



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.10.3.002>
УДК 616.151.5-005.1-02-053.2



Дмитриев В.В.²✉, Кохан А.Ю.¹, Шамова Е.В.¹, Борисенок М.Б.², Мычкова Г.Н.²

¹ Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук
Беларуси, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Геморрагический синдром невьясненного генеза у детей

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн – Дмитриев В.В.; исследование свертывания крови – Борисенок М.Б.; исследование агрегационной активности тромбоцитов – Мычкова Г.Н.; исследование тромбоцитов методом проточной цитометрии – Кохан А.Ю.; интерпретация результатов проточной цитометрии – Шамова Е.В.; анализ и интерпретация результатов свертывания крови и агрегации тромбоцитов – Дмитриев В.В.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Подана: 02.08.2024

Принята: 10.09.2024

Контакты: dmitrievhaematol@mail.ru

Резюме

Введение. Отличить здорового ребенка с наличием симптомов повышенной кровоточивости от пациента с геморрагическими проявлениями вследствие нарушений сосудисто-тромбоцитарного звена свертывания крови в ряде случаев сложно для гематолога.

Цель. Оценить функциональную активность тромбоцитов у детей с геморрагическим синдромом неуточненного генеза, обусловленным тромбоцитопатией.

Материалы и методы. В исследование включены 35 детей, чьи родители обратились по поводу кровотечений в анамнезе у детей с целью выявления гематологической причины кровотечения. Наиболее часто имели место носовые кровотечения ($n=30$), ювенильное маточное кровотечение ($n=3$), обильные экхимозы на коже ног и туловища ($n=2$). Контрольную группу составили 17 соматически здоровых детей.

Результаты. Показатели агрегационной активности тромбоцитов, зарегистрированные фотооптическим методом, у большинства детей с геморрагическим синдромом в анамнезе на момент исследования не отличались от соответствующих значений в контроле. Импедансным методом среди 35 обследованных выявлено снижение площади под агрегационной кривой у 15 детей. Методом проточной цитометрии у детей с геморрагическим синдромом и сниженной агрегацией выявлено достоверное увеличение относительно контрольной группы размеров тромбоцитов (FCS) и гранулярности (SSC). При нормировании количества рецептора GPIIb/IIIa на размер тромбоцитов (FSC) выявлено достоверное снижение анализируемого параметра. Положительная корреляционная связь между количеством рецепторов GPIIb/IIIa (CD41) и GPIb (CD42b) в условиях активации отражала гемостатические свойства тромбоцитов у пациентов, не имевших геморрагического синдрома.

Заключение. Все пациенты с жалобами на повышенную кровоточивость нуждаются в исследовании агрегационной активности тромбоцитов оптическим и импедансным методами агрегатометрии. Для уточнения ведущего механизма геморрагического синдрома выполняют оценку функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии.

Ключевые слова: тромбоциты, геморрагический синдром, проточная цитометрия, свертывание крови, агрегация тромбоцитов

Dmitriev V.², Kokhan A.¹, Shamova E.¹, Borisenok M.², Michkova G.²

¹ Republican Scientific Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

² Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Hemorrhagic Disease of Unknown Cause in Children

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design – Dmitriev V.; blood coagulation study – Borisenok M.; platelet aggregation activity study – Michkova G.; platelet examination by flow cytometry – Kokhan A.; interpretation of the results of flow cytometry – Shamova E.; analysis and interpretation of the results of blood coagulation and platelet aggregation – Dmitriev V.

Funding: the study had no sponsorship.

Submitted: 02.08.2024

Accepted: 10.09.2024

Contacts: dmitrievhaematol@mail.ru

Abstract

Introduction. Distinguishing a healthy child with symptoms of increased bleeding from a patient with hemorrhagic manifestations due to disorders of the vascular-platelet component of blood coagulation in some cases poses a problem for the hematologist.

Purpose. To evaluate the functional activity of platelets in children with hemorrhagic syndrome of unspecified origin.

Materials and methods. The study included patients of 35 children whose parents contacted the Center about a history of bleeding in children in order to identify the hematological cause of the bleeding. The most common cases were nosebleeds (n=30), juvenile uterine bleeding (n=3), and abundant ecchymoses on the skin of the legs and torso (n=2). The control group consisted of 17 somatically healthy children.

Results. Indicators of platelet aggregation activity, recorded by the photooptical method, in the majority of children with a history of hemorrhagic syndrome at the time of the study did not differ from the corresponding values in the control. The impedance method revealed a decrease in the area under the aggregation curve in 15 children out of 35 examined. Flow cytometry in children with hemorrhagic syndrome and reduced aggregation revealed a significant increase in platelet size (FCS) and granularity (SSC) relative to the control group. When normalizing the amount of GPIIb/IIIa receptor to platelet size (FSC), a significant decrease in the analyzed parameter was revealed. A positive correlation between the number of GPIIb/IIIa (CD41) and GPIb (CD42b) receptors under activation reflected the hemostatic properties of platelets in patients without hemorrhagic syndrome.



