



Шамова Е.В.¹✉, Кохан А.Ю.¹, Лукьяненко Л.М.¹, Дмитриев В.В.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

Исследование структурно-функционального состояния тромбоцитов методом проточной цитометрии и значимость его использования в диагностике геморрагического синдрома невыясненного генеза

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция, дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ данных, написание текста – Шамова Е.В.; дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ данных, редактирование – Кохан А.Ю.; дизайн исследования, анализ данных, редактирование – Лукьяненко Л.М.; концепция, дизайн исследования, сбор материала, проведение экспериментов, анализ данных, редактирование – Дмитриев В.В.

Финансирование: исследование выполнено в рамках подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии» Государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» на 2021–2025 гг.

Подана: 25.04.2024

Принята: 31.07.2024

Контакты: lubakova@gmail.com

Резюме

Введение. Среди пациентов с геморрагическим синдромом можно выделить группу лиц, для которых характерно отсутствие нарушений со стороны плазменного звена гемостаза. В данной работе для выяснения причин геморрагического синдрома невыясненного генеза у детей исследована функциональная активность тромбоцитов методом проточной цитометрии.

Цель. Оценить параметры функциональной активности тромбоцитов у детей с геморрагическим синдромом невыясненного генеза методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. В исследование включены 35 детей с проявлениями геморрагического синдрома, в том числе 15 – с нарушением агрегации тромбоцитов и 20 – без нарушений (по данным оптической и импедансной агрегатометрии). У всех детей были исключены нарушения плазменного звена свертывания крови. Анализ функционального состояния тромбоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченных аннексина V и антител к CD41, PAC-1, CD42b, CD62P, CD63.

Результаты. В группе пациентов с геморрагическим синдромом и сниженной агрегацией при активации тромбоцитов установлено достоверное увеличение (по отношению к контрольной группе) их размеров (FSC) и гранулярности (SSC), снижение общего количества мембранного рецептора GPIIb/IIIa (CD41) и его активированной формы (PAC-1). В отсутствие активации тромбоцитов в данной группе обнаружено достоверное снижение количества адгезионного рецептора GPIb (CD42b). В группе пациентов с сохраненной агрегацией у 12 из 15 обследуемых выявлено



значительное снижение дегрануляции плотных гранул при активации по сравнению с показателями контрольной группы пациентов.

Заключение. Проточная цитометрия является информативным инструментом анализа функционального состояния тромбоцитов и выявления причин их дисфункций. Наличие неидентифицированной тромбоцитопатии у пациентов с клиническими проявлениями геморрагического синдрома при отсутствии нарушений со стороны плазменного звена является поводом для расширения объема исследований с использованием проточной цитометрии.

Ключевые слова: тромбоциты, геморрагический синдром, агрегатометрия, проточная цитометрия, тромбоцитопатия

Ekaterina V. Shamova¹✉, Anatoly U. Kokhan¹, Liudmila M. Lukyanenka¹, Vyacheslav V. Dmitriev²

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

² Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Study of Platelets Structural and Functional State by Flow Cytometry and the Significance of Its Use in Hemorrhagic Syndrome of Unknown Genesis Diagnosis

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept, study design, experiments conducting, data analysis, text writing – Ekaterina V. Shamova; study design, experiments conducting, data analysis, editing – Anatoly U. Kokhan; study design, data analysis, editing – Liudmila M. Lukyanenka; concept, study design, material collecting, experiments conducting, data analysis, editing – Vyacheslav V. Dmitriev.

Funding: the study was supported by the state program "Knowledge-intensive technologies and equipment" 2021–2025, the subprogram 1 "Innovative biotechnologies".

Submitted: 25.04.2024

Accepted: 31.07.2024

Contacts: lubakova@gmail.com

Abstract

Introduction. Among patients with hemorrhagic syndrome, a group can be distinguished characterizing by the absence of plasma hemostatic system disorders. In this work, to elucidate the causes of hemorrhagic syndrome of unknown origin in children, the functional activity of platelets was studied using flow cytometry.

Purpose. To evaluate parameters of platelet functional activity in children with hemorrhagic syndrome of unknown origin using flow cytometry.

Materials and methods. In this study 35 children with manifestations of hemorrhagic syndrome were involved, including 15 with platelet aggregation disorders and 20 without disorders (according to optical and impedance aggregometry). Plasma coagulation disorders were excluded in all children. Analysis of platelet functional state was performed by flow cytometry using fluorescently labeled Annexin V and antibodies to CD41, PAC-1, CD42b, CD62P, and CD63.

Results. In the group of patients with hemorrhagic syndrome and reduced aggregation a significant increase in platelet size (FSC) and granularity (SSC) and a decrease in the total amount of membrane receptor GPIIb/IIIa (CD41) and its activated form (PAC-1) compared to control group was found during platelet activation. In the absence of platelet activation, a significant decrease in the amount of platelet adhesion receptor GPIb (CD42b) was found in these patients. In the group of patients with preserved aggregation, a significant decrease in degranulation of dense granules upon activation was found in 12 of 15 subjects compared to the control group.

Conclusion. Flow cytometry is an informative tool for analyzing platelet functional activity and identifying the causes of their dysfunction. The presence of unidentified thrombocytopeny in patients with clinical manifestations of hemorrhagic syndrome in the absence of plasma disorders is a reason to expand the scope of studies using flow cytometry.

Keywords: platelets, hemorrhagic syndrome, aggregometry, flow cytometry, thrombocytopeny

■ ВВЕДЕНИЕ

Геморрагические синдромы – обширная группа патологических состояний, характеризующихся повышенной кровоточивостью. У детей геморрагический синдром наиболее часто проявляется в форме носовых кровотечений, экхимозов, петехиальной сыпи. Причины геморрагического синдрома включают в себя врожденные либо приобретенные нарушения системы свертывания крови, тромбоцитопатии различного генеза, системные заболевания, поражения костного мозга. Своевременное выяснение причин повышенной кровоточивости является актуальной задачей, так как необходимо для выбора правильного подхода к лечению и предотвращения возможных осложнений.

