

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ДИАГНОСТИКИ ТРОМБОЦИТОПАТИИ С ТРОМБОЦИТОПЕНИЕЙ

А.Ю. Озерянская¹, С.П. Казаков^{1,2}

¹ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Минобороны России, г. Москва, Россия

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий федерального медико-биологического агентства» России, г. Москва (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России)

Резюме

Статья посвящена описанию клинического случая тромбоцитопатии с тромбоцитопенией у больного К., который поступил в ГВКГ им. Н.Н. Бурденко для выяснения причины появления спонтанных множественных гематом. В связи со сложностью диагностики данного состояния нами был использован широкий спектр различных гематологических, биохимических, иммунологических, генетических исследований. Мы представляем данный случай, как иллюстрацию трудностей поиска и алгоритмирования диагностики для тромбоцитопатий, в соответствии с современной классификацией и необходимости участия большого количества специалистов клинической лабораторной диагностики. В статье приводятся различные лабораторные методы диагностики и их интерпретация, а так же акцентируется внимание на тех лабораторных тестах, которые позволяют нам понять наличие функциональных нарушений и ответить на вопросы о том, где на начальных этапах можно было заподозрить данные проявления этой патологии. Для диагностики использовали последовательно методы гематологических, биохимических исследований, изучения морфологии, данные агрегатограмм и проточной цитометрии по оценке функциональных свойств тромбоцитов, предприняты попытки использования молекулярно-генетических исследований. Отсутствие молекулярно-генетических маркеров для данной формы тромбоцитопатии затрудняет окончательную диагностику, однако позволяет сделать акценты на другие методы диагностики функциональных свойств тромбоцитов. Функциональные свойства тромбоцитов у данного пациента были снижены, что отражается на снижении функции тромбоцитов при активации их с коллагеном и адренилином, при этом отмечается наличие дезагрегации при использовании в качестве агентов тромбина и АДФ. Проточная цитометрия образца крови данного пациента позволила выявить сниженные показатели антител к активированному интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$, Р-Селектину альфа-гранул (CD62p), количество и объем секреции плотных гранул по мепакрину, долю прокагулянтных тромбоцитов по аннексину V, что несомненно позволяет охарактеризовать функциональные свойства тромбоцитов. В данной работе показана важность использования современной гематологической техники, которая позволяет заподозрить данную патологию в лабораторных подразделениях среднего уровня и своевременно направить мысль врачей клиницистов на поиск и анализ тромбоцитопении, а при совместном консультировании с гематологом предложить обсудить тромбоцитопению совместно с тромбоцитопатией.

Ключевые слова: гемостаз, тромбоциты, тромбоцитопатия, тромбоцитопения, гематологические анализаторы.

DOI: 10.58953/15621790_2023_14_3-4_35

CLINICAL CASE OF THROMBOCYTOPATHY DIAGNOSIS WITH THROMBOCYTOPENIA

Anna Yu. Ozeryanskaya¹, Sergey P. Kazakov^{1,2}

¹Main Military Clinical Hospital named after academician N.N. Burdenko Russian Defense Ministry, Moscow, Russia

²Federal State Budget Funding Federal Research and Clinical Center of specialized types of health care and medical technology of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia (FSBF FRCC of the FMBA)

Summary

The article is devoted to the description of a clinical case of thrombocytopathy with thrombocytopenia in patient K., who was admitted to the N.N. Burdenko State Medical Hospital to find out the cause of spontaneous multiple hematomas. Due to the complexity of the diagnosis of this condition, we used a wide range of different hematological,

biochemical, immunological, and genetic studies. We present this case as an illustration of the difficulties of finding and algorithmizing diagnostics for thrombocytopathies, in accordance with modern classification and the need for the participation of a large number of specialists in clinical laboratory diagnostics. The article provides various laboratory diagnostic methods and their interpretation, as well as focuses on those laboratory tests that allow us to understand the presence of functional disorders and answer questions about where these manifestations of this pathology could be suspected at the initial stages. For diagnosis, methods of hematological, biochemical studies, morphology studies, aggregatogram and flow cytometry data were consistently used to assess the functional properties of platelets, attempts were made to use molecular genetic studies. The absence of molecular genetic markers for this form of thrombocytopathy complicates the final diagnosis, however, it allows us to focus on other methods for diagnosing the functional properties of platelets. The functional properties of platelets in this patient were reduced, which is reflected in a decrease in platelet function when activated with collagen and adrenaline, while the presence of disaggregation is noted when using thrombin and ADP as agents. Flow cytometry of the blood sample of this patient revealed reduced levels of antibodies to activated integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, P-Selectin alpha granules (CD62p), the amount and volume of secretion of dense granules according to mepacrin, the proportion of procoagulant platelets according to annexin V, which undoubtedly allows us to characterize the functional properties of platelets. This work shows the importance of using modern hematological techniques, which makes it possible to suspect this pathology in mid-level laboratory units and promptly direct the thoughts of clinicians to search for and analyze thrombocytopenia, and in joint consultation with a hematologist, suggest discussing thrombocytopenia together with thrombocytopathy.

Keywords: hemostasis, platelets, thrombocytopathy, thrombocytopenia, hematological analyzers.

Введение

Тромбоцитопатия — нарушение системы гемостаза, в основе которой лежит качественный дефект и дисфункция тромбоцитов [5]. Для адекватного функционирования тромбоцита и участия в первичном гемостазе необходимо достаточно большое количество компонентов и их слаженная работа, чем и обусловлены различия в клинике и видах кровоточивости, а также сложности в диагностике [4,10].

Все тромбоцитопатии по функционально-морфологическим признакам можно разделить на 4 группы [5]:

1. Нарушение адгезии тромбоцитов:

- синдром Бернара–Сулье (дефицит или дефект комплекса GPIb-IX-V);
- болезнь Виллебранда (дефицит или дефект vWF).