Conclusion. All patients with complaints of increased bleeding need to study the aggregation activity of platelets using optical and impedance aggregometry methods. To clarify the leading mechanism of hemorrhagic syndrome, platelet functional activity is assessed using flow cytometry.

Keywords: platelets, hemorrhagic syndrome, flow cytometry, blood clotting, platelet aggregation

■ ВВЕДЕНИЕ

Одна из наиболее частых причин обращения родителей к детскому гематологу связана с повышенной склонностью детей к кровотечениям. Обширный перечень причин возникновения геморрагического синдрома объединяет различные состояния, связанные с нарушением плазменного или сосудисто-тромбоцитарного звена системы свертывания крови. Клинические проявления гематомного типа, результаты коагуляционного скрининга и факторный анализ, при необходимости, подтверждают или исключают различные коагулопатии. Подсчет содержания тромбоцитов позволяет отвергнуть ситуации, ассоциированные с тромбоцитопенией. Клинические проявления нарушений сосудисто-тромбоцитарного звена, обусловленные тромбоцитопатией, включают повышенную кровоточивость кожи и слизистых оболочек, желудочно-кишечные, носовые, маточные кровотечения. По данным, приведенным в немногочисленных публикациях, до 9% детей имеют носовые кровотечения, а у 12% младенцев в общей детской популяции при осмотре можно выявить экхимозы [1]. Количество экхимозов у детей с возрастом может увеличиваться [2–4]. Отличить здорового ребенка с наличием вышеперечисленных симптомов от пациента с проявлениями кровоточивости вследствие нарушений свертывания крови – в ряде случаев большая проблема для педиатра и гематолога. Особенно это касается патологии тромбоцитарного звена, при которой дебют выраженных геморрагических проявлений может наблюдаться как в раннем, так и в более позднем возрасте [5].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить функциональную активность тромбоцитов у детей с геморрагическим синдромом неуточненного генеза, обусловленным тромбоцитопатией.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

После подписания законными представителями информированного согласия обследованы 17 соматически здоровых детей, обратившихся в государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Центр) перед предстоящим грыжесечением. Поводом для обследования в условиях Центра было увеличение одного из хронометрических показателей свертывания, выявленное в условиях поликлиники по месту жительства. После обследования и исключения нарушений свертывания крови и агрегации тромбоцитов пациенты включены в группу условного контроля для здоровых детей без нарушений свертывания крови (первая группа). В исследование включены 35 пациентов в возрасте до 18 лет, чьи родители обратились в Центр по поводу

кровотечений в анамнезе у детей с целью выявления гематологической причины кровотечения. Наиболее часто имели место носовые кровотечения (n=30), ювенильное маточное кровотечение (n=3), обильные экхимозы на коже ног и туловища (n=2). У всех детей были исключены нарушения плазменного звена свертывания крови, что стало основанием для продолжения обследования этих пациентов с целью исключения патологии тромбоцитарного звена гемостаза. Среди 35 пациентов с геморрагическим синдромом выделена вторая группа без нарушений агрегационной активности тромбоцитов (n=20) и третья группа – пациенты с нарушениями агрегации тромбоцитов, выраженными в разной мере (n=15). Лекарственные средства, влияющие на плазменное звено свертывания крови и агрегационную активность тромбоцитов, в течение 2 недель перед обследованием пациенты не получали. Оценка клинических проявлений гемсиндрома осуществлялась по стандартизованной шкале BAT (bleeding assessment tool), разработанной комитетом по стандартизации Международного общества «Тромбоз и гемостаз» [6]. Характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Взятие крови осуществляли путем пункции периферической вены без наложения жгута с использованием вакутайнера. Венозную кровь стабилизировали 3,2% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Стабилизированную венозную кровь использовали для оценки агрегационной активности тромбоцитов импедансным

Таблица 1
Характеристика пациентов в выделенных группах (Me (10–90) %%)
Table 1
Characteristics of patients in the selected groups (Me (10–90) %%)

Анализируемый признак	Контроль	Гемсиндром в анамнезе	
	Дети без гемсиндрома, n=17, группа 1	Без нарушений агрегации, n=20, группа 2	Нарушена агрегация, n=15, группа 3
Возраст, полных лет	8,0 (1,0–16,0)	10,0 (5,0–14,5)	9,0 (6,0–17,0)
Состояние, число пациентов:			
– удовлетворительное	17	20	15
– средней тяжести	0	0	0
– тяжелое	0	0	0
Мужчины/женщины, число	8/9	10/10	7/6
Геморрагический синдром, балл	0 P3–1=0,0001	2,0 (1–3) P2–1=0,0001	2,0 (1–3) P3–2=0,39
Прием лекарственных средств, влияющих на свертывание, число детей	0	0	0
Предшествовали трансфузии препаратов крови, число пациентов	0	0	0
Гемоглобин крови, г/л	138,0 (112,0–146,0)	132,0 (119,0–150,0)	131,0 (120,0–142,0)
Эритроциты крови, 10 ¹² /л	4,9 (4,3–5,4)	4,7 (4,0–5,2)	4,7 (4,5–5,0)
Скорость оседания эритроцитов, мм/час	5,0 (3,0–16,0)	5,0 (4,0–12,0)	9,0 (7,0–12,0)
Лейкоциты крови, 10 ¹² /л	6,2 (4,9–8,3)	6,4 (4,6–9,6)	5,5 (4,7–8,5)
Гранулоциты крови, 10 ¹² /л	2,5 (1,5–4,7)	3,0 (2,0–6,6)	2,7 (1,9–6,3)

Примечание: P – достоверность различия между группами по критерию Манна – Уитни.