Среди пациентов с геморрагическим синдромом можно выделить группу, для которой характерно отсутствие нарушений со стороны плазменного звена гемостаза. Причиной появления кровоточивости в данной группе может быть наличие наследственных либо приобретенных тромбоцитопатий. Таких пациентов, как правило, сложно отличить от здоровых детей, так как дебют выраженных геморрагических проявлений может наблюдаться в более позднем возрасте. Кроме того, большинство детей младшего возраста еще не сталкивалось с хирургическим вмешательством, при котором наличие дисфункций тромбоцитов могло бы проявиться в повышенной кровоточивости, а также стать причиной серьезных осложнений.

Стандартным тестом на анализ функциональной активности тромбоцитов является исследование агрегации тромбоцитов методом оптической и импедансной агрегатометрии. Однако данные методы не всегда позволяют выявить дисфункции тромбоцитов [1–3]. Кроме того, для проведения таких тестов необходимо около 3–4 мл цельной крови, что может быть затруднительно при анализе функциональной активности тромбоцитов у детей первых месяцев жизни. Недостатками методов агрегатометрии также являются их высокая трудоемкость, продолжительность исследования и вероятность получения артефактов из-за особенностей пробоподготовки (нежелательна активация тромбоцитов при центрифугировании для турбодиметрического анализа).



Одним из перспективных направлений исследования структурно-функционального состояния тромбоцитов, обладающим высокой информативностью и исключающим недостатки перечисленных методов, является проточная цитометрия. Данный метод позволяет анализировать морфологию, гранулярный аппарат, формирование прокоагулянтной поверхности, количество, а также активационный статус адгезионных рецепторов тромбоцитов. Сравнение данных проточной цитометрии интактных и активированных тромбоцитов дает необходимую информацию о наличии или отсутствии дефектов как поверхностных белков и фосфолипидов, так и внутритромбоцитарных гранул, содержащих пул белков и низкомолекулярных веществ, участвующих не только в процессах свертывания крови, но и в поддержании целостности и функционирования эндотелия сосудов.

В данной работе для выяснения причин геморрагического синдрома невыясненного генеза у детей в дополнение к стандартным тестам (коагуляционные тесты, оптическая и импедансная агрегатометрия) исследовано структурно-функциональное состояние тромбоцитов методом проточной цитометрии.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить параметры функциональной активности тромбоцитов у детей с геморрагическим синдромом невыясненного генеза методом проточной цитометрии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие реактивы и растворы: моноклональные антитела анти-CD42b-PerCP (BioLegend, США); анти-CD41-PerCP/Cy5.5 (Elabscience, США); анти-РАС-1-FITC (EXBIO, Чехия); анти-CD63-FITC (EXBIO, Чехия); анти-CD62P-APC (EXBIO, Чехия); Annexin V-APC (Elabscience, США); АДФ (Glentham Life Sciences, Великобритания; Sigma, США; Dynabyte medical, Германия), TRAP-6 (SFFLRN, Sigma-Aldrich, США), PAR4-AP (AYPGKF, Cayman Chemical, США); гидрохлорид адреналина (Sigma, США), коллаген (Dynabyte medical, Германия), арахидоновая кислота (Dynabyte medical, Германия), контрольная плазма для оценки коагуляционных показателей (Instrumentation Laboratory, США); буферный раствор 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).

В исследование включены 35 детей, чьи родители обратились в Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦ ДОГиИ) по поводу кровотечений в анамнезе у детей с целью выявления гематологической причины кровотечения. Наиболее часто имели место носовые кровотечения (n=27), ювенильное маточное кровотечение (n=3), обильные экхимозы на коже ног и туловища (n=2). Симптомы кровоточивости оценивали по шкале ISTH BAT.

Обследование детей включало в себя исследование свертывания крови: регистрацию активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), протромбинового времени с расчетом активности факторов протромбинового комплекса и международного нормализованного отношения (МНО), тромбоинового времени, определение содержания плазменного фибриногена, коагулируемого тромбином; анализ агрегационной активности тромбоцитов с помощью оптической агрегатометрии (степень и скорость агрегации) и импедансной агрегатометрии (площадь

под агрегационной кривой, степень и скорость агрегации). Агрегацию тромбоцитов индуцировали АДФ, ацетилсалициловой кислотой, коллагеном и адреналином.

Взятие крови осуществляли путем пункции периферической вены без наложения жгута с использованием вакутайнера. Венозную кровь стабилизировали 3,8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 и использовали для оценки агрегационной активности тромбоцитов импедансным методом, проведения исследований с использованием проточного цитометра. Оставшуюся часть стабилизированной крови центрифугировали 10 минут с ускорением 200 g для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). Часть ОТП использовали для исследования агрегационных свойств тромбоцитов турбидиметрическим методом, оставшуюся часть ОТП центрифугировали при 2000 g в течение 10 минут для получения бедной тромбоцитами плазмы (БТП), которую использовали для оценки плазменного звена свертывания крови.

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 детей выделены две группы: пациенты с нарушениями агрегации тромбоцитов, выраженными в разной мере (n=15), и пациенты без нарушений агрегационной активности тромбоцитов (n=20).

Таблица 1
Характеристика пациентов выделенных групп (Me (10–90) %%)
Table 1
Characteristics of selected groups patients (Me (10–90) %%)

Анализируемый признак	Выделенные группы		
	Контроль	Гем. синдром в анамнезе	
	Дети без гем. синдрома, n=17	Без нарушений агрегации тромбоцитов, n=20	С нарушениями агрегации тромбоцитов, n=15
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	26	20	15
– средней тяжести	0	0	0
– тяжелое	0	0	0
Мужчины/женщины, число	8/18	10/10	7/6
Тяжесть геморрагических проявлений по шкале ISTH VAT	0	1–3	1–3
Прием лекарственных средств, влияющих на свертывание, число детей	0	0	0
Предшествовали трансфузии препаратов крови, число пациентов	0	0	0
Гемоглобин крови, г/л	132,0 (118,0–146,0)	132,0 (119,0–148,0)	130,0 (120,0–142,0)
Эритроциты крови, 10 ¹² /л	4,9 (4,2–5,5)	4,7 (4,0–5,2)	4,7 (4,5–4,8)
Скорость оседания эритроцитов, мм/час	6,0 (3,0–14,0)	5,5 (4,0–12,0)	9,0 (7,0–12,0)
Лейкоциты крови, 10 ¹² /л	6,4 (5,0–8,7)	6,4 (4,6–9,6)	5,5 (4,7–8,5)
Гранулоциты крови, 10 ¹² /л	2,7 (1,5–4,7)	3,0 (2,0–6,6)	2,7 (1,9–6,3)



В качестве контрольной группы в исследование включены 17 соматически здоровых детей, обратившихся в государственное учреждение «РНПЦ ДОГИИ» для планового обследования. Поводом для обследования 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 были включены в группу условного контроля для здоровых детей без нарушений свертывания крови (первая группа). Лекарственные средства, влияющие на плазменное звено свертывания крови и агрегационную активность тромбоцитов, пациенты данной группы не получали.