2. Нарушение агрегации тромбоцитов:

- тромбастения Гланцмана (дефицит или дефект GPIIb-IIIa);
- наследственная афибриногенемия (дефицит или дефект $\alpha_{IIb}\beta_3$, фибриногена).

3. Нарушение высвобождения и дефицит гранул:

- дефицит пула хранения: α -гранул (синдром серых тромбоцитов, APC-синдром, Квебекский тромбоцитарный синдром, синдром Пари–Труссо); δ -гранул (дефицит плотных гранул, болезнь Германского–Пудлака, синдром Чедиака–Хигаси, TAP-синдром); α - и δ -гранул (дефицит плотных и α -гранул).

4. Нарушение формирования и дефицит сигнальных путей:

- дефекты рецепторов агонистов: тромбосана A2, коллагена, аденозиндифосфата (АДФ), эпинефрина;

- дефект активации G-протеина: дефицит G_{aq} , аномалия G_{as} , дефицит G_{ai1} ;

- дефект метаболизма фосфатидилинозитола — дефицит фосфолипазы C-2;

- дефект мобилизации кальция;

- дефект фосфорилирования плекстрина — дефицит протеинкиназы C;

- нарушение обмена арахидоновой кислоты и тромбосана:

- нарушение высвобождения арахидоновой кислоты;

- дефицит циклооксигеназы;

- дефицит тромбосансинтетазы;

- аномалии элементов цитоскелета — синдром Вискотта–Олдрича;

- нарушение взаимодействия тромбоцит-фактора свертывания (дефект фосфолипидов мембраны) — синдром Скотта;

- сочетанные врожденные нарушения — аномалия Мея–Хегглина, болезнь Дауна, синдром мезенхимальной дисплазии, TAP-синдром.

Существуют и другие классификации тромбоцитопатий, основывающиеся на патогенезе, размере тромбоцитов и дифференцирующие тромбоцитопатии по врожденным и приобретенным нарушениям. Со всеми классификациями можно ознакомиться в клинических рекомендациях диагностики и лечения тромбоцитопатий [5].

Алгоритм диагностики тромбоцитарных нарушений включает тщательный сбор анамнеза, тесты первого уровня, дополнительные и подтверждающие (специальные) тесты. При сборе анамнеза необхо-

димом принимать во внимание: наличие признаков врожденного или приобретенного нарушения гемостаза у пациента и у родственников, сопутствующие заболевания и применяемые лекарственные средства. К тестам первого уровня относят исследование общего анализа крови (ОАК), включающий световую микроскопию мазка – важный метод диагностики, определяющий не только количество тромбоцитов, но и их морфологию. Также к тестам первого уровня относят тест на определение времени кровотечения, который помогает заподозрить проблемы в сосудисто-тромбоцитарном звене гемостаза, но он не обладает хорошей чувствительностью и специфичностью [10]. К дополнительным тестам можно отнести исследование агрегации тромбоцитов с различными агонистами, исследование пунктата костного мозга, определение антитромбоцитарных антител, электронную микроскопию образца крови [10]. К подтверждающим (специальным) тестам можно отнести исследование субпопуляций тромбоцитов и их функциональной активности с помощью проточной цитофлуориметрии, а также молекулярно-генетические методы [10]. Полный алгоритм диагностики тромбоцитопатий представлен на рис. 1 [5].

Информация о пациенте

С 2017 г. больного К., 1997 года рождения, впервые стали беспокоить множественные гематомы на коже туловища (без видимых причин). Ранее не обследовался. В 2018 г. лечился в г. Краснодаре по поводу острого респираторного заболевания по типу ринофарингита, где впервые было выявлено снижение тромбоцитов до 104×10^9 /л. В январе 2019 г. обратился к хирургу в г. Краснодар с жалобами на появление гематом на теле, не связанных с травмирующими факторами. В марте 2019 г. был проконсультирован врачом-гематологом: заподозрено нарушение свертываемости крови. Для дифференциальной диагностики проведено исследование костного мозга (без патологии) и выявление мутации в гене JAK2617F для исключения хронических миелопролиферативных заболеваний и эссенциальной тромбоцитемии.

Поступил 14.05.2019 г. в гематологическое отделение ГВКГ им. Н. Н. Бурденко в связи с тромбоцитопенией. Алгоритм диагностики представлен на рис. 1.

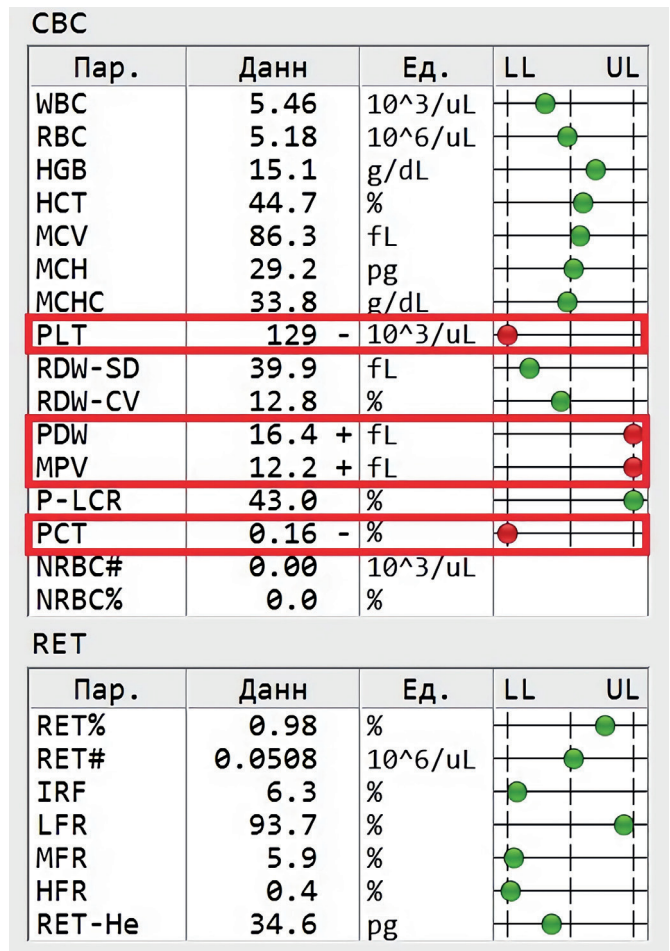
Результаты обследования

В отделении клиничко-гематологических исследований пациенту 15.05.2019 г. было выполнено исследование общего анализа крови с подсчетом лейкоцитарной формулы.