методом и проведения исследований с использованием проточного цитометра. Оставшуюся часть стабилизированной крови центрифугировали 10 мин. с ускорением 200 g для получения тромбоцитарной плазмы. Часть тромбоцитарной плазмы использовали для исследования агрегационных свойств тромбоцитов, оставшуюся тромбоцитарную плазму центрифугировали 2000 g в течение 10 мин. для получения бедной тромбоцитами плазмы, которую использовали для оценки плазменного звена свертывания крови.

Исследование свертывания включало: регистрацию активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) по Саен (1968), протромбинового времени по Quick (1935) с расчетом активности факторов протромбинового комплекса и международного нормализованного отношения (МНО) с учетом чувствительности тромбопластина, тромбинового времени по Biggs, Macfarlane (1962); определение содержания плазменного фибриногена, коагулируемого тромбином. Для коагуляционных показателей в качестве контроля использовали нормальную контрольную плазму, входящую в состав диагностических наборов фирмы Instrumentation Laboratory. Представление результатов хронометрических тестов в виде относительной величины (R), равной отношению исследуемого хронометрического показателя к величине соответствующего показателя контрольной плазмы, позволило сравнивать результаты независимо от времени проведения исследования, активности используемых реагентов, а также без использования в качестве контроля показателей гемостаза здоровых детей аналогичного возраста. За величину показателей гемостаза, отражающих возрастную норму, использовали результаты наблюдений, представленные в публикации Andrev M. et al., 1992 [7, 8]. Подсчет тромбоцитов периферической крови осуществляли автоматическим анализатором MICROS-60.

Агрегационную активность тромбоцитов оценивали оптическим методом Борна с использованием агрегометра «Солар» AP 2110. В качестве индукторов использовали натриевую соль аденозиндифосфата (производства фирмы «Сигма») в конечной концентрации 2,5 мкмоль/л, а также натриевую соль аденозиндифосфата (АДФ) и гидрохлорида адреналина в конечных концентрациях 5,0 мкмоль/л. Кроме фотооптического, применяли импедансный метод оценки агрегационной активности тромбоцитов на агрегометре Multiplate (Verum Diagnostica, GmbH, Germany). Использовали оригинальные реагенты фирмы Dynabyte medical GmbH, Germany: раствор натриевой соли аденозиндифосфата в конечной концентрации 6,5 мкмоль/л, коллаген в конечной концентрации 3,2 мкг/мл, арахидоновую кислоту в конечной концентрации 0,5 ммоль/л, TRAP-6 в конечной концентрации 32 мкмоль/л. В качестве показателя, отражающего агрегацию тромбоцитов цельной крови, была использована агрегационная активность, выраженная в условных единицах (Agregation Unit – AU; в русскоязычной транскрипции – агрегационные единицы – АЕ) измерения. Автоматически рассчитанную площадь под агрегационной кривой (area under curve – AUC) выражали в U×min (Ехмин в русскоязычной транскрипции). Перерасчет U в AU агрегометр выполнял автоматически исходя из соотношения 1 U = 10 AU (1 Е = 10 АЕ).

Анализ функциональной активности тромбоцитов проводили с помощью проточного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter, США). Тест проводили с использованием буфера Тироде (БТ, 136 ммоль/л NaCl, 2,6 ммоль/л KCl, 11,9 ммоль/л NaHCO₃, 0,4 ммоль/л NaH₂PO₄, 5 ммоль/л Hepes, 3,5 мг/мл бычий сывороточный альбумин, 2 ммоль/л MgCl₂, 2 ммоль/л CaCl₂). Для активации тромбоцитов готовили смесь

агонистов в буфере Тироде, содержащую АДФ (20 мкмоль/л), TRAP-6 (160 мкмоль/л), PAR4-AP (160 мкмоль/л). Для анализа тромбоцитов с помощью флуоресцентных антител готовили смесь антител в БТ. Использовали две многоцветные панели антител: панель 1 (П I) – CD42b-PerCP (маркер GPIIb, разбавление 1:50), PAC-1-FITC (активированная форма GPIIb/IIIa, разбавление 1:100), Annexin V-APC (маркер фосфатидилсерина (ФС), разбавление 1:100); панель 2 (П II) – CD41-PerCP-Cy5.5 (GPIIb/IIIa, разбавление 1:200), CD63-FITC (маркер дегрануляции плотных (δ) гранул, разбавление 1:25), CD62P-APC (маркер дегрануляции α -гранул, разбавление 1:100).