Характеристика условно здоровых детей и пациентов представлена в табл. 1. Показатели свертывания крови и агрегации тромбоцитов в выделенных группах приведены в табл. 2 и 3 соответственно.

Анализ функциональной активности тромбоцитов проводили с помощью точного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter, США).

Для активации тромбоцитов готовили смесь агонистов в буфере Тироде (БТ), содержащую АДФ (20 мкМ), TRAP-6 (160 мкМ), PAR4-AP (160 мкМ). 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 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).

Таблица 2
Показатели свертывания крови у пациентов в выделенных группах (Ме (10–90) %%)
Table 2
Blood coagulation indices in selected groups patients (Me (10–90) %%)

Анализируемый признак	Выделенные группы		
	Контроль	Гем. синдром в анамнезе	
	Дети без гем. синдрома, 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)	37,2 (26,9–41,6)	38,1 (32,4–51,0)
Отношение АПТВ пациента / АПТВ в контроле, ед.	0,95 (0,88–1,16)	1,04 (0,76–1,17)	1,03 (0,91–1,44)
Протромбиновое время, с.	14,3 (13,0–17,3)	14,2 (12,8–15,6)	15,5 (14,0–16,5)
Международное нормализованное отношение, ед.	1,09 (0,98–1,31)	1,10 (0,96–1,19)	1,15 (1,06–1,26)
Активность факторов протромбинового комплекса, %	88,0 (67,0–103,0)	86,1 (76,5–105,5)	82,3 (71,0–91,0)
Тромбиновое время (ТВ), с.	18,0 (16,6–19,6)	18,0 (17,0–18,6)	17,6 (17,2–18,5)
Отношение ТВ пациента / ТВ в контроле, ед.	0,87 (0,78–0,97)	0,88 (0,81–0,92)	0,85 (0,84–0,92)
Фибриноген, г/л	2,6 (2,1–3,7)	2,6 (2,2–3,8)	2,6 (2,2–3,0)
Фактор Виллебранда, %	144,5 (64,0–147)	99,3 (65,0–146,0)	120,1 (72,5–141)
Активность фактора Виллебранда, %	149,0 (61,0–159,0)	91,0 (58,0–152,0)	117,3 (79,0–140,0)

Таблица 3
Показатели агрегации тромбоцитов у пациентов в выделенных группах (Me (10–90) %%)
Table 3
Indicators of platelet aggregation in selected groups patients (Me (10–90) %%)

Анализируемый признак	Выделенные группы		
	Контроль	Гем. синдром в анамнезе	
	Дети без гем. синдрома, n=17	Без нарушений агрегации тромбоцитов, n=20	С нарушениями агрегации тромбоцитов, n=15
Тромбоциты периферической крови, $\times 10^9/\text{л}$	250,0 (219,0–342,0)	306,0 (202,0–404,0)	236,0 (141,0–313)
Агрегация тромбоцитов с индуктором: АДФ (конечная концентрация) $2,5 \times 10^{-6}$ моль/л: – степень максимальной агрегации, % – скорость агрегации, %/мин	73,0 (51,7–87,0) 72,0 (54,0–86,4)	75,3 (51,0–89,0) 71,3 (42,0–90,0)	69,0 (55,0–79,0) 66,0 (54,0–78,0)
Агрегация тромбоцитов с индуктором: гидрохлорид адреналин $5,0 \times 10^{-6}$ моль/л: – степень максимальной агрегации, % – скорость агрегации, %/мин	83,2 (71,6–96,0) 24,2 (8,6–50,0)	85,0 (62,0–98,0) 32,0 (11,0–61,0)	79,0 (20,0–88,0)* 14,4 (4,0–67,0)*
Агрегация тромбоцитов с активатором рецепторов к АДФ $6,5 \times 10^{-6}$ моль/л: – площадь под кривой, АУхмин – степень агрегации, АУ – скорость, АУ/мин	49,0 (28,0–64,0) 88,3 (50,0–106,0) 10,4 (8,3–17,1)	57,0 (36,0–75,0) 96,0 (62,0–129,0) 12,8 (8,7–18,0)	35,0 (11,0–63,0)* 54,0 (25,0–105,0)* 8,0 (3,0–14,0)
Агрегация тромбоцитов с арахидоновой кислотой: – площадь под кривой (AUC), Е мин – степень агрегации, АЕ – скорость агрегации, АЕ/мин	51,5 (38,0–74,0) 87,1 (68,0–122,0) 12,4 (9,4–18,5)	52,5 (27,0–76,0) 84,0 (41,0–125,0) 13,7 (7,0–19,8)	43,0 (11,0–55,0)* 72,0 (33,8–98,6) 10,0 (5,0–14,0)
Агрегация тромбоцитов с активатором рецепторов к коллагену: – площадь под кривой, АУхмин – степень агрегации, АУ – скорость, АУ/мин	34,5 (14,0–48,0) 76,0 (40,0–105,0) 9,0 (5,0–13,0)	39,0 (19,0–53,0) 79,0 (60,0–109,0) 9,1 (6,4–13,9)	14,0 (10,0–31,0)* 43,1 (29,6–63,0)* 5,0 (4,0–9,0)*
Агрегация тромбоцитов с активатором рецепторов к тромбину: – площадь под кривой, АУхмин – степень агрегации, АУ – скорость, АУ/мин	69,0 (56,0–86,0) 110,0 (86,0–134) 19,0 (15,0–26,0)	74,0 (60,0–87,0) 108,0 (91,7–126,4) 21,0 (16,0–32,6)	75,0 (34,0–91,0) 109,0 (54,0–142,0) 20,0 (8,0–27,0)
Агрегация тромбоцитов ристомидином (концентрация) 1,5 мг/мл: – степень максимальной агрегации, % – скорость агрегации, %/мин	75,8 (49,2–77,7) 27,3 (8,6–74,0)	– –	61,0 (15,0–91,0) 18,0 (9,0–31,0)