Результаты исследования на анализаторе Sysmex XN-1000 (рис. 2), показывают содержа-

Рисунок 2.

Данные, полученные на анализаторе Sysmex XN-1000



ние лейкоцитов (WBC – white blood cells), эритроцитов (RBC – red blood cells), и гемоглобина (HGB – hemoglobin), в пределах референсных значений, при пониженном содержании тромбоцитов (PLT – platelets).

Отмечено изменение тромбоцитарных индексов:

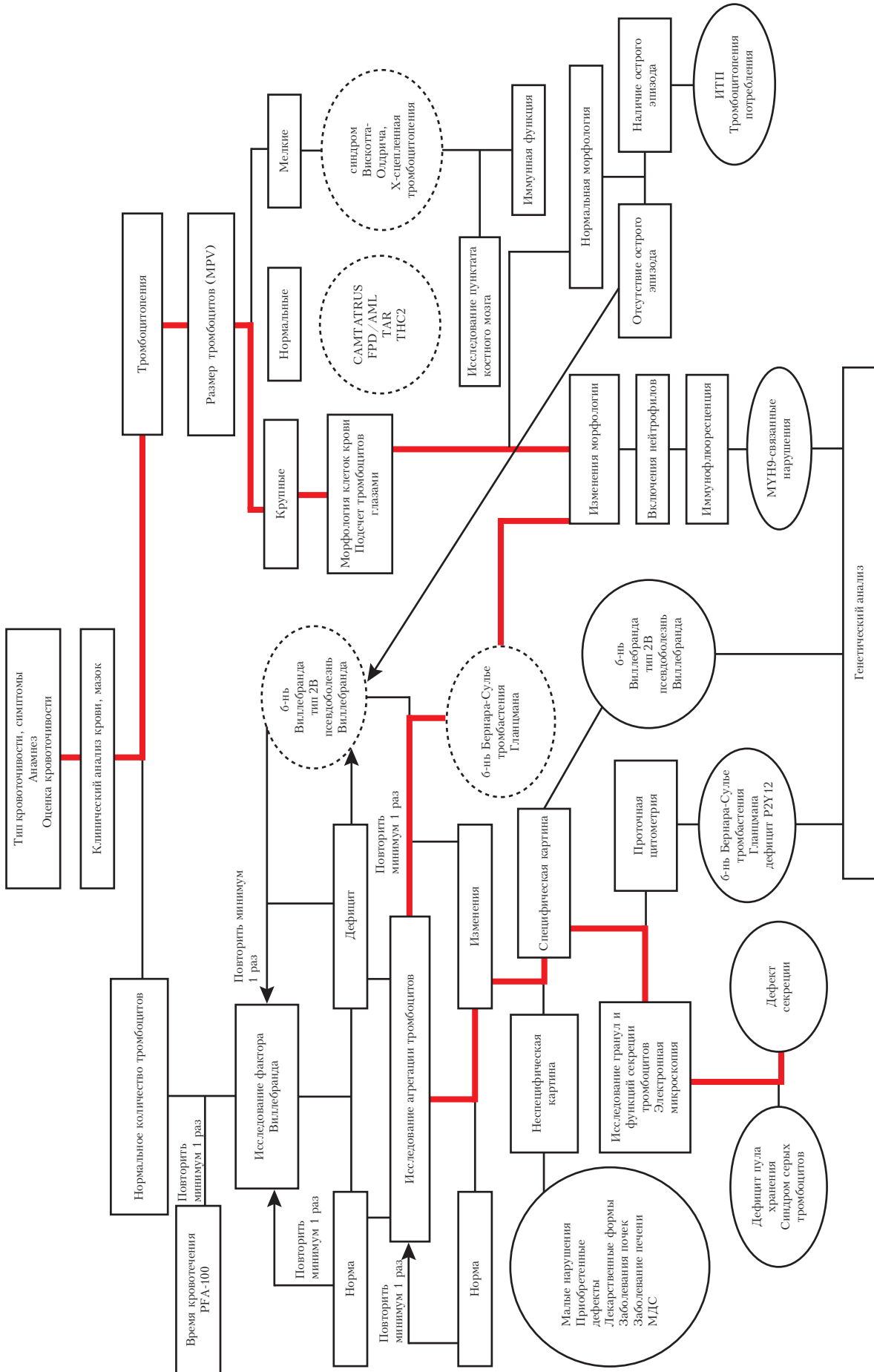
PDW (platelet distribution width) – ширина распределения тромбоцитов по объему. Этот индекс отражает гетерогенность популяции тромбоцитов [2]. (Диапазон референсных значений 11,5–14,5 фл.).

MPV (mean platelet volume) – средний объем тромбоцитов. (Диапазон референсных значений 7,4–10,4 фл.) [2].

У пациента К. отмечается сочетание повышенного PDW и MPV, что, вероятно, говорит о нарастании числа макротромбоцитов в результате усиления продукции тромбоцитов или активного потребления. «Молодые» тромбоциты имеют больший объем, поэтому при ускорении тромбоцитопоэза и преждевременном выходе из костного мозга средний объем тромбоцита возрастает [2].

