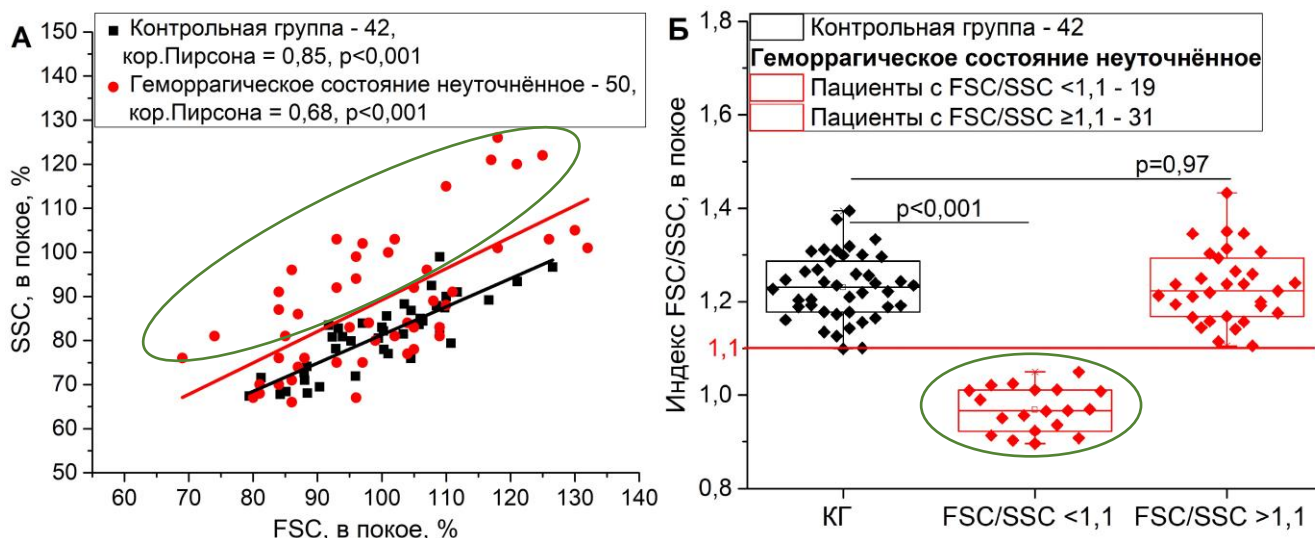


Рисунок 10 – Отношение размера и гранулярности (индекс FSC/SSC) тромбоцитов у пациентов группы ГСН. Панель А показывает повышение общей гранулярности тромбоцитов у части пациентов, панель Б определяет пороговое значение FSC/SSC <1,1 для наблюдаемых морфологических нарушений тромбоцитов.

При высвобождении α -гранул тромбоцитов гранулярный CD62p выставляется на цитоплазматической мембране, но если CD62p *in vivo* не связывается со своими лигандами, то начинает отщепляться и трудно увидеть его значительное увеличение на поверхности мембраны (Michelson, 2000; Michelson, 2007). В подгруппе FSC/SSC < 1,1 достоверное снижение индекса дегрануляции α -гранул (Рисунок 11 В, $p < 0,001$) может объясняться частичной внутрисосудистой дегрануляцией α -гранул тромбоцитов. Ранее сообщалось о выявлении предиктивного потенциала использования панели агонистов из низких концентраций АДФ, TRAP и CRP, для выявления нарушений связывания фибриногена и экспонирования CD62p у пациентов с повышенной кровоточивостью (Boknäs, 2018). В подгруппе FSC/SSC $\geq 1,1$ отличие CD62p от КГ было недостоверным (Рисунок 11 А-В, $p > 0,05$).