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

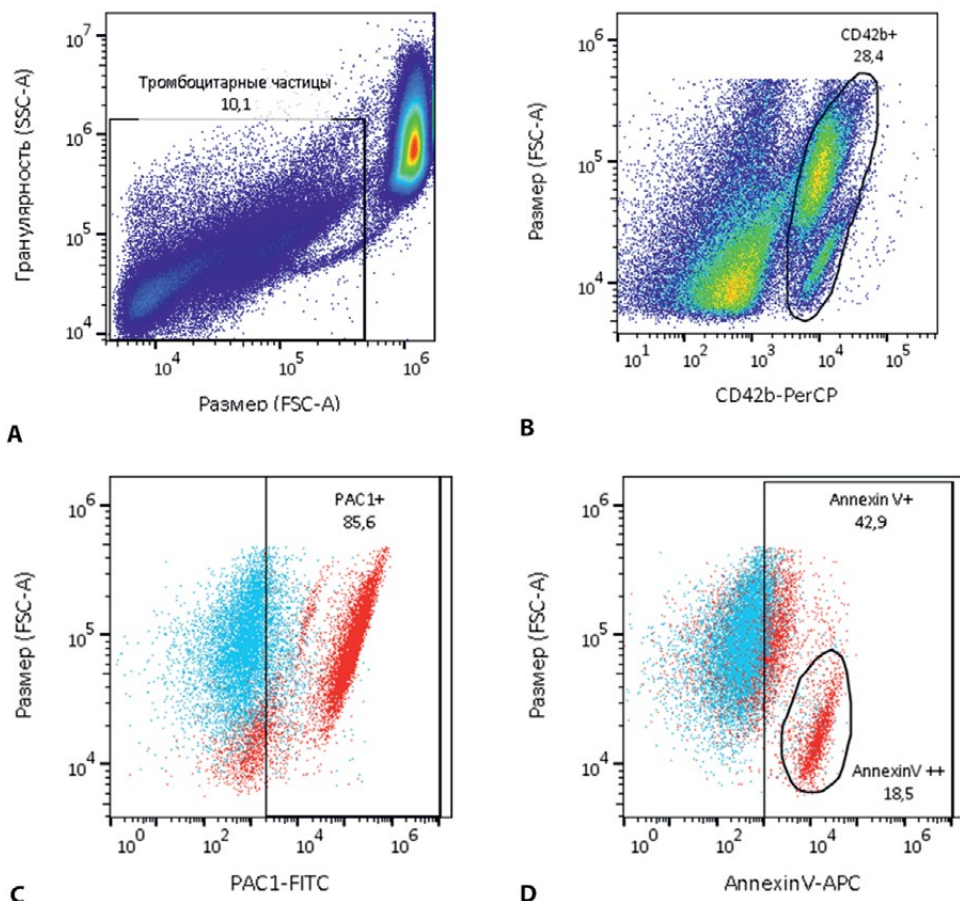


Рис. 1. Типичные диаграммы светорассеяния и флуоресценции, получаемые при анализе периферической венозной крови методом проточной цитометрии с использованием панели антител П I

Fig. 1. Typical light scattering and fluorescence patterns obtained from peripheral venous blood analysis by flow cytometry using an antibodies PI panel

Стабилизированную венозную кровь разбавляли БТ в 20 раз (для анализа с помощью П I–II) или в 12 раз (для анализа с помощью П III). 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 меченных 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 (рис. 1А), 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 (рис. 1В). Затем выделенную область тромбоцитов анализировали на маркеры активации PAC-1 (рис. 1С), FC (рис. 1D), 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 6.0 и Origin 9.8. Количественные показатели описательной статистики представлены в виде медианы с интерквартильными размахами (10-й – 90-й перцентили) либо (25-й – 75-й перцентили), среднего \pm стандартное отклонение. Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен сравнительный анализ показателей функциональной активности тромбоцитов контрольной группы ($n=17$, возраст 8,0 (1,0–16,0) года) и пациентов с геморрагическим синдромом. В группе пациентов с геморрагическим синдромом выделены 2 подгруппы:

- 1) пациенты со сниженной агрегацией тромбоцитов, у которых выявлены нарушения в показателях агрегации тромбоцитов ($n=15$, возраст 9,0 (6,0–17,0)) методом оптической и импедансной агрегометрии (АДФ, адреналин, ристомицин, арахидоновая кислота, коллаген);
- 2) пациенты с сохраненной агрегацией ($n=20$, возраст 10,0 (5,0–14,5)).

Функциональную активность тромбоцитов измеряли с помощью проточной цитометрии и оценивали по ряду параметров: размеры (FSC), гранулярность (SSC), количество рецепторов GPIIb/IIIa (CD41) и GPIb (CD42b), дегрануляция α -гранул (CD62P) и δ -гранул (CD63), активационный статус рецептора GPIIb/IIIa (PAC-1), количество гетероагрегатов тромбоцитов и лейкоцитов. Полученные данные приведены в табл. 4.

Установлено достоверное увеличение относительно контрольной группы размеров тромбоцитов (FCS) как в отсутствие, так и при активации в группе детей с геморрагическим синдромом и сниженной агрегацией (табл. 4). Также обнаружено повышение гранулярности (SSC) в данной группе в условиях активации (табл. 4). Полученные результаты согласуются с данными работы [4], в которой показано, что в группе из 50 детей с неуточненным геморрагическим синдромом у 19 человек (38%) наблюдалось увеличение гранулярности (SSC) и размеров (FSC) тромбоцитов при снижении их общего количества в крови. Авторы предположили, что данные отклонения могут быть связаны с повышенным темпом клиренса тромбоцитов подобно тому, как это происходит у пациентов с иммунной тромбоцитопенией [5].