PCT (platelet crit) – параметр, отражающий долю

Рисунок 1. Алгоритм исследования функциональных нарушений тромбоцитов [5]



Комментарий к рисунку.
 Круги и пунктирные круги содержат диагнозы и предположительные диагнозы, соответственно.
 SAMT - врожденная амегакариотарная тромбоцитопения, ATRUS - амегакариотарная тромбоцитопения с врожденным радиолярным сплюснением, FPD / AML - семейная тромбоцитопения с предрасположенностью к развитию острого миелоидного лейкоза. TAR-TAR - синдром, TNC2 - аутосомно-доминантная тромбоцитопения.

объема цельной крови, занимаемой тромбоцитами. (Диапазон референсных значений 0,17–0,35%). РСТ является чувствительным показателем для оценки риска возникновения кровотечения [2]. В данном случае отмечается небольшое снижение.

P-LCR (platelet large cell ratio) – отношение объема крупных тромбоцитов ко всему объему тромбоцитов [1]. У данного пациента этот параметр находится на верхней границе референсных значений, что является индикатором повышенной скорости тромбоцитобразования в костном мозге.

Анализ флажирования (рис. 3) также показывает изменение морфологии тромбоцитов с возможным присутствием крупных форм тромбоцитов (Giant Platelet?).

При световой микроскопии образца крови пациента с окраской по методу Романовского–Гимзы изменений в лейкоцитарной формуле не выявлено (табл. 1). При подсчёте тромбоцитов в мазке отмечено снижение количества тромбоцитов до $130 \times 10^3/\text{мкл}$, а также присутствие макроформ тромбоцитов.

В соответствии с алгоритмом, отмеченным красным цветом на рис. 1, можно предположить, что тромбоцитопения связана с тромбоцитопатией, следствием которой является присутствие макроформ тромбоцитов.

Рисунок 3.

флажирование анализатора Sysmex XN-1000

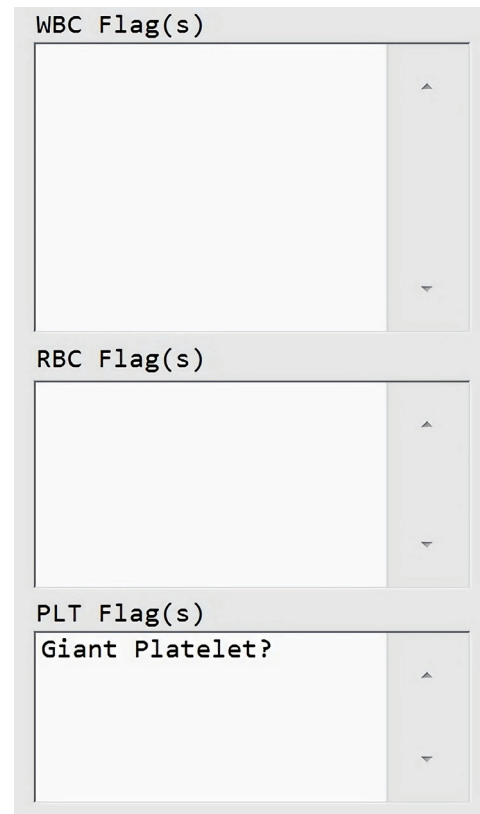


Таблица 1.

Результаты подсчёта лейкоцитарной формулы, ретикулоцитов и морфологии тромбоцитов методом световой микроскопии ($\times 1000$)

Порядковый номер	Показатели	Результат, %	Референсные значения, %	Примечание
1	Палочкоядерные нейтрофилы	5	1–5	Нет патологии
2	Сегментоядерные нейтрофилы	56	47–75	Нет патологии
3	Лимфоциты	36	19–37	Нет патологии
4	Моноциты	3	3–11	Нет патологии
5	Тромбоциты в мазке (по Фонию)	130	150–400	Снижение Присутствуют макроформы
6	Ретикулоциты	10	1–12	Нет патологии

Результат определения длительности кровотечения у данного больного был в пределах референсных значений. Это исследование характеризует функциональную активность тромбоцитов и их взаимодействие с сосудистой стенкой, которая позволяет заподозрить общие нарушения, и не дает возможности их исключить или определить конкретную патологию. Преимуществом метода является его доступность, но низкая чувствительность и специфичность позволяют исполь-

зовать этот метод только в качестве скрининга нарушений в гемостазе.

Дополнительные биохимические исследования крови от 15.05.2019 г. (табл. 2) показали, что активность аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы, и концентрация общего билирубина, общего белка, креатинина, мочевой кислоты у пациента находятся в пределах референсных значений. Отмечается незначительное увеличение активности

Таблица 2.

Результаты биохимического исследования крови пациента К. 15.05.2019 г.

№	Показатели	Результат	Референсные значения	Комментарий
1.	Аланинаминотрансфераза (ALT), МЕ/л	46	0–41	Повышение
2.	Аспартатаминотрансфераза (AST), МЕ/л	19	0–40	Нет патологии
3.	Щелочная фосфатаза (ALP), МЕ/л	43	35–129	Нет патологии
4.	Общий билирубин (TBIL), мкмоль/л	11,23	5–25	Нет патологии
5.	Лактатдегидрогеназа (LDH), МЕ/л	231	240–480	Снижение
6.	Общий белок (TP), г/л	71	66–87	Нет патологии
7.	Креатинин (CREA), мкмоль/л	75	44–106	Нет патологии
8.	Мочевая кислота (UA), мг/дл	4,9	2,4–7,6	Нет патологии

аланинаминотрансферазы (АЛТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), что вероятно связано с нарушениями на преаналитическом этапе исследования (погрешности в диете, приём лекарственных средств, токсичные условия труда, неправильное наложение жгута при взятии венозной крови и т.п.). При дальнейшем контроле биохимических показателей 27.05.2019 г. активность АЛТ нормализовалась, однако активность ЛДГ в течение двух недель оставалась сниженной.