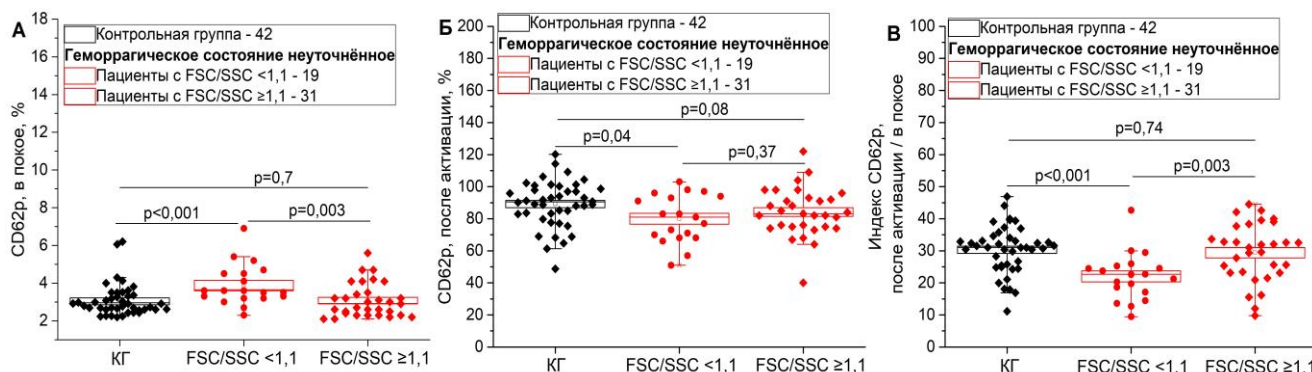


Рисунок 11 – Мембранный и гранулярный CD62p тромбоцитов и индекс дегрануляции α -гранул в подгруппах с ГСН. Панель (А) показывает повышенную плотность мембранного CD62p в покое, в подгруппе пациентов FSC/SSC < 1,1. После активации, CD62p был снижен в подгруппе с FSC/SSC < 1,1 (панели Б и В). В подгруппе FSC/SSC $\geq 1,1$ значения CD62p не отличались от КГ (А-В).

В подгруппе пациентов с FSC/SSC < 1,1 была достоверно снижена доля прокоагулянтных тромбоцитов после активации (Рисунок 12 Б), что дополняет картину функциональной неполноценности тромбоцитов у данных пациентов.

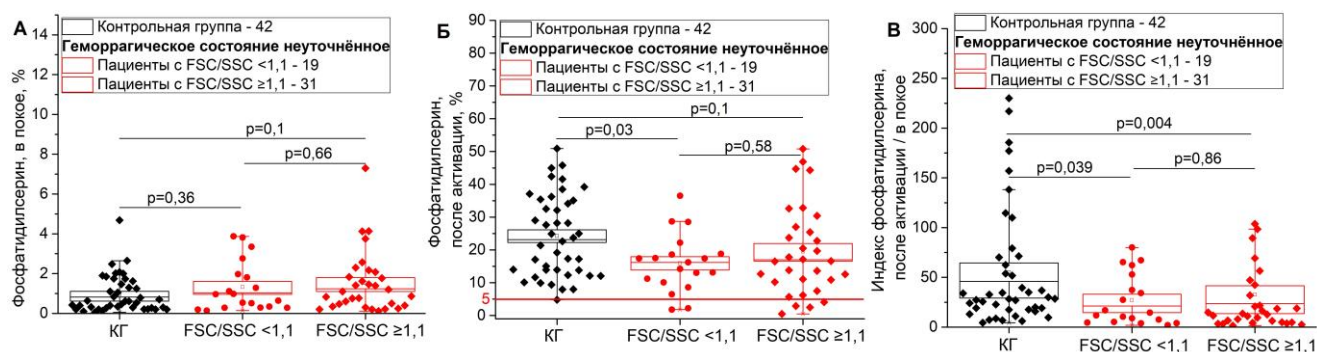


Рисунок 12 – Доля прокоагулянтных тромбоцитов в подгруппах пациентов с ГСН различающихся по морфологии. Панель А показывает отсутствие достоверных различий базального количества ФС+ тромбоцитов в подгруппах пациентов до стимуляции; панель Б показывает снижение доли ФС+ в подгруппе FSC/SSC < 1,1 после активации; панель В указывает на ослабление способности генерировать ФС+ тромбоциты в обеих подгруппах пациентов при активации.