Стабилизированную венозную кровь разбавляли БТ в 20 раз. 10 мкл разбавленной крови инкубировали с 10 мкл смеси агонистов либо с 10 мкл БТ в течение 10 мин. при комнатной температуре. Затем добавляли 20 мкл смеси флуоресцентно меченых антител соответствующей панели и инкубировали в течение 10 мин. при комнатной температуре. Реакцию останавливали разбавлением БТ до 200 мкл, после чего пробы сразу учитывали на проточном цитометре. Для каждой панели проводили два измерения – контрольное (при добавлении к разбавленной крови буфера БТ) и при действии смеси агонистов тромбоцитов.

Учет событий на проточном цитометре осуществляли следующим образом: сначала на диаграмме светорассеяния SSC-A/FSC-A выделяли область, соответствующую размерам тромбоцитов, из которой на диаграммах FSC-A/CD42b (П I) либо FSC-A/CD41 (П II) выделяли события, положительные по тромбоцитарным маркерам CD42b либо CD41 соответственно. Затем выделенную область тромбоцитов анализировали на маркеры активации PAC-1, ФС, CD62, CD63.

Количество рецепторов и дегрануляцию оценивали по интенсивности флуоресценции соответствующих антител (геометрическое среднее GeoMean). Формирование прокоагулянтной поверхности тромбоцитов анализировали по аннексин V high событиям (%).

Статистический анализ данных выполнен при помощи компьютерного пакета программ STATISTICA (версия 6.0). Количественные показатели описательной статистики представлены как медиана (10-й – 90-й процентиля) либо как 25-й – 75-й процентиля. Достоверность различия показателей в сравниваемых группах оценивали по двустороннему критерию Манна – Уитни (U). Взаимосвязь анализируемых признаков оценивали по непараметрическому критерию Spearman (R). При оценке значимости статистических различий использовали порог значений для $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Показатели, зарегистрированные фотооптическим методом и отражающие агрегационную активность тромбоцитов, индуцированную АДФ и гидрохлоридом адреналина, у большинства детей второй и третьей групп с геморрагическим синдромом в анамнезе на момент исследования не отличались от соответствующих значений в контроле (табл. 3). Импедансным методом выявлено снижение площади под агрегационной кривой до 18,0 (4,0–44,0) Ехмин в присутствии АДФ, снижение AUC до 43,0 (11,0–55,0) Ехмин в присутствии арахидоновой кислоты и снижение AUC до 16,0 (10,0–34,0) Ехмин в присутствии коллагена у детей третьей группы, что подтверждало клинику заболевания. У детей второй группы, в отличие от пациентов третьей группы, перечисленные показатели мало отличались от соответствующих показателей в контроле. Степень выраженности геморрагического синдрома в условных единицах измерения была одинакова во второй и третьей группах.



Таблица 2
Показатели свертывания у пациентов в выделенных группах (Me (10–90) %%)
Table 2
Coagulation indices in patients in the selected groups (Me (10–90) %%)

Анализируемый признак	Выделенные группы		
	Контроль	Гемсиндром в анамнезе	
	Дети без нарушений свертывания, n=17	Без нарушений агрегации тромбоцитов, n=20	С нарушениями агрегации тромбоцитов, n=15
Активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), с	33,7 (30,5–41,2)	37,6 (31,2–39,8)	38,0 (32,3–51,2)
Отношение АПТВ пациента / АПТВ в контроле, ед.	0,95 (0,86–1,16)	1,04 (0,88–1,12)	1,06 (0,91–1,44)
Протромбиновое время, с	14,3 (13,6–17,1)	14,6 (13,2–15,4)	15,0 (14,0–16,5)
Международное нормализованное отношение, ед.	1,09 (1,03–1,29)	1,10 (0,96–1,19)	1,14 (1,03–1,26)
Активность факторов протромбинового комплекса, %	88,0 (69,0–95,0)	86,1 (78,5–102,5)	82,0 (71,0–95,0)
Тромбиновое время (ТВ), с	17,5 (16,8–19,6)	18,0 (17,0–18,6)	17,8 (17,2–18,5)
Отношение ТВ пациента / ТВ в контроле, ед.	0,86 (0,78–0,97)	0,88 (0,81–0,92)	0,85 (0,84–0,92)
Фибриноген, г/л	2,6 (2,1–4,1)	2,6 (2,2–3,7)	2,6 (2,2–3,0)
Фактор Виллебранда, %	144,0 (64,0–145)	101,0 (65,0–146,0)	120,1 (72,5–141)
Активность фактора Виллебранда, %	155,0 (61,0–159,0)	92,0 (60,0–152,0)	112,3 (66,0–140,0)