Пациенту также было проведено исследование агрегации тромбоцитов с АДФ и коллагеном. В результате исследования отмечается отсутствие агрегации с АДФ (в концентрации 10 мкМ) (0 Ом, референсный диапазон 6–24 Ом) и гипоагрегация с коллагеном в концентрации 2,0 мкг/мл (2 Ом, референсный диапазон 15–27 Ом).

В состоянии покоя тромбоциты распределены в плазме однородно, вместе с тем наблюдается максимальная оптическая плотность. Добавление агониста приводит к активации тромбоцитов, что в свою очередь вызывает изменение их формы, в результате чего оптическая плотность плазмы падает, а светопропускание возрастает. В зависимости от используемых агонистов, агрегация может быть необратимой, при этом кривая агрегации выходит на плато, либо обратимой, тогда значения кривой стремятся вернуться к исходным. Использование различных агонистов позволяет выявить разнообразные нарушения функции тромбоцитов [9].

Отсутствие или снижение агрегации может быть связано с нарушением синтеза или накопления в гранулах специфических веществ, с нарушением механизма дегрануляции при связывании тромбоцитов, а также с патологией структуры мембраны тромбоцитов.

Больному было проведено повторное исследова-

ние анализа крови 22.05.2019 г. с использованием канала PLT-F (исследование тромбоцитов с использованием флуоресценции). С помощью флуоресцентного анализа тромбоцитов в канале PLT-F оценивается незрелая фракция тромбоцитов IPF (Immature Platelet Fraction), референсный диапазон 1,0–7,0%. Фракция незрелых тромбоцитов отражает состояние костномозгового тромбоцитопоэза [3].

Результат исследования образца крови пациента на Sysmex XN-1000 (рис. 5) демонстрирует изменения в тромбоцитарных индексах (PLT, PDW, MPW, P-LCR), что указывает на нарастание патологии в тромбоцитарном звене (рис. 4). Отмечено также увеличение фракции незрелых тромбоцитов до 13%, что можно связать с компенсаторным увеличением выработки тромбоцитов в костном мозге. Это отражено на диаграмме рассеивания PLT-F канала, где виден характерный «хвост» из молодых форм тромбоцитов. Фракция незрелых тромбоцитов выделена красным, фракция зрелых тромбоцитов выделена белым (рис. 5).

Данные лабораторных исследований позволяют в соответствии с алгоритмом (рис. 1) предположить изменения функциональной активности тромбоцитов. Для дальнейшего углубленного исследования необходимо детальное исследование количественной и качественной активности тромбоцитов с использованием флуоресцентной проточной цитометрии в специализированной лаборатории, в которой проводятся расширенные исследования тромбоцитарного звена.

В соответствии с алгоритмом диагностики образцы крови были направлены в специализированную лабораторию ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева» Минздрава России для дополнительных и специальных исследований.

При определении морфологии тромбоцитов

Рис. 4.

Данные, полученные на анализаторе *SystechXN-1000*

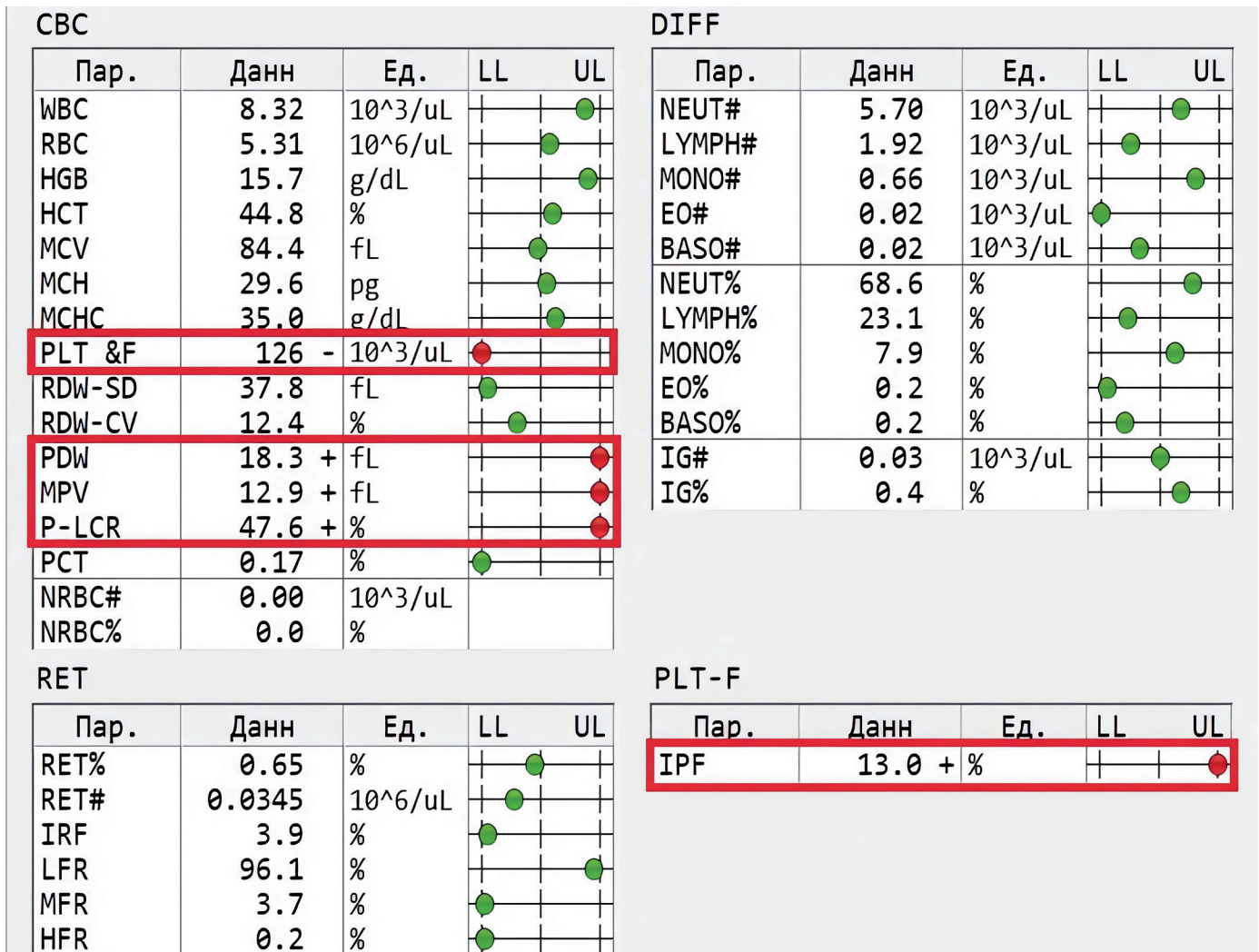


Рис. 5.