В зависимости от тяжести геморрагических проявлений в 2 балла и 3-6 баллов по шкале RBQ пациенты с ГСН дополнительно были разделены на две подгруппы, что позволило выявить достоверное снижение доли прокоагулянтных тромбоцитов в подгруппе пациентов с тяжестью 3-6 баллов (Рисунок 13 Б, $p = 0,004$), проиллюстрировав закономерную связь между количеством ФС+ тромбоцитов и выраженностью геморрагического синдрома.

Выявленные нами достоверные различия между КГ и пациентами с ГСН, убедительно указывают на существование паттерна, включающего структурные нарушения общей гранулярности, нарушения α-гранул и ведущую роль ослабления прокоагулянтной активности тромбоцитов, в развитии повышенной кровоточивости тромбоцитарного генеза. Описанные нарушения могут являться маркерами ВАТ приводящей к последующей частичной десенситизации тромбоцитов и снижению реактивности *in vivo*, как это было показано на мышинных моделях (Chaudhary, 2020) и пациентах с сахарным диабетом (Mahmoodian, 2019).

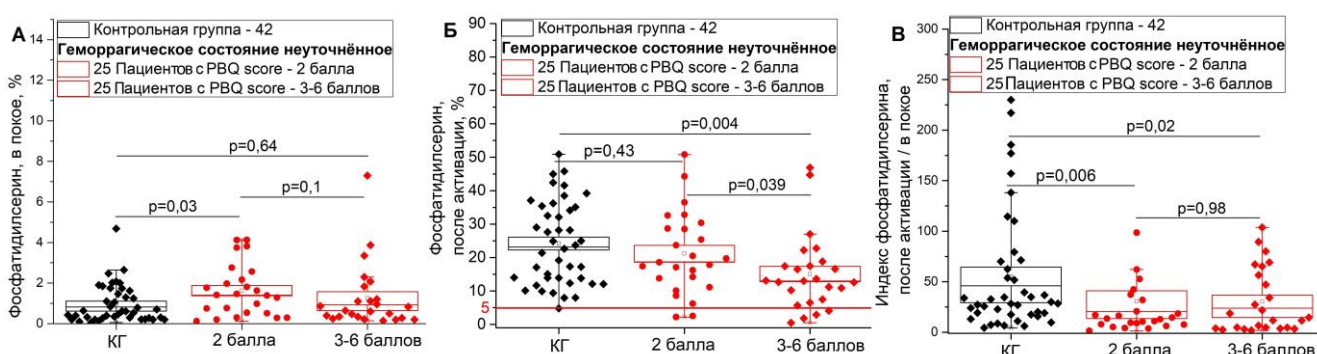


Рисунок 13 – Связь между долей прокоагулянтных тромбоцитов и тяжестью геморрагического синдрома у пациентов с ГСН. Панель А показывает повышение базального уровня ФС+ тромбоцитов в подгруппе пациентов с легким геморрагическим синдромом; панель Б показывает снижение доли ФС+ после активации в подгруппе пациентов с выраженным геморрагическим синдромом; панель В указывает на ослабление способности генерировать ФС+ тромбоциты в обеих подгруппах пациентов при активации.

Роль нарушений пула хранения и прокоагулянтной активности в развитии геморрагического синдрома