Анализ общего количества рецептора GPIIb/IIIa, экспонированного на мембране тромбоцитов, не выявил достоверных различий между группами (рис. 2А, В). Однако при нормировании количества рецептора на размер тромбоцитов (FSC) выявлено



Таблица 4
Показатели функционального состояния тромбоцитов, полученные при анализе методом проточной цитометрии
Table 4
Indicators of platelet functional state obtained by flow cytometry

Анализируемый признак	Выделенные группы		
	Контроль	Гем. синдром в анамнезе	
	Дети без гем. синдрома, n=17	Без нарушений агрегации тромбоцитов, n=20	С нарушениями агрегации тромбоцитов, 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 GPIIb (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 GPIIb (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)*
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 фосфатидилсеринем (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)

Окончание таблицы 4

Анализируемый признак	Выделенные группы		
	Контроль	Гем. синдром в анамнезе	
	Дети без гем. синдрома, n=17	Без нарушений агрегации тромбоцитов, n=20	С нарушениями агрегации тромбоцитов, n=15
Отношение количества GPIIb/IIIa (CD41) к прямому светорассеянию FSC, отн. ед.:			
– до активации	1,145 (1,069–1,292)	1,238 (1,169–1,437)	1,066 (0,958–1,181)
– после активации	2,829 (2,684–3,032)	2,954 (2,889–3,195)	2,581 (2,486–2,720)
Дегрануляция плотных (δ) гранул (CD63), усл. ед.:			
– до активации	284,9 (198,9–420,6)	286,7 (238,5–397,9)	339,2 (187,8–436,8)
– после активации	2751,7 (2118,9–3085,1)	2313,8 (2025,8–2865,2)	3030,9 (2319,9–3197,6)
Дегрануляция α-гранул (CD62P), усл. ед.:			
– до активации	118,3 (87,4–223,4)	138,4 (111,4–201,2)	129,6 (72,7–154,3)
– после активации	4539,6 (3749,7–4733,7)	4525,5 (4192,0–4880,9)	4879,2 (4128,8–5106,1)

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

достоверное снижение анализируемого параметра при активации в группе со сниженной агрегацией (рис. 2D).

Активация тромбоцитов сопровождается запуском процессов внутриклеточной сигнализации, в результате которых основной адгезионный рецептор клеток GPIIb/IIIa переходит в активированную форму, что позволяет тромбоцитам связывать фибриноген и формировать тромбоцитарные агрегаты. На рис. 3 приведены результаты анализа данного параметра (активированная форма GPIIb/IIIa – PAC-1) для исследуемых групп. Установлено значительное снижение данного показателя при активации для группы пациентов со сниженной агрегацией (рис. 3B). При нормировке данного показателя на параметр, характеризующий общее количество рецепторов GPIIb/IIIa (CD41), достоверность различий усиливалась (рис. 3D).

Еще одним мембранным рецептором тромбоцитов, отвечающим за их адгезию к субэндотелиальному матриксу при взаимодействии субъединицы GPIb (CD42b) с фактором Виллебранда, а также активацию, является GPIb-IX-V. Исследование с помощью проточной цитометрии количества данного рецептора на мембране тромбоцитов как в отсутствие, так и при активации не выявило различий между анализируемыми группами. Однако при нормировке параметра на размер тромбоцитов в отсутствие активации обнаружено достоверное снижение данного параметра в группе детей со сниженной агрегацией (табл. 4).

Далее был проведен анализ высвобождения содержимого внутриклеточных гранул (α- и δ- (плотных) гранул), которое происходит при активации тромбоцитов. В результате данного исследования не было выявлено достоверных отличий в дегрануляции α-гранул тромбоцитов между исследуемыми группами (рис. 4). Однако следует отметить, что у 12 из 15 обследуемых пациентов с сохраненной агрегацией дегрануляция плотных гранул при активации была значительно снижена относительно контрольной группы.

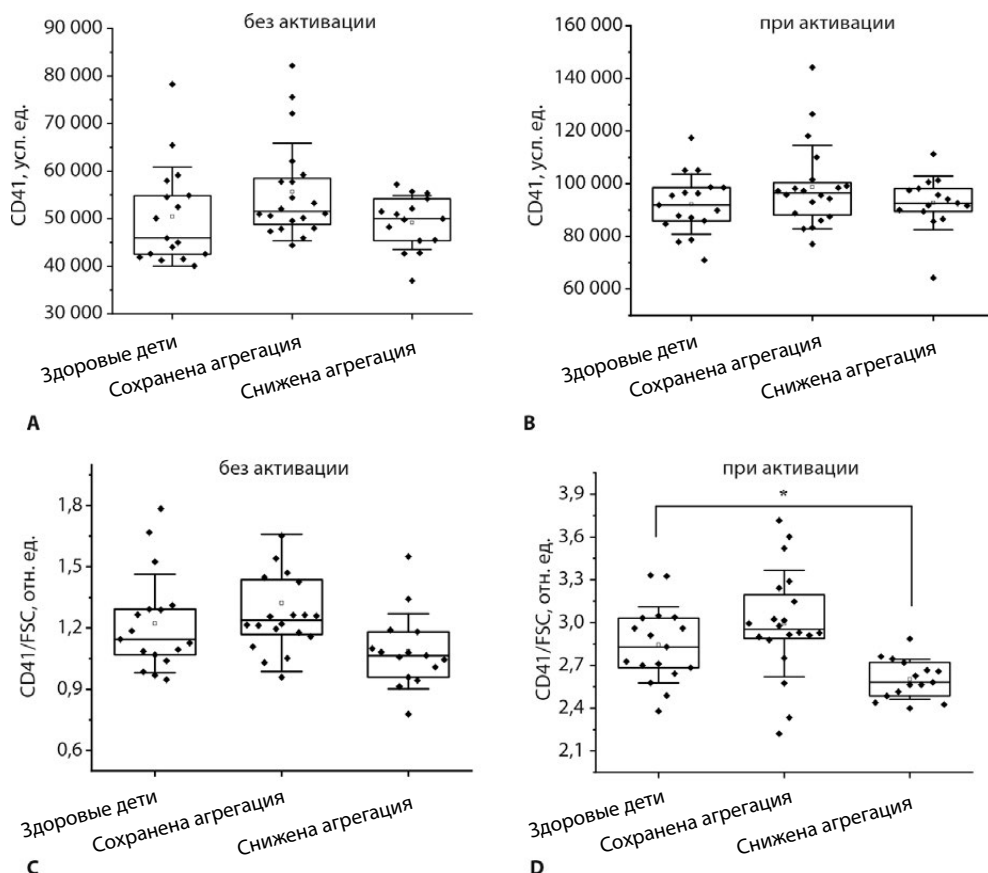


Рис. 2. Количество мембранного рецептора GPIIb/IIIa (маркер CD41) в группах контроля и геморрагического синдрома невыясненного генеза в отсутствие и при активации тромбоцитов. Количество GPIIb/IIIa оценивали по интенсивности флуоресценции антитела к CD41 (A, B) и нормированному на размер тромбоцитов показателю, рассчитываемому как отношение интенсивностей флуоресценции антитела к CD41 и прямого светорассеяния: CD41/FSC (C, D). Данные представлены в виде медианы с интерквартильными размахами [25-й процентиль; 75-й процентиль], стандартное отклонение

Примечание: * $p < 0,05$ (критерий Манна – Уитни).