Диаграмма рассеяния *PLT-F*. Канал *PLT-F* измеряет прямое рассеяние (*FSC, forwardscatter*) на оси *Y* и боковую флуоресценцию (*SFL, sidefluorescence*) на оси *X*

(табл. 3) с помощью световой микроскопии выявлены гипо- и агранулярные тромбоциты, которые составляют до 75,5%, отсутствующие в норме. При обзорном просмотре препаратов встречаются тромбоциты с максимальным диаметром до 9,2 мкм, средний диаметр тромбоцитов составляет 2,76 мкм (референсный диапазон 1,69–2,63, мкм), увеличена средняя площадь тромбоцита до 6,27 (референсный диапазон 4,03–4,75 мкм²), отмечаются скопления по 2–3 тромбоцита, а также наличие кольцевых включений в тромбоцитах (рис. ба, б).

Пациенту была проведена повторная агрегатоме-

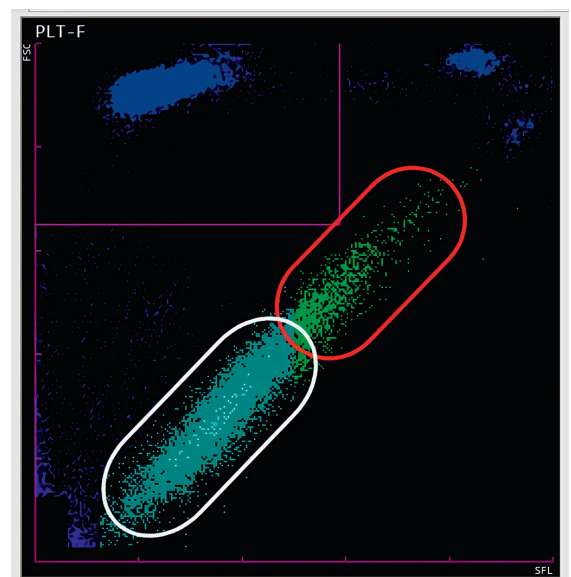


Рис. 6(а, б).

Морфология тромбоцитов пациента К. Световая микроскопия (x1000), окрашивание по Романовскому-Гимзе

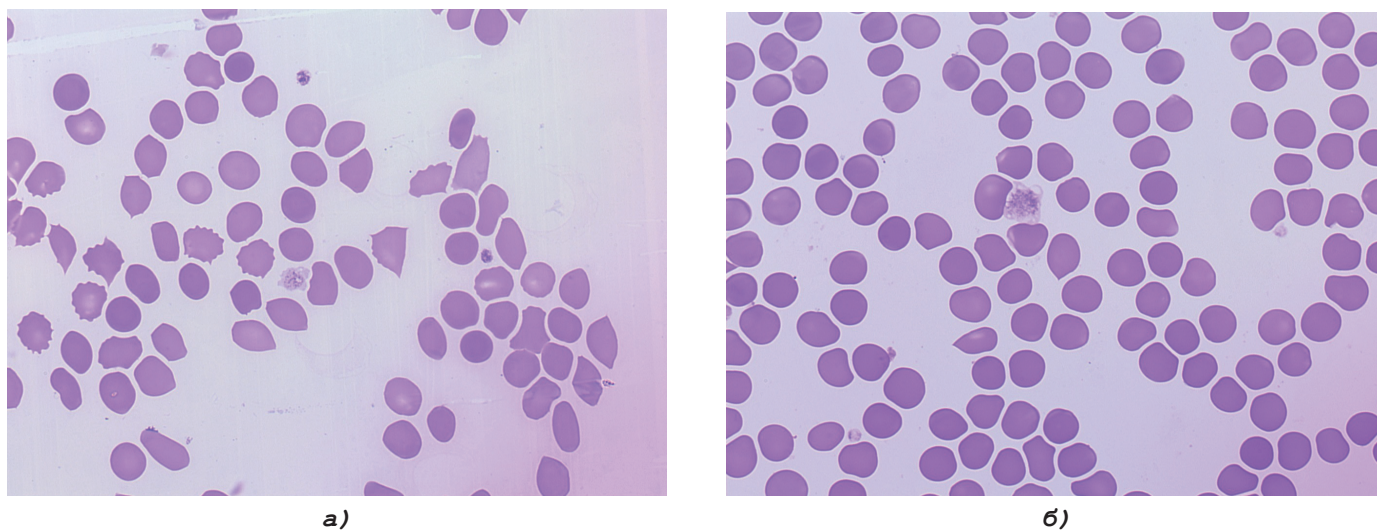


Таблица 3.

Определение морфологии тромбоцитов

№	Тест	Результат	Референсный диапазон	Примечание
1.	Средний диаметр тромбоцитов, мкм	2,76	1,69–2,63	Повышение
2.	Средняя площадь, мкм ²	6,27	4,03–4,75	Повышение
3.	Минимальный размер, мкм	1,77		
4.	Максимальный размер, мкм	5,08		
	<2,0 мкм	7,4	44,67%	Снижение
	2,0–4,0 мкм	89,5	53,54%	Повышение
	4,0–5,0 мкм	2,1	1,76%	Повышение
	>5,0 мкм	1	0,13%	Повышение

Таблица 4.