Измеренная методом проточной цитометрии величина показателя прямого светорассеяния (FCS-A), отражавшего размер тромбоцитов, и бокового светорассеяния (SSC-A), отражавшего гранулярность, не различалась у детей контрольной группы и детей с геморрагическим синдромом второй группы. У детей, включенных в третью группу, наблюдалось достоверное увеличение по сравнению с контрольной группой FSC-A как до, так и после дополнительной активации агонистами, а также достоверное увеличение SSC-A после агонист-индуцированной активации (табл. 4). Общее количество экспонированных на мембране тромбоцитов рецепторов GPIIb/IIIa в активированной форме (PAC1) составляло 400,9 (207,2–533,5) усл. ед. в группе контроля. После дополнительной активации количество маркеров, отражавших присутствие активированных рецепторов GPIIb/IIIa, увеличилось почти в 80 раз и составило 32645,8 (22467,5–38304,2) усл. ед. В условиях активации выявлено достоверное снижение показателя PAC-1 тромбоцитов пациентов второй группы по сравнению с группой контроля. Выявлена тесная обратная корреляционная зависимость ($R=-0,650$; $p=0,005$) между количеством рецепторов GPIIb/IIIa в активированной форме (PAC-1) на поверхности тромбоцитов в отсутствие активации и степенью агрегационной активности тромбоцитов 87,1 (67,0–126,0) АЕ, индуцированной арахидоновой кислотой, в группе контроля. Данная корреляционная зависимость сохранялась ($R=-0,640$; $p=0,006$) при нормировании параметра PAC-1 на общее количество

рецептора GPIIb/IIIa (CD41) в группе контроля. Обратная корреляционная зависимость ($R=-0,477$; $p=0,034$) также обнаружена во второй группе между показателями PAC-1/CD41 в отсутствие активации и скоростью агрегации тромбоцитов, индуцированной адреналином. Количество GPIb (CD42b) рецепторов к фактору Виллебранда до активации в контрольной группе составило 13070,1 (12774,9–13591,2) усл. ед. Нормированное на условную единицу поверхности тромбоцитарной мембраны количество GPIb (CD42b/FSC) в контрольной группе не превышало 0,315 (0,293–

Таблица 3
Показатели агрегации тромбоцитов у пациентов в выделенных группах (Me (10–90) %%)
Table 3
Platelet aggregation indices in patients in the selected groups (Me (10–90) %%)

Анализируемый признак	Контроль	Гемсиндром в анамнезе	
	Дети без нарушений свертывания, n=17	Без нарушений агрегации тромбоцитов, n=20	С нарушениями агрегации тромбоцитов, n=15
Тромбоциты периферической крови, $\times 10^9/\text{л}$	272,0 (222,0–360,0)	275,0 (147,0–404,0)	236,0 (156,0–314)
Агрегация тромбоцитов с индуктором АДФ 2,5 мкмоль/л:			
– степень максимальной агрегации, %	73,0 (53,7–88,0)	77,0 (51,0–87,0)	71,0 (49,0–79,0)
– скорость агрегации, %/мин	70,4 (56,0–85,4)	83,3 (59,0–90,0)	75,0 (64,0–78,0)
Агрегация тромбоцитов с индуктором гидрохлорид адреналин 5,0 мкмоль/л:			
– степень максимальной агрегации, %	83,2 (72,6–99,0)	85,0 (62,0–98,0)	72,0 (9,0–88,0)
– скорость агрегации, %/мин	22,0 (8,6–41,0)	35,0 (11,0–61,0)	14,4 (4,0–67,0)
Агрегация тромбоцитов с активатором рецепторов к АДФ 6,5 мкмоль/л:			*, #
– площадь под кривой (AUC), Ехмин	49,0 (28,0–64,0)	51,0 (35,0–69,0)	18,0 (4,0–44,0)
– степень агрегации, АЕ	71,0 (48,0–118,0)	90,0 (62,0–116,0)	54,0 (25,0–105,0)
– скорость, АЕ/мин	9,4 (6,3–17,1)	12,0 (8,0–16,0)	8,0 (3,0–14,0)
Агрегация тромбоцитов с арахидоновой кислотой 0,5 ммоль/л:			
– площадь под кривой (AUC), Ехмин	51,0 (35,0–76,0)	54,0 (35,0–76,0)	43,0 (11,0–5,0)*, #
– степень агрегации, АЕ	87,1 (67,0–126,0)	86,0 (48,0–125,0)	72,0 (33,8–98,6)
– скорость агрегации, АЕ/мин	12,5 (8,4–19,5)	13,7 (9,0–19,0)	10,0 (5,0–14,0)*, #
Агрегация тромбоцитов с активатором рецепторов к коллагену 3,2 мкг/мл:			
– площадь под кривой (AUC), Ехмин	30,5 (17,0–52,0)	36,0 (24,0–46,0)	16,0 (10,0–4,0)*, #
– степень агрегации, АЕ	72,0 (46,0–107,0)	79,0 (60,0–95,0)	49,0 (29,0–3,0)*, #
– скорость, АЕ/мин	9,0 (5,0–13,0)	9,0 (7,0–13,9)	5,0 (4,0–9,0)*, #
Агрегация тромбоцитов с активатором рецепторов к тромбину 32 мкмоль/л:			
– площадь под кривой (AUC), Ехмин	68,0 (55,0–93,0)	74,0 (60,0–85,0)	72,0 (34,0–91,0)
– степень агрегации, АЕ	106,0 (86,0–134)	109,0 (94,0–25,0)	106,0 (55,0–42,0)
– скорость, АЕ/мин	17,0 (14,0–31,0)	20,0 (16,0–31,0)	20,0 (8,0–27,0)
Агрегация тромбоцитов ристомидином (концентрация) 1,5 мг/мл:			
– степень максимальной агрегации, %	75,8 (49,2–77,7)	–	61,0 (15,0–91,0)
– скорость агрегации, %/мин	27,3 (8,6–74,0)	–	18,0 (9,0–31,0)