Fig. 2. The amount of membrane receptor GPIIb/IIIa (CD41 marker) in both control and hemorrhagic syndrome of unknown origin groups without and with platelets activation. The amount of GPIIb/IIIa was assessed by the fluorescence intensity of anti-CD41 antibody (A, B) and by the value normalized by platelet size, calculated as fluorescence intensities of the anti-CD41 antibody and forward light scattering ratio: CD41/FSC (C, D). Data are presented as medians with interquartile ranges [25th percentile; 75th percentile], standard deviation

Согласно данным литературы, нарушения дегрануляции плотных гранул могут быть одной из причин нарушений функций тромбоцитов и, как следствие, проявлений геморрагического синдрома. Зачастую такие нарушения не выявляются

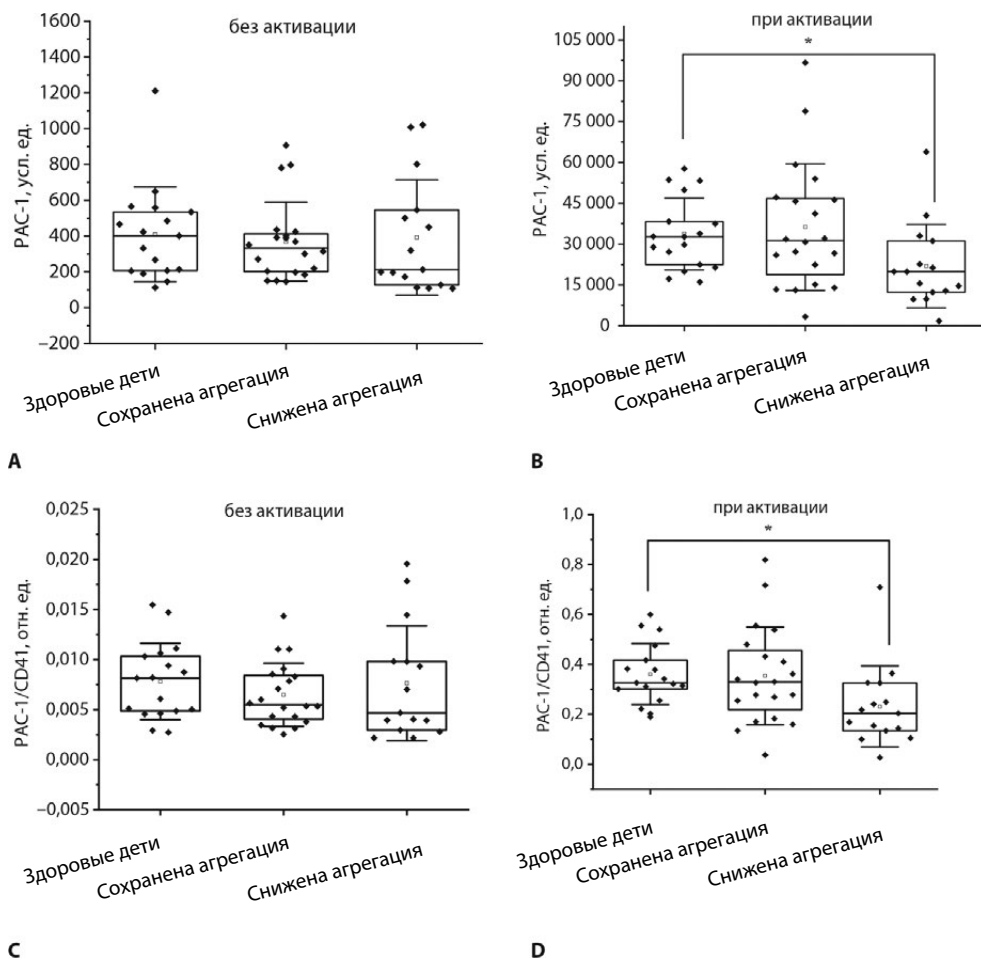


Рис. 3. Активация рецептора GPIIb/IIIa (маркер PAC-1) в группах контроля и геморрагического синдрома невыясненного генеза. Активацию GPIIb/IIIa оценивали по интенсивности флуоресценции антитела к PAC-1 (A, B) и нормированному на количество рецептора GPIIb/IIIa показателю, рассчитываемому как отношение интенсивностей флуоресценции антител антиPAC-1 и антиCD41: PAC-1/CD41 (C, D). Данные представлены в виде медианы с интерквартильными размахами [25-й процентиль; 75-й процентиль], стандартное отклонение

Примечание: * $p < 0,05$ (критерий Манна –Уитни).

Fig. 3. Activation of the GPIIb/IIIa receptor (PAC-1 marker) in both control and hemorrhagic syndrome of unknown origin groups. GPIIb/IIIa activation was assessed by fluorescence intensity of the anti-PAC1 antibody (A, B) and by the value normalized by GPIIb/IIIa indicator amount, calculated as fluorescence intensities of anti-PAC-1 and anti-CD41 antibodies ratio: PAC-1/CD41 (C, D). Data are presented as medians with interquartile ranges [25th percentile; 75th percentile], standard deviation

при стандартном анализе агрегационной активности тромбоцитов и требуют дополнительных исследований [3, 6–8]. Так, Nieuwenhuis H.K. с соавторами показали, что в группе из 106 пациентов с дефицитом плотных гранул в 23% случаев отсутствовали



отклонения в агрегации тромбоцитов [3]. В работе [4] у 38% из 50 детей с неутонченным геморрагическим синдромом обнаружены нарушения морфологии и пула хранения (α - и δ -гранул) тромбоцитов, что согласуется с представленными в настоящей работе данными.