В обследованных нами группах пациентов, умеренная корреляционная связь между увеличением тяжести геморрагического синдрома и уменьшением количества тромбоцитов наблюдалась только в группе нормотромбоцитопений и отсутствовала в остальных группах пациентов. Однако, были выявлены паттерны функциональных отклонений, связанные с увеличением тяжести геморрагического синдрома: так, у пациентов с нормотромбоцитопениями и СВО, были выявлены нарушения пула хранения плотных и α -гранул. Ослабление прокоагулянтной активности выявлено у пациентов с нормотромбоцитопениями, СВО, макротромбоцитопениями и неуточнённым геморрагическим синдромом. Полученные результаты согласуются с литературными данными о выявлении нарушений пула хранения (Brunet, 2020) и прокоагулянтной активности тромбоцитов (Aliotta, 2021; Hayward, 2019; Jurk et al., 2021) у пациентов с различными заболеваниями тромбоцитов и подозрением на нарушения функции тромбоцитов. Обращает на себя внимание, что у 19 пациентов с нормотромбоцитопениями и СВО снижение доли ФС+ тромбоцитов $< 5\%$ коррелировало с усилением тяжести ГС от 1 до 6 баллов по шкале RBQ ($-0,67, p = 0,0018$), указывая на возможный пороговый характер отметки 5% в реализации клинических проявлений при снижении функции ФС. В то же время, у пациентов с макротромбоцитопениями ФС+ был $< 5\%$ только у двух пациентов с СБС и тяжелыми проявлениями кровоточивости (5 и 13 баллов). Особого внимания заслуживает выявление связи между тяжестью геморрагического синдрома в 3-16 баллов и комплексом аномалий размера, гранулярности, способности к ретракции, дегрануляции α -гранул и ослаблением прокоагулянтной активности у части пациентов с макротромбоцитопениями.

Таким образом, наблюдалась высокая гетерогенность характера нарушений тромбоцитов и тяжести ГС в группах и подгруппах пациентов, что подтверждает необходимость комплексного анализа тромбоцитов в покое и после активации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования групп пациентов с использованием метода проточной цитометрии, был предложен и применен оригинальный комплексный подход для выявления нарушений морфологии и функции тромбоцитов, включавший определение индексов активации. Индексы активации, как отношение показателей в покое / после активации, интегрально отражают эффективность работы механизмов активации тромбоцитов. Были показаны специфические взаимосвязи между размером, гранулярностью, экспрессией рецепторов и прокоагулянтной активностью тромбоцитов в группах пациентов и их связь с геморрагическими проявлениями. Исследование ФАТ позволило выявить характерные нарушения у пациентов с тромбастенией Гланцмана (дефицит ГП IIb/IIIa и нарушение его активации); синдромом Бернара-Сулье (дефицит ГП Ib, увеличение размера клеток); синдромом Германского-Пудлака (дефицит плотных гранул) и МУН9 (увеличение размера клеток). Среди детей с неуточнённым геморрагическим синдромом, была определена подгруппа пациентов (38%) с характерным паттерном (комплексом) нарушений, включившим повышенную гранулярность ($p < 0,001$), CD62p повышенный в покое ($p < 0,001$) и сниженный после активации ($p = 0,04$) и ослаблением способности генерировать прокоагулянтные тромбоциты ($p = 0,039$).

Тяжесть геморрагического синдрома коррелировала с уменьшением количества тромбоцитов только в группе нормотромбоцитопений ($-0,4, p = 0,046$). Тяжесть проявлений геморрагического синдрома была достоверно связана с:

- с уменьшением ($p \leq 0,01$) и нарушением высвобождения плотных гранул ($p \leq 0,005$), ослаблением высвобождения α -гранул ($p \leq 0,05$) и прокоагулянтной активности ($p < 0,001$) в группе пациентов с нормотромбоцитопениями;

- с уменьшением ($p < 0,001$) и нарушением высвобождения плотных ($p \leq 0,002$) и α -гранул ($p < 0,001$), ослаблением прокоагулянтной активности ($p < 0,001$) в группе пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича;

- с относительным нарушением высвобождения α -гранул ($p = 0,05$) и ослаблением прокоагулянтной активности ($p = 0,02$) в подгруппе пациентов с макротромбоцитопениями, имевших 3-16 баллов по PBQ;

- с ослаблением прокоагулянтной активности ($p = 0,004$) в подгруппе пациентов с неутонченным геморрагическим синдромом, имевших 3-6 баллов по PBQ.