Примечания: * достоверность различий по сравнению с контрольной группой детей без нарушений свертывания $p<0,05$ (критерий Манна – Уитни); # достоверность различий по сравнению с группой детей без нарушений свертывания $p<0,05$ (критерий Манна – Уитни).



0,327) отн. ед. В то же время значения параметров CD42b и CD42b/FSC существенно не различались между первой и второй группами, обнаружено достоверное снижение значения параметра CD42b/FSC (0,280 (0,256–0,295)) в третьей группе в отсутствие активации по сравнению с контрольной группой.

Положительная корреляционная связь ($R=0,660$; $p=0,004$) между количеством рецепторов GPIIb/IIIa (CD41) и GPIb (CD42b) в условиях активации отражала гемостатические свойства тромбоцитов у детей, не имевших геморрагического синдрома.

Анализ высвобождения содержимого внутриклеточных гранул (α - и δ - (плотных) гранул) не выявил достоверных отличий в дегрануляции тромбоцитов между исследуемыми группами, однако обнаружена тенденция к снижению параметра, характеризующего дегрануляцию δ -гранул, у детей второй группы (2313,8 (2025,8–2865,2) усл. ед.) по сравнению со значениями в контрольной группе (2751,7 (2118,9–3085,1) усл. ед.). Исследование способности тромбоцитов формировать прокоагулянтную поверхность по экспонированию фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны с помощью флуоресцентно меченного маркера Annexin V также не выявило достоверных различий между анализируемыми группами (табл. 4).

Таблица 4
Показатели функциональной активности тромбоцитов, полученные методом проточной цитометрии (Me (25–75) %%)
Table 4
Indicators of functional activity of platelets obtained by flow cytometry (Me (25–75) %%)

	Контроль Дети без нарушения свертывания, n=17	Геморрагический синдром Дети без нарушений агрегации, n=20	Дети со сниженной агре- гацией, n=15
Прямое светорассеяние FSC (размер), усл. ед.: – до активации – после активации	42952,5 (39699,9–44936,2) 33495,2 (29850,8–35302,0)	42636,4 (37051,5–48204,9) 32892,3 (28760,8–37492,4)	47427,7 (42256,1–48445,2)* 36099,1 (33403,5–37753,3)*
Боковое светорассеяние SSC (гранулярность), усл. ед.: – до активации – после активации	110996,8 (102484,7–117502,1) 120767,5 (116400,1–131439,9)	109572,1 (101280,4–114232,2) 116804,2 (101779,1–134483,5)	114033,3 (107851,3–129045,3) 140359,6 (126408,3–155403,9)*
Количество GPIb (CD42b), усл. ед.: – до активации – после активации	13070,1 (12774,9–13591,2) 7290,3 (6881,0–7737,9)	12715,1 (11297,7–14566,3) 7641,9 (7346,6–8540,9)	12891,2 (11921,0–14093,3) 7999,9 (7152,7–8491,9)
Отношение количества GPIb (CD42b) к FSC, отн. ед.: – до активации – после активации	0,315 (0,293–0,327) 0,219 (0,209–0,245)	0,316 (0,270–0,327) 0,238 (0,206–0,285)	0,280 (0,256–0,295)*, # 0,225 (0,204–0,239)
Активация GPIIb/IIIa (PAC1), усл. ед.: – до активации – после активации	400,9 (207,2–533,5) 32645,8 (22467,5– 38304,2)	332,5 (201,1–413,1) 31284,2 (18778,4– 46741,6)	212,7 (126,9–545,8) 19832,1 (12311,4–31167,8)*, #