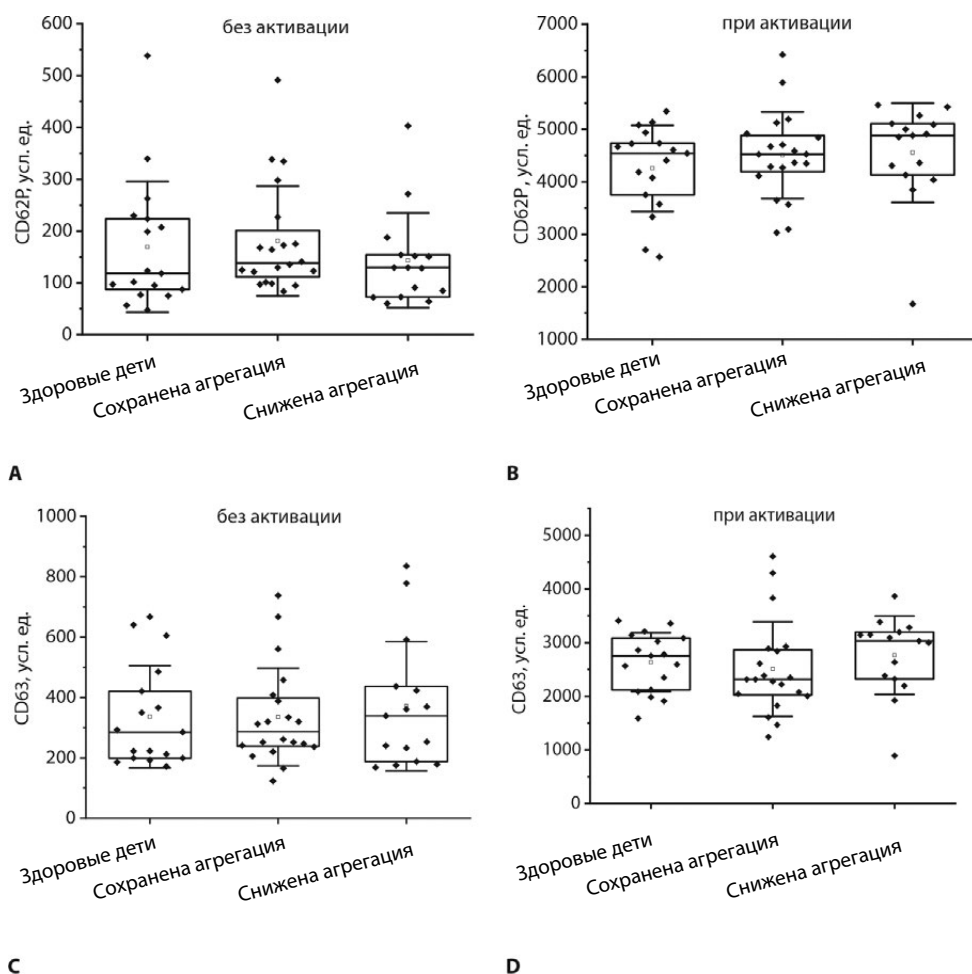


Рис. 4. Дегрануляция α - и δ -гранул тромбоцитов в группах контроля и геморрагического синдрома неясного генеза. Дегрануляцию α -гранул оценивали по интенсивности флуоресценции антитела к CD62P (A, B), дегрануляцию δ -гранул оценивали по интенсивности флуоресценции антитела к CD63 (C, D). Данные представлены в виде медианы с интерквартильными размахами [25-й перцентиль; 75-й перцентиль], стандартное отклонение

Fig. 4. Degranulation of platelets α - and δ -granules in both control and hemorrhagic syndrome of unknown origin groups. Degranulation of α -granules was assessed by fluorescence intensity of anti-CD62P (A, B) antibody, degranulation of δ -granules was assessed by fluorescence intensity of anti-CD63 (C, D) antibody. Data are presented as medians with interquartile ranges [25th percentile; 75th percentile], standard deviation

Одним из важнейших проявлений функциональной активности тромбоцитов является способность формировать прокоагулянтную поверхность за счет экспонирования на внешней поверхности мембраны фосфатидилсерина [9–11]. На такой поверхности посредством кальциевых мостиков осуществляется сборка комплексов теназы и протромбиназы, на порядки ускоряющих реакции свертывания крови в сосудистом русле [12–14]. Однако только часть тромбоцитов при активации формируют прокоагулянтную поверхность [15, 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 GPIIb/IIIa [15, 16], что позволяет легко выявлять данную популяцию методом проточной цитометрии. В табл. 4 приведены результаты по регистрации прокоагулянтных тромбоцитов как до, так и после их активации. Как следует из полученных данных, статистически значимых различий по анализируемому показателю между контрольной группой и группами пациентов с геморрагическим синдромом выявлено не было.

Далее был проведен корреляционный анализ измеряемых с помощью проточной цитометрии показателей, характеризующих функциональную активность тромбоцитов. В табл. 5 приведены основные корреляционные зависимости, позволяющие выявить отличия между анализируемыми группами.

Обнаружено, что в контрольной группе и в группе детей с геморрагическим синдромом и сохраненной агрегацией наблюдается положительная корреляционная зависимость между количеством рецептора GPIIb/IIIa, его активированной формой (PAC-1) и количеством рецептора GPIb на поверхности тромбоцитов, а также отрицательная корреляционная зависимость между количеством прокоагулянтных тромбоцитов и активацией GPIIb/IIIa, что согласуется с литературными данными, описывающими функциональный ответ тромбоцитов в норме [13, 16]. В группе со сниженной агрегацией данные корреляционные зависимости не наблюдались,

Таблица 5
Корреляционный анализ показателей функционального состояния тромбоцитов, оцениваемых с использованием проточной цитометрии

Table 5
Correlation analysis of the platelet functional state indicators by flow cytometry

Коррелируемые параметры	Контроль	Снижена агрегация	Сохранена агрегация
GPIIbIIIa ^(a) /PAC-1 ^(a)	0,65 (p=0,005)	0,35 (p=0,2)	0,60 (p=0,005)
GPIIbIIIa ^(a) /GPIb ^(a)	0,66 (p<0,004)	0,36 (p=0,19)	0,44 (p=0,056)
PAC-1 ^(a) /AnnexinV++ ^(a)	-0,58 (p=0,015)	-0,26 (p=0,35)	-0,86 (p<0,001)
CD63/CD62P	0,57 (p=0,016)	0,52 (p=0,047)	0,31 (p=0,18)
FSC/SSC	0,61 (p=0,009)	0,55 (p=0,034)	0,33 (p=0,16)
SSC/GPIb ^(a)	0,72 (p=0,001)	0,35 (p=0,2)	0,14 (p=0,57)
SSC/CD62P	0,60 (p=0,012)	0,19 (p=0,49)	-0,34 (p=0,15)
SSC/CD63	0,52 (p=0,032)	0,4 (p=0,14)	0,07 (p=0,77)
SSC/CD62P ^(a)	0,53 (p=0,030)	0,29 (p=0,29)	0,25 (p=0,29)

Примечания: представлены значения коэффициентов корреляции Пирсона и их достоверности (p). Индекс (a) указывает, что данные были получены при активации тромбоцитов.