Во всех группах пациентов, кроме группы синдрома Вискотта-Олдрича, выявлена корреляционная связь между уменьшением количества тромбоцитов и увеличением их размера (от -0,39 до -0,64, $p < 0,05$). В группах пациентов с нормоклеточными наследственными заболеваниями тромбоцитов, макротромбоцитопении и неутонченным геморрагическим синдромом выявлен паттерн структурных нарушений тромбоцитов в виде корреляции между уменьшением количества тромбоцитов и увеличением их гранулярности (от -0,47 до -0,63, $p < 0,05$). Корреляция не наблюдалась в группах нормотромбоцитопений (-0,22, $p = 0,28$) и синдрома Вискотта-Олдрича (-0,24, $p = 0,24$).

У части пациентов выявлены морфологически аномальные субпопуляции тромбоцитов, с нарушенным соотношением размера и гранулярности (FSC/SSC $< 1,1$), кроме пациентов в группе нормоклеточных наследственных заболеваний тромбоцитов. У 5,8% пациентов выявлено ослабление способности к ретракции (индекс FSC $< 1,19$), кроме пациентов в группе нормоклеточных наследственных заболеваний тромбоцитов. Нарушения снижения гранулярности тромбоцитов после активации (индекс SSC $< 1,04$) наблюдалось у 30% пациентов.

Помимо патогномичных признаков, тест ФАТ позволил выявить ряд ранее не описанных у детей нарушений тромбоцитов: при тромбастении Гланцмана выявлены признаки дефицита α -гранул ($p < 0,001$); при синдроме Германского-Пудлака выявлено ослабление способности генерировать прокоагулянтные тромбоциты ($p = 0,006$). При нормоклеточных тромбоцитопениях выявлено ослабление отщепления CD42b ($p < 0,001$). При синдроме Вискотта-Олдрича выявлено ослабление отщепления CD42b ($p < 0,001$), активации ГП IIb/IIIa ($p < 0,001$). При макротромбоцитопениях выявлено достоверное повышение плотных гранул в подгруппе FSC/SSC $< 1,1$, в сравнении с подгруппой FSC/SSC $\geq 1,1$ ($p = 0,01$), нарушение продукции прокоагулянтных тромбоцитов ($p = 0,01$), и признаки внутрисосудистой дегрануляции α -гранул в подгруппе пациентов с тяжестью ГС 3-16 баллов. При тромбоцитозах выявлено ослабление отщепления CD42b ($p < 0,001$), снижение ГП IIb/IIIa ($p < 0,001$) и нарушение высвобождения плотных гранул ($p = 0,001$) при активации.

Таким образом, полученная картина нарушений тромбоцитов дополнила существующие представления о проявлениях дисфункции тромбоцитов, в зависимости количества и размера тромбоцитов, в изученных группах заболеваний и при отдельных нозологиях. Детальный анализ результатов продемонстрировал полезность исследования Функциональная активность тромбоцитов для интерпретации механизмов возникновения и тяжести геморрагических проявлений.

ВЫВОДЫ

1. Исследование ФАТ позволяет диагностировать тромбастению Гланцмана, синдром Германского-Пудлака, синдром Бернара-Сулье и MYH9-связанную тромбоцитопению.

2. У детей с неутонченным геморрагическим синдромом в 38% случаев выявляется характерный комплекс нарушений:

- нарушение морфологии по индексу размер/гранулярность ($p < 0,001$),
- нарушение высвобождения α -гранул по значениям CD62p ($p < 0,001$),
- ослабление способности генерировать прокоагулянтные тромбоциты ($p < 0,05$).