Окончание таблицы 4

	Контроль	Геморрагический синдром	
	Дети без нарушения свертывания, n=17	Дети без нарушений агрегации, n=20	Дети со сниженной агрегацией, n=15
Отношение PAC1 к количеству GPIIb/IIIa (CD41), отн. ед.: – до активации – после активации	0,0081 (0,0049–0,0103) 0,3262 (0,3015–0,4165)	0,0055 (0,0040–0,0084) 0,3288 (0,2188–0,4553)	0,0047 (0,0030–0,0098) 0,2035 (0,1341–0,3255)*, #
Кол-во тромбоцитов с экспонированным фосфатидилсерином (прокоагулянтная форма), %: – до активации – после активации	3,1 (1,8–4,5) 12,7 (10,3–18,9)	4,8 (2,5–6,9) 15,3 (9,4–22,5)	4,8 (2,7–11,8) 12,4 (6,7–24,4)
Количество GPIIb/IIIa (CD41), усл. ед.: – до активации – после активации	45930,6 (42551,1–54872,5) 91879,7 (85885,4–98569,3)	51560,0 (48748,6–58486,0) 96507,3 (88157,9–100368,6)	50018,0 (45365,4–54172,9) 92584,8 (89513,7–98195,9)
Отношение количества GPIIb/IIIa (CD41) к прямому светорассеянию FSC, отн. ед.: – до активации – после активации	1,145 (1,069–1,292) 2,829 (2,684–3,032)	1,238 (1,169–1,437) 2,954 (2,889–3,195)	1,066 (0,958–1,181) 2,581 (2,486–2,720)#
Дегрануляция плотных (δ) гранул (CD63), усл. ед.: – до активации – после активации	284,9 (198,9–420,6) 2751,7 (2118,9–3085,1)	286,7 (238,5–397,9) 2313,8 (2025,8–2865,2)*	339,2 (187,8–436,8) 3030,9 (2319,9–3197,6)
Дегрануляция α-гранул (CD62P), усл. ед.: – до активации – после активации	118,3 (87,4–223,4) 4539,6 (3749,7–4733,7)	138,4 (111,4–201,2) 4525,5 (4192,0–4880,9)	129,6 (72,7–154,3) 4879,2 (4128,8–5106,1)

Примечания: * достоверность различий по сравнению с контрольной группой детей без нарушений свертывания $p<0,05$ (критерий Манна – Уитни); # достоверность различий по сравнению с группой детей без нарушений свертывания $p<0,05$ (критерий Манна – Уитни).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленное нами увеличение по сравнению с контролем показателей прямого и бокового светорассеяния в группе детей со снижением показателей импедансной агрегатометрии и клиникой геморрагического синдрома согласуется с данными, приведенными D.M. Polokhov et al. (2021) [9]. Авторы показали, что в группе из 50 детей с неуточненным геморрагическим синдромом у 19 человек (38%) наблюдалось увеличение гранулярности (SSC) и размеров (FSC) тромбоцитов.

Активация тромбоцитов сопровождается запуском процессов внутриклеточной сигнализации, в результате которых основной адгезионный рецептор клеток



GP1Ib/IIIa переходит в активированную форму, что позволяет тромбоцитам связывать фибриноген и формировать тромбоцитарные агрегаты, независимо от свойств иницирующего агента. Методом импедансной агрегатометрии у детей третьей группы с геморрагическим синдромом выявлено снижение агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, коллагеном, арахидоновой кислотой, активацией рецепторов к тромбину. При использовании перечисленных индукторов конечный результат зависел от количества и функционального состояния рецептора фибриногена. Анализ общего количества рецептора GP1Ib/IIIa, экспонированного на мембране тромбоцитов, не выявил достоверных различий между группами. Однако при нормировании количества рецептора на размер тромбоцитов (FSC) выявлено достоверное снижение анализируемого параметра при активации в группе со сниженной агрегацией и гемсиндромом. Еще одним мембранным рецептором тромбоцитов, отвечающим за их адгезию к субэндотелиальному матриксу при взаимодействии субъединицы GPIb (CD42b) с фактором Виллебранда, а также их активацию, является GPIb-IX-V. Исследование с помощью проточной цитометрии количества данного рецептора на мембране тромбоцитов не выявило различий между анализируемыми группами. Однако при нормировке данного параметра на размер тромбоцитов в отсутствие активации обнаружено достоверное снижение данного параметра в группе детей со сниженной агрегацией и гемсиндромом. Утрата корреляционной связи между экспонированием рецепторов GP1Ib/IIIa и GPIb (CD42b) с одной стороны и потерей агрегационной активности, индуцированной агонистами, – с другой подтверждала тромбоцитопатию неуточненного генеза как причину геморрагического синдрома.

Согласно литературным данным, нарушения дегрануляции плотных гранул могут быть одной из причин нарушений функций тромбоцитов и, как следствие, проявлений геморрагического синдрома. Зачастую такие нарушения не выявляются при стандартном анализе агрегационной активности тромбоцитов и требуют дополнительных исследований [3–6]. Так, Nieuwenhuis H.K. с соавторами (1987) показали, что в группе из 106 пациентов с дефицитом плотных гранул в 23% случаев отсутствовали отклонения в агрегации тромбоцитов [10]. В данном исследовании достоверных различий в процессах дегрануляции тромбоцитов между анализируемыми группами обнаружено не было, однако стоит отметить тенденцию к снижению параметра, характеризующего дегрануляцию δ -гранул у детей с гемсиндромом без выявленных нарушений агрегации тромбоцитов.