что, вероятно, связано со сниженным количеством общего пула GPIIb/IIIa, а также его активированной формы (рис. 3D, 4D). Обе группы с геморрагическим синдромом отличались от контрольной группы отсутствием корреляционной связи между гранулярностью (SSC) и количеством гранулярных белков (P-селектин, CD63, GPIb), экспонированных на поверхности тромбоцитов как в отсутствие, так и в условиях активации. Группа детей с сохраненной агрегацией отличалась от анализируемых групп отсутствием корреляционных зависимостей FSC и SSC, характеризующих размер и гранулярность соответственно, а также между белками-маркерами внутриклеточных гранул P-селектин и CD63, экспонированных на поверхности тромбоцитов в отсутствие активации. Полученные данные могут быть следствием нарушений в данной группе со стороны плотных гранул тромбоцитов, что соответствует представленным ранее результатам по CD63 (рис. 4D).

Полученные данные позволяют заключить, что для выявления причин геморрагического синдрома невыясненного генеза у детей основными показателями, оцениваемыми с помощью проточной цитометрии, являются: снижение количества и степени активации рецептора GPIIb/IIIa, снижение количества адгезионного рецептора GPIb, а также нарушения со стороны гранулярного аппарата тромбоцитов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проточная цитометрия является информативным инструментом для анализа функциональной активности тромбоцитов и выявления причин их дисфункций. В настоящем исследовании анализ методом проточной цитометрии тромбоцитов детей с жалобами на повышенную кровоточивость при отсутствии нарушений со стороны плазменного звена свертывания крови позволил выявить причину сниженной агрегации тромбоцитов: пониженное количество и степень активации рецептора GPIIb/IIIa активированных тромбоцитов и пониженное количество рецептора GPIb интактных тромбоцитов. В группе пациентов, в которой нарушений в агрегационной активности зарегистрировано не было, причиной проявлений геморрагического синдрома, согласно полученным данным, могут быть нарушения со стороны гранулярного аппарата тромбоцитов. Однако не следует исключать иные причины повышенной кровоточивости, не связанные с нарушением сосудисто-тромбоцитарного и плазменного звена свертывания крови, что требует обширного и системного анализа состояния данных пациентов.

Таким образом, наличие неидентифицированной тромбоцитопатии у пациентов с клиническими проявлениями геморрагического синдрома при отсутствии нарушений со стороны плазменного звена является поводом для расширения объема исследований с использованием проточной цитометрии.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Hayward C.P.M., Pai M., Liu Y., et al. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J Thromb Haemost.* 2009;7(4):676–684. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03273.x.
2. Boender J., Kruij M.J.H.A., Leebeek F.W.G. A diagnostic approach to mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2016;14(8):1507–1516. doi: 10.1111/jth.13368.
3. 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. doi: 10.1182/blood.V70.3.620.620.
4. Polokhov D., Pshonkin A., Ignatova A., et al. Specificities of the storage pool and morphology of platelets in children with unspecified hemorrhagic syndrome. *Pediatr Hematol Immunopathol.* 2021;20(1):58–65. doi: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-58-65.

5. Ignatova A., Ponomarenko E., Polokhov D., et al. Flow cytometry for pediatric platelets. *Platelets*. 2019;30(4):428–437. doi: 10.1080/09537104.2018.1513473.
6. Gunay-Aygun M., Huizing M., Gahl W.A. Molecular defects that affect platelet dense granules. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(5):537–547. doi: 10.1055/s-2004-835674.
7. Kosheed I., Mamaev A., Motin Y., et al. Platelet Delta granules storage pool deficiency in female patient with severe hemorrhagic syndrome. *Russian journal of hematology and transfusiology*. 2023;68(1):90–97. doi: 10.35754/0234-5730-2023-68-1-90-97. (in Russian)
8. Ambrosio A.L., Di Pietro S.M. Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis. *Platelets*. 2017;28(2):138–146. doi: 10.1080/09537104.2016.1243789.
9. Chu Y., Guo H., Zhang Y., et al. Procoagulant platelets: Generation, characteristics, and therapeutic target. *J Clin Lab Anal*. 2021;35(5):e23750. doi: 10.1002/jcla.23750.
10. Dale George L. Procoagulant Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(9):1596–1597. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309847.
11. Podoplelova N., Nechipurenko D., Ignatova A., et al. Procoagulant Platelets: Mechanisms of Generation and Action. *Hämostaseologie*. 2021;41(02):146–153. doi: 10.1055/a-1401-2706.
12. Kempton C.L., Hoffman M., Roberts H.R., et al. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(4):861–866. doi: 10.1161/01.ATV.0000155987.26583.9b.
13. Panteleev M., Ananyeva N., Greco N., et al. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J Thromb Haemost*. 2005;3(11):2545–2553. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x.
14. London F.S., Marcinkiewicz M., Walsh P.N. A subpopulation of platelets responds to thrombin- or SFLLRN-stimulation with binding sites for factor IXa. *J Biol Chem*. 2004;279(19):19854–19859. doi: 10.1074/jbc.M310624200.
15. Panteleev M., Ananyeva N., Greco N., et al. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J Thromb Haemost*. 2005;3(11):2545–2553. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x.
16. Yakimenko A., Verholomova F., Kotova Y., et al. Identification of Different Proaggregatory Abilities of Activated Platelet Subpopulations. *Biophys J*. 2012;102(10):2261–2269. doi: 10.1016/j.bpj.2012.04.004.