Результаты оценки функциональных свойств тромбоцитов по данным агрегатометрии

№	Название теста	Результат	Референсный диапазон, %	Примечание
1.	Агрегация тромбоцитов с тромбином (TRAP-test)	44	50–100	Дезагрегация
2.	Агрегация тромбоцитов с арахидоновой кислотой	41	25–65	Нет патологии
3.	Агрегация тромбоцитов с АДФ (доза индуктора 5 мкмоль)	14	25–65	Дезагрегация
4.	Агрегация тромбоцитов с коллагеном	9	50–80	Снижение
5.	Агрегация тромбоцитов с ристоцетином	75	55–90	Нет патологии
6.	Агрегация тромбоцитов с низкой концентрацией ристоцетина	7	0–10	Нет патологии
7.	Агрегация тромбоцитов с адреналином	12	50–85	Снижение

трия с расширенным спектром индукторов (табл. 4), в результате которой подтверждено снижение агрегации с АДФ до 14 (референсный диапазон 25–65%) и коллагеном до 9% (референсный диапазон 50–80%), а также выявлены снижение агрегации с тромбином до 44% (референсный диапазон 50–100%) и адреналином до 12% (референсный диапазон 50–85%). Поверхностные гликопротеиновые рецепторы тромбоцита связываются со специфическими лигандами: рецептор GPIa-IIa, GPVI с коллагеном, рецептор GPIb-V-IX с тромбином, рецептор P2-RсАДФ, а рецептор α 2-adr-R

с адреналином [6]. Таким образом, у данного пациента происходит замедленная активация мембранных рецепторов тромбоцитов, что приводит к нарушению процессов адгезии и агрегации.

В используемой методике с помощью активации тромбоцитов CRP (collagen-related peptide – пептида, сходного по аминокислотной последовательности с коллагеном) и TRAP6 (реагент, содержащий пептид-6 рецептора тромбина) и CaCl₂ с последующей окраской флуоресцентными антителами можно оценить активность: CD42b– компонента рецепторного

Таблица 5.

Определение субпопуляций тромбоцитов и их функциональной активности с использованием проточной цитофлуориметрии

№	Показатели	Результат	Референсные значения, %	Примечание
1.	Прямое светорассеяние (FSC) – размер			
1.1	Неактив	112	77–123	Нет патологии
1.2	Активир	110	43–83	Повышение
2.	Боковое светорассеяние (SSC) – гранулярность			
2.1	Неактив	86	76–124	Нет патологии
2.2	Активир	82	57–119	Нет патологии
Исследование рецепторов				
3.	Антиген CD42b			
3.1	Неактив	107	74–126	Нет патологии
3.2	Активир	68	37–80	Нет патологии
4.	Антиген CD61			
4.2	Неактив	98	66–134	Нет патологии
4.3	Активир	190	189–335	Нет патологии
5.	Связывание PAC1			
5.1	Неактив	3,7	<6,0	Нет патологии
5.2	Активир	17	58–142	Снижение
6.	Антиген CD62p			
6.1	Неактив	2,3	<6,4	Нет патологии
6.2	Активир	37	72–128	Снижение
7.	Доля прокоагулянтных тромбоцитов (по аннексинуV)			
7.1	Неактив	0,4	<2,22	Нет патологии
7.2	Активир	0,9	5,5–37,7	Снижение
Функциональная активность				
8.	Флуоресценция загруженного мепакрина			
8.1	Количество плотных гранул в неактивированных тромбоцитах	84	73–127	Нет патологии
8.2	Остаточное количество плотных гранул в тромбоцитах после активации	51	14–34	Нет патологии
8.3	Индекс активации плотных гранул	1,7	2,6–5,9	Снижение
8.4	Объем секреции плотных гранул	33	50–100	Снижение

комплекса Фактора Виллебранда (GP1b), CD61 — неактивная форма интегрин $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ рецептора фибриногена, PAC1 — антитела к активированному интегрину $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, Р-Селектин альфа-гранул (CD62p), количество и объем секреции плотных гранул по мепакрину, долю прокоагулянтных тромбоцитов по аннексину V [8–10]. Проведенное исследование позволяет дифференцировать уровень повреждения тромбоцитов и оценить активность рецепторов на поверхности тромбоцитов, дефекты гранул и путей активации тромбоцита.

В результате исследования были получены следующие данные. Уровень активации интегрин $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (связывание с антителом PAC1) значительно снижен при активации тромбоцита. Моноклональные антитела PAC1 специфичны именно к конформационно-измененному комплексу GPIIb-IIIa и распознают эпитоп, расположенный поблизости от фибриноген-связывающего рецептора [1]. В норме активация интегрин обеспечивает основной путь агрегации тромбоцитов друг с другом через «фибриновые мостики» [6].

Плотные гранулы — количество плотных гранул в норме, дегрануляция и секреция снижены. Количество плотных гранул оценивается с помощью флуоресценции вещества мепакрина (обладает собственной флуоресценцией), которое избирательно накапливается в плотных гранулах. Сравнивая флуоресценцию мепакрина до активации тромбоцита и после, проведена оценка количества плотных гранул в неактивированных тромбоцитах и остаточное количество плотных гранул после активации тромбоцита [9,10].

Р-Селектин альфа-гранул (CD62p) — значительно снижен при активации. Количество альфа-гранул в тромбоцитах было оценено с помощью экспрессии рецепторов к белку Р-селектину (CD62p). Данный белок содержится в альфа-гранулах и в процессе активации тромбоцита мембрана альфа-гранулы встраивается в мембрану тромбоцита, в результате чего Р-селектин оказывается на поверхности [9,10].