Одним из важнейших проявлений функциональной активности тромбоцитов является способность формировать прокоагулянтную поверхность за счет экспонирования на внешней поверхности мембраны фосфатидилсерина [11–13]. На такой поверхности посредством кальциевых мостиков осуществляется сборка комплексов теназы и протромбиназы, на порядки ускоряющих реакции свертывания крови в сосудистом русле [14, 15]. Однако только часть тромбоцитов при активации формируют прокоагулянтную поверхность [16]. Тем не менее, данный механизм важен для нормального функционирования системы гемостаза. Прокоагулянтные тромбоциты характеризуются высоким содержанием фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны (маркер Annexin V) и сниженным количеством активированной формы рецептора GP1Ib/IIIa, что позволяет легко выявлять данную популяцию методом проточной цитометрии. Как следует из полученных нами данных, статистически значимых различий по анализируемым показателям между контрольной группой и группами пациентов с геморрагическим синдромом выявлено не было.

На основании полученных данных можно заключить, что для выявления причин геморрагического синдрома невыясненного генеза, обусловленного тромбоцитопатией, у детей основными показателями, оцениваемыми с помощью проточной цитометрии, являются: снижение количества и степени активации рецептора GPIIb/IIIa, а также снижение количества адгезионного рецептора GPIb. Сравнительный анализ эффективности импедансной и оптической агрегатометрии показал, что в ряде случаев метод Борна не всегда позволяет выявить функциональный дефект кровяных пластинок. Поэтому при наличии доказанной клиники геморрагического синдрома исследование должно быть дополнено импедансным методом с использованием стандартных и валидированных наборов реагентов. Для уточнения возможного механизма развития геморрагического синдрома возникает необходимость дополнительного привлечения методов проточной цитометрии. Без генетического исследования возможность идентифицировать диагноз представляется не всегда. В тех случаях, когда гематологические причины кровотечения не выявлены, следует обращаться за консультацией к специалистам, в чьей компетенции находится локализация источника кровотечения, и использовать различные лекарственные средства с учетом клинической ситуации. По мнению ряда исследователей, на долю кровотечений неустановленной природы может приходиться до половины всех обращений родителей, чьи дети жалуются на повышенную склонность к геморрагиям [5, 9].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все пациенты с жалобами на повышенную кровоточивость нуждаются в тщательном сборе анамнеза с использованием опросника и оценкой выраженности гемсиндрома по стандартизированной шкале. Кроме анализа плазменного звена свертывания крови обязательно исследуют агрегационную активность тромбоцитов с использованием оптического и импедансного метода агрегатометрии. Для уточнения ведущего механизма геморрагического синдрома выполняют оценку функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders. *Int J Lab Hem*. 2018;8(40; Suppl 1):34–45.
2. Collins PW, Hamilton M, Dunstan FD. Patterns of bruising in preschool children with inherited bleeding disorders: a longitudinal study. *Arch Dis Child*. 2017;102:1110–7.
3. Soheilifar J, Ahmadi M, Ahmadi M. Prevalence and location of petechial spots in well infants. *Arch Dis Child*. 2010;95:518–20.
4. Lambert M.P. Inherited Platelet Disorders: A Modern Approach to Evaluation and Treatment. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2019;33(3):471–87. doi: 10.1016/j.hoc.2019.01.008.
5. Fedorova D.V., Zharkov P.A., Ignatova A.A. Diagnostics of inherited functional platelet disorders (IFPD) in children: correlations between results of flow cytometry, clinical phenotype and results of light transmission Aggregometry. *Pediatric Hematology, Oncology and Immunology*. 2018;17(1):16–22.
6. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *JTH*. 2010;8(9):2063–2065.
7. Andrew M., Vegh P., Johnston M. Maturation of the Hemostatic System During Childhood. *Blood*. 1992;80(8):1998–2005.
8. Toulon P, Berruyer M, Brionne-Francois M. Age dependency for coagulation parameters in paediatric populations. *Thrombosis and haemostasis*. 2016;116(1):9–17.
9. Polokhov D.M. Specificities of the storage pool and morphology of platelets in children with unspecified hemorrhagic syndrome. *Pediatric Hematology Oncology and Immunopathology*. 2021;20(1):58–65.
10. Nieuwenhuis H.K., Akkerman J.-W.N., Sixma J.J. Patients With a Prolonged Bleeding Time and Normal Aggregation Tests May Have Storage Pool Deficiency: Studies on One Hundred Six Patients. *Blood*. 1987;70(3):620–623.
11. Ambrosio A.L., Di Pietro S.M. Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis. *Platelets*. 2017;28(2):138–146.
12. Chu Y. Procoagulant platelets: Generation, characteristics, and therapeutic target. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021;35(5):E23750.
13. Dale George L. Procoagulant Platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017;37(9):1596–1597.
14. Podoplelova N.A. Procoagulant Platelets: Mechanisms of Generation and Action. *Hämostaseologie*. 2012;41(2):146–153.
15. Kempton C.L. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(4):861–866.
16. London F.S., Marcinkiewicz M., Walsh P.N. A subpopulation of platelets responds to thrombin- or SFLLRN-stimulation with binding sites for factor IXa. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(19):19854–19859.