3. Исследование ФАТ выявило неописанные ранее особенности дисфункции тромбоцитов:

- при тромбастении Гланцмана уменьшение α -гранул ($p < 0,001$);
- при синдроме Германского-Пудлака ослабление прокоагулянтной активности ($p < 0,01$);
- при ANKRD26-связанной тромбоцитопении и синдроме Вискотта-Олдрича ослабление растворения ГП IIb при активации ($p < 0,001$);

- при всех нормотромбоцитопениях и синдроме Вискотта-Олдрича нарушение гранулярности тромбоцитов ($p < 0,001$);
 - при синдроме Вискотта-Олдрича ослабление активации ГП IIb/IIIa и высвобождения α -гранул ($p < 0,001$).
4. Тяжесть проявлений геморрагического синдрома достоверно связана со снижением доли прокагулянтных тромбоцитов ниже 5% ($p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При тромбастении Гланцмана, синдроме Германского-Пудлака, синдроме Бернара-Сулье и МУН9-связанной тромбоцитопении исследование ФАТ может применяться в качестве диагностического.
2. У пациентов с подозрением на неклассифицированные нарушения функции тромбоцитов рекомендуется применение исследования ФАТ с целью выявления новых, ранее не охарактеризованных, нарушений функции тромбоцитов.
3. Для наиболее полной характеристики нарушений функции тромбоцитов целесообразно использовать исследование ФАТ в комплексе с другими методами оценки тромбоцитарного гемостаза (оптической агрегометрией, микроскопией и др.) и генетическими исследованиями.
4. Для выявления функциональных нарушений тромбоцитов рекомендуется применение пороговых значений индексов активации.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Полохов Д.М. Современные подходы в лабораторной диагностике тромбоцитарного гемостаза / Д.М. Полохов, М.А. Пантелеев. // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. - 2016. - Т. 2. - № 2. - с. 270-290.
2. Полохов Д.М. Редкая форма тромбоцитопатии с нарушением прокагулянтной активности и секреции тромбоцитов / Д.М. Полохов, С.А. Васильев, Н.И. Зозуля, М.А. Кумскова, Т.Н. Моисеева, Л.С. Аль-Ради, М.А. Пантелеев. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2018. - Т. 17. - № 1. - с. 93-96.
3. Федорова Д.В. Диагностика тромбоцитопатий у детей: корреляции исследования функциональной активности тромбоцитов с клинической картиной и результатами агрегометрии / Д.В. Федорова, П.А. Жарков, А.А. Игнатова, А.Ю. Федотов, Д.М. Полохов, А.В. Полетаев, Е.А. Серегина, А.В. Пшонкин. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2018. - Т. 17. - № 1. - с. 16-22.
4. Полохов Д.М. Нарушения тромбоцитарного гемостаза у детей с эссенциальной тромбоцитемией / Д.М. Полохов, Н.М. Ершов, А.А. Игнатова, А.В. Полетаев, Н.С. Сметанина, М.А. Пантелеев. // Российский журнал детской гематологии и онкологии. - 2019. - Т. 6. - № S1. - с. 170.
5. Алексенко М.Ю. Маркеры внутрисосудистой активации тромбоцитов у детей с геморрагическим синдромом / М.Ю. Алексенко, Д.М. Полохов, А.А. Игнатова, Е.А. Пономаренко, П.А. Жарков, Д.В. Фёдорова, М.А. Пантелеев. // Российский журнал детской гематологии и онкологии. - 2019. - Т. 6. - № S1. - с. 154.
6. Игнатова А.А. Характеризация функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии / А.А. Игнатова, Е.А. Пономаренко, П.А. Жарков, Д.В. Фёдорова, Д.М. Полохов, Е.В. Сунцова, Г.А. Новичкова, Пантелеев М.А. // Российский журнал детской гематологии и онкологии. - 2019. - Т. 6. - № S1. - с. 161.
7. Polokhov D.M. Flow Cytometry for Pediatric Platelets / A.A. Ignatova, E.A. Ponomarenko, D.M. Polokhov, E.V. Suntsova, P.A. Zharkov, D.V. Fedorova, EN Balashova, A.E. Rudneva, V.V. Ptushkin, E.A. Nikitin, A.Y. Shcherbina, A.A. Maschan, G.A. Novichkova, M.A. Panteleev. // Platelets. - 2019. - Т. 30. - № 4. - p. 428-437.
8. Polokhov D.M. Use of Flow Cytometry and Aggregatometry Methods for the Assessment of Platelet Haemostasis in Children with Essential Thrombocythemia / D.M. Polokhov, N.M. Ershov, A.V.