Прокоагулянтная активность тромбоцитов оценивалась по наличию фосфатидилсерина (связывание с белком аннексин V) на поверхности тромбоцита после активации. Фосфатидилсерин находится на внутренней поверхности клеток, при активации тромбоцитов он перемещается на наружную поверхность клетки и связывает белки свертывания, они концентрируются на поверхности тромбоцитов, что способствует ускорению реакций свертывания в сотни тысяч раз [7,9,10]. Снижение фосфатидилсерина на наружной мембране свидетельствует о недостаточности процессов активации тромбоцитов. Таким образом, процесс активации тромбоцитов с использованием интегрин $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, Р-селектин альфа-гранул, аннексина V замедлен, что го-

ворит о нарушениях метаболической активности и позволяет подтвердить наличие тромбоцитопатии.

Учитывая полученные данные, у больного была диагностирована наследственная тромбоцитопатия с тромбоцитопенией, со снижением агрегации тромбоцином, АДФ, коллагеном и адреналином, со снижением активации интегрин $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, дегрануляцией и секрецией плотных гранул, значительным снижением Р-селектин альфа-гранул, снижением активации с аннексином V.

Обсуждение результатов

В соответствии с рекомендациями [5] в данном случае задействован алгоритм исследования, выделенный красным цветом на рис. 1. Пациенту проведен ОАК с оценкой морфологии тромбоцитов, подсчетом количества тромбоцитов по мазку крови, а также исследование агрегации тромбоцитов, что в условиях лаборатории стационаров общего назначения достаточно для того, чтобы заподозрить специфические изменения тромбоцитов. Далее пациент был направлен в специализированную лабораторию для исследования рецепторов тромбоцитов и их функций методом проточной цитометрии и окончательной диагностики с помощью молекулярно-генетических тестов.

Надо отметить, что подсчет тромбоцитов в мазке крови (по Фонию) в настоящее время считается нецелесообразным в связи с наличием качественных гематологических анализаторов в лабораториях. Тем не менее, в случае отсутствия высокотехнологичных гематологических анализаторов и выявленной тромбоцитопении необходимо уметь оценивать количество тромбоцитов по мазку крови для исключения агрегации тромбоцитов и наличия их морфологических изменений.

Рассмотренный клинический случай показывает, насколько тромбоцитопатии представляют собой сложный диагноз. Часто небольшие клинические проявления сложно отделить от варианта нормы или от кровоточивости, вызванной другими (бытовыми) причинами. Клинические проявления этой широкой группы патологий схожи между собой, а для постановки диагноза приходится использовать множество разнообразных лабораторных тестов, которые не всегда доступны в пределах одной лаборатории, плохо стандартизированы, вследствие чего результаты полученные в разных лабораториях не всегда сопоставимы, также имеют сильные ограничения по хранению и транспортировке крови [10]. Тем не менее для большинства лабораторий доступны определенные методы, такие как подсчет тромбоцитов в мазке (по Фонию), определение времени кровотечения, морфологическая характеристика тромбоцитов, данные гематологических анализаторов

(в том числе данные канала PLT-F), которые позволяют предварительно заподозрить тромбоцитопатию.

Заключение

На примере описанного случая показана важность простых и доступных методов исследования в лабораториях первичного звена. Использование данных гематологического анализатора Sysmex XN-1000 с прицельным вниманием к параметрам MPV, PDW и P-LCR, выявление макротромбоцитов при световой микроскопии, а также данные канала PLT-F позволяют заподозрить патологию тромбоцитов уже на уровне гематологического стационара в лабораториях среднего уровня. Учитывая большую гетерогенность патогенеза тромбоцитопатий, при наличии у пациента соответствующей клинической симптоматики требуется использование более сложных методов исследования, доступных в специализированных лабораториях. Проточная цитометрия с количественной и функциональной оценкой различных рецепторов на тромбоцитах позволяет нам подтвердить тромбоцитопатию. Использование молекулярно-генетических методов часто является целесообразным, особенно при наследственных тромбоцитопениях с предрасположенностью к гемобластозам (перестройка RUNX1), а также позволяет оценивать прогноз заболевания, однако не для всех тромбоцитопатий, как в нашем случае, имеются молекулярно-генетические маркеры.

Список литературы

1. Азимова М.Х., Гапонова Т.В., Галстян Г.М. и др. Изменения маркеров активации донорских тромбоцитов при хранении после проведения инактивации патогенов с помощью технологии амтосален и ультрафиолетовое облучение спектра А // *Гематология и трансфузиология*. - 2017. - № 4. - С. 197-203.
2. Арзумян В.Г., Белохвостикова Т.С., Вавилова Т.В. и др. *Клиническая лабораторная диагностика*/ под ред. В.В. Долгова. М.: Лабдиаг, 2018, Т. 2, 624 с.
3. Инструкция к гематологическому анализатору Sysmex XN-1000// <https://www.sysmex.ru>
4. Казаков С.П. Изменение реологических свойств крови и морфологии эритроцитов у кардиохирургических больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения// Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. - Санкт-Петербург, 1996. - 32 с.
5. Кумскова М.А., Зозуля Н.И., Копылов К.Г. *Клинические рекомендации по диагностике и лечению тромбоцитопатий*. М., 2015, 31 с.

6. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Долгов В.В./ *Лабораторная гематология*. М.: Триада, 2014, 217 с.

7. Пантелеев М.А. Свертывание крови как функция организма. Теория свертывания крови// <https://www.youtube.com/watch?v=yDwMvVuzFrA&list=PL2Ek1OJt17Hq8ROOUYFaNXennkvIwIlbg&index=5&t=1s>

8. Полетаев А.В. Основные методы оценки системы гемостаза// <https://www.youtube.com/watch?v=KLTL7H64A8A>

9. Пономаренко Е.А., Игнатова А.А., Федорова Д.В. и др. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. - 2019. - № 3. - С. 112-119.

10. Федорова Д.В. Тромбоцитопатии у детей // <https://www.youtube.com/watch?v=8iydCYdEbsY>