Poletaev, N.S. Smetanina, M.A. Pantelev. // Clinica Chimica Acta 493 (2019) S379–S433, Volume 493, - Supplement 1, - Pages S1-S776.

9. Polokhov D.M. Platelet Function and Blood Coagulation System Status in Childhood Essential Thrombocythemia / D.M. Polokhov, N.M. Ershov, A.A. Ignatova, E.A. Ponomarenko, M.V. Gaskova, P.A. Zharkov, D.V. Fedorova, A.V. Poletaev, E.A. Seregina, G.A. Novichkova, N.S. Smetanina, M.A. Pantelev // Platelets. – 2020. - 31:1001–1011.

10. Polokhov D.M. Platelet Activation Markers and Impaired Procoagulant Response in Pediatric Patients with Inherited Platelet Function Disorders / D.M. Polokhov, A.A. Ignatova, E.A. Ponomarenko, P.A. Zharkov, D.V. Fedorova, G.A. Novichkova, M.A. Pantelev. // Res Pract Thromb Haemost. – 2020. - 4 (Suppl 1).

11. Fedorova D.V. Utility of the ISTH Bleeding Assessment Tool and the Pediatric Bleeding Questionnaire in predicting platelet function defects in pediatric patients with excessive bleeding / D.V. Fedorova, A.A. Ignatova, D.M. Polokhov, E.A. Ponomarenko, E.A. Seregina, A.V. Poletaev, M.A. Pantelev, P.A. Zharkov // Res Pract Thromb Haemost. – 2020. - 4 (Suppl 1).

12. Fedorova D.V. Flow Cytometry of Platelets: A Way for Distinguishing Patients with MYH9-related Disease from Patients with Other Inherited Thrombocytopenias and Immune Thrombocytopenia / D.V. Fedorova, A.A. Ignatova, D.M. Polokhov, E.A. Ponomarenko, M.A. Pantelev, P.A. Zharkov // Res Pract Thromb Haemost. – 2020. - 4 (Suppl 1).

13. Polokhov D.M. Levels of P-selectin and phosphatidylserine in pediatric patients with inherited platelet function disorders / D.M. Polokhov, A.A. Ignatova, E.A. Ponomarenko, P.A. Zharkov, D.V. Fedorova, G.A. Novichkova, M.A. Pantelev // HemaSphere: June 2020. - Volume 4 - Issue – p. 772

14. Полохов Д.М. Особенности пула хранения и морфологии тромбоцитов у детей с неуточненным геморрагическим синдромом / Д.М. Полохов, Д.В. Федорова, А.В. Пшонкин, А.А. Игнатова, Е.А. Пономаренко, М.Ю. Алексенко, И.В. Мерсиянова, Е.А. Серегина, К.А. Воронин, А.В. Полетаев, Е.В. Райкина, М.А. Пантелеев, П.А. Жарков // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2021. - 20(1):58-65.

15. Полохов Д.М. Особенности фенотипа тромбоцитов у детей с ANKRD26-ассоциированной тромбоцитопенией / Д.М. Полохов, Д.В. Федорова, А.В. Пшонкин, А.А. Игнатова, Е.А. Пономаренко, М.Ю. Алексенко, И. В. Мерсиянова, Е. А. Серегина, К. А. Воронин, А. В. Полетаев, Е. В. Райкина, М.А. Пантелеев, П.А. Жарков // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2021. - 20 (2): 65-73.

16. Яфошкина Т.Ю. Оценка чувствительности и специфичности детского опросника кровоточивости при различных геморрагических заболеваниях / Т.Ю. Яфошкина, Д.Б. Флоринский, А.В. Пшонкин, Д.В. Федорова, А.В. Полетаев, Е.А. Серегина, Д.М. Полохов, К.А. Воронин, П.А. Жарков // Педиатрия. – 2021. - 100 (3): 35-41.

17. Polokhov D.M. Disturbed Platelet Activation in Children with ANKRD26-associated Thrombocytopenia [abstract] / D.M. Polokhov, D.V. Fedorova, A.V. Pshonkin, A.A. Ignatova, E.A. Ponomarenko, M.Y. Aleksenko, I.V. Mersyanova, E.A. Seregina, K.A. Voronin, A.V. Poletaev, E.V. Raykina, M.A. Pantelev, P.A. Zharkov // Res Pract Thromb Haemost. - 2021. - 5 (Suppl 2).

18. Yafoshkina T.Y. Specificity and Sensitivity of Pediatric Bleeding Questionnaire (PBQ) in Identifying Patients Requiring further Laboratory Evaluation [abstract]. / T.Y. Yafoshkina, D.B. Florinskiy, K.A. Voronin, D.M. Polokhov, A.V. Poletaev, E.A. Seregina, D.V. Fedorova, P.A. Zharkov // Res Pract Thromb Haemost. - 2021. - 5 (Suppl 2).

19. Устинова М.В. Результаты ретроспективного сравнительного анализа проявлений и выраженности геморрагического синдрома у детей с тромбастенией Гланцмана / М.В. Устинова, Д.В. Федорова, А.В. Пшонкин, А.В. Полетаев, Е.А. Серегина, Д.М. Полохов, А.А. Игнатова, П.А. Жарков // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. - 2021. - Т. 100. № 5. С. 109-116.

20. Копосова А.О. Геморрагическая тромбоцитопатия с дефектом сигнализации CALDAG-GEFI / А.О. Копосова, Д.В. Фёдорова, А.В. Пшонкин, А.В. Полетаев, Е.А. Серёгина, С.А. Плясунова, Д.М. Полохов, М.А. Курникова, Е.В. Райкина, С.Г. Манн, П.А. Жарков // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2021.-Т. 20. № 3. С. 126-131.

Список использованных сокращений

AUC – area under curve
CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)
Cut-off – пороговое значение
CRP – collagen related peptide (коллагено-подобный пептид)
FSC – forward scatter (прямое светорассеяние – отражает размер клетки)
GP – glycoprotein (гликопротеин)
NGS - next-generation sequencing (секвенирование следующего поколения)
PAR-1 – protease activated receptor 1 (рецептор, активируемый протеазой 1)
PBQ - Pediatric Bleeding Questionnaire (Педиатрический опросник кровоточивости)
PLT – количество тромбоцитов
ROC-анализ (Receiver Operator Characteristic) - Характеристики оператора приемника
Se – sensitivity, чувствительность
Sp – specificity, специфичность
SSC – side scatter (боковое светорассеяние – отражает гранулярность клетки)
THPO – Thrombopoietin - тромбопоэтин
TRAP – thrombin receptor activating peptide (пептид, активирующий рецептор тромбина)
WASp - Wiskott-Aldrich syndrome protein – белок синдрома Вискотта-Олдрича
АДФ – аденозиндифосфат
АТФ – аденозинтрифосфат
ВАТ – внутрисосудистая (пред-) активация тромбоцитов
ГСН – геморрагическое состояние неуточнённое / неуточнённый геморрагический синдром
ГП – гликопротеин
ИП - истинная полицитемия
КГ – контрольная группа
СВО –синдром Вискотта-Олдрича (микротромбоцитопения)
МК – мегакариоциты
НЗТ - наследственные заболевания тромбоцитов
ОА - оптическая агрегометрия
ОКС – открытая канальцевая система
ПКС – плотная канальцевая система
ПЦ - проточная цитометрия
РНК – рибонуклеиновая кислота
СБС – синдром Бернара-Сулье
СГП – синдром Германского-Пудлака
ТГ – Тромбастения Гланцмана
ЭТ - эссенциальная тромбоцитемия
Исследование / тест ФАТ – «Функциональная активность тромбоцитов»
ФС / ФС+ – ФС-положительные тромбоциты / прокоагулянтные тромбоциты
ХМПЗ - хронические миелопролиферативные заболевания