

## КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИММУННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЕЙ

*В.В. Бодрова<sup>1\*</sup>, С.Г. Хаспекова<sup>1</sup>, О.Н. Шустова<sup>1</sup>, Н.В. Цветаева<sup>2</sup>, А.В. Мазуров<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова, 121552, Москва, ул. Академика Чазова, 15а; \*эл. почта: malysheva-valeri@mail.ru

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр гематологии, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Иммунная тромбоцитопения (ИТП) — одна из частых причин снижения числа тромбоцитов. Кровотечения являются основным клиническим симптомом ИТП, их тяжесть коррелирует с глубиной тромбоцитопении, но может зависеть и от изменений функциональной активности тромбоцитов. Мы сравнили активность тромбоцитов у здоровых добровольцев (ЗД) и пациентов с ИТП, а также в группах пациентов с ИТП с разным уровнем кровотечений. В исследование были включены 65 ЗД и 84 пациента с ИТП. Активность тромбоцитов оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии. Тромбоциты активировали пептидом, активирующим рецептор тромбина (TRAP), или ADP и определяли экспонирование на их поверхности маркеров активации, активированной формы гликопротеина (ГП) IIb-IIIa и белка мембран альфа-гранул Р-селектина, измеряя связывание антител PAC-1 и CD62P соответственно. Тромбоцит-ассоциированные IgG (TA-IgG, показатель уровня антитромбоцитарных аутоантител), процент “молодых” ретикулярных тромбоцитов (РТ, %) и светорассеяние тромбоцитов (показатель их размера) также оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии. Связывание с тромбоцитами PAC-1 и в меньшей степени CD62P было ниже у пациентов с ИТП, чем у ЗД. У пациентов с ИТП связывание PAC-1 обратно коррелировало с содержанием TA-IgG. В отличие от ЗД, у пациентов с ИТП связывание PAC-1 и CD62P не коррелировало напрямую с размером тромбоцитов и РТ, %. У пациентов с ИТП с тяжёлыми кровотечениями количество тромбоцитов было ниже, было снижено связывание PAC-1 и CD62P и повышены уровни TA-IgG и РТ, %. Таким образом, у пациентов с ИТП было зарегистрировано снижение содержания на поверхности тромбоцитов маркеров активации, которое было в большей степени выражено у пациентов с тяжёлыми кровотечениями. Предполагается, что причиной этого снижения может быть воздействие аутоантител (TA-IgG) на тромбоциты и, в частности, на ГП IIb-IIIa.

**Ключевые слова:** иммунная тромбоцитопения; функция тромбоцитов; антитела к тромбоцитам; ретикулярные тромбоциты; размер тромбоцитов; кровотечения

**DOI:** 10.18097/PBMC1596

#### ВВЕДЕНИЕ

Иммунная тромбоцитопения (ИТП) является классическим аутоиммунным заболеванием и одной из наиболее частых причин снижения количества тромбоцитов в кровотоке (2–4 случая на 100000 в год в США и Европейских странах). Аутоантитела при ИТП обычно направлены против главных антигенов тромбоцитов — гликопротеинов (ГП) IIb-IIIa и Ib. Связываясь со своими мишенями, аутоантитела ускоряют разрушение тромбоцитов макрофагами в селезёнке и печени и могут подавлять продукцию тромбоцитов мегакариоцитами костного мозга (преимущественно при хронической ИТП) [1–3].

Кровотечения (или геморрагический синдром) — это основной клинический симптом ИТП. Частота и тяжесть кровотечений, в целом, коррелируют

с глубиной тромбоцитопении [4], но могут зависеть и от изменений функциональной активности тромбоцитов. Функцию тромбоцитов у пациентов с тромбоцитопенией обычно оценивают с помощью проточной цитофлуориметрии. В отличие от рутинного теста агрегации тромбоцитов в обогащённой тромбоцитами плазме, измерения их активности методом проточной цитофлуориметрии можно проводить при низком количестве тромбоцитов и в небольшом объёме цельной крови. При использовании этого подхода у пациентов с ИТП с геморрагическими осложнениями по сравнению с пациентами без осложнений было выявлено некоторое снижение агонист-индуцированного экспонирования на поверхности тромбоцитов специфических маркеров их активации (таких как активированная форма рецептора фибриногена, ГП IIb-IIIa, и белок мембран альфа-гранул Р-селектин) [5–9].

*Принятые сокращения:* FSC – forward scattering, прямое светорассеяние; MFI – mean fluorescence intensity, средняя интенсивность флуоресценции; TA-IgG – тромбоцит-ассоциированные IgG; TRAP – thrombin receptor activating peptide, пептид, активирующий рецептор тромбина; ГП – гликопротеин; ЗД – здоровые добровольцы; ИТП – иммунная тромбоцитопения; РТ – ретикулярные тромбоциты; ТО – тиазоловый оранжевый; ТПО – тромбопоэтин.



© 2025 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

При сравнении активности тромбоцитов у пациентов с ИТП и здоровых лиц были получены противоречивые результаты; зарегистрировано как снижение [10, 11], так и повышение активности [12, 13], а также разнонаправленные результаты (в зависимости от агониста, используемого для активации тромбоцитов) [14, 15]. Наличие антитромбоцитарных аутоантител является основной специфической чертой ИТП, которая отличает её от других типов тромбоцитопении (например, от гипопродуктивных форм, обусловленных нарушением образования тромбоцитов в костном мозге). Возможные эффекты аутоантител на функцию тромбоцитов были изучены лишь в двух исследованиях. Panzer и соавт. не обнаружили различий в активности тромбоцитов между пациентами с ИТП с аутоантителами против ГП IIb-IIIa или ГП Ib и без них [16], в то время как Nishiura и соавт. выявили более низкую активность у пациентов с ИТП с аутоантителами против ГП IIb-IIIa [12]. При ИТП тромбоциты, вследствие их ускоренного оборота, характеризуются увеличенным размером [17–20] и увеличенным процентом “молодых” ретикулярных тромбоцитов (РТ) [21–24]. У здоровых лиц подобные изменения прямо коррелируют с увеличением активности тромбоцитов [25], однако для пациентов с ИТП такие взаимосвязи описаны не были. Таким образом, до сих пор остаётся неясным, как изменяется функция тромбоцитов при ИТП и какие факторы влияют на эти изменения.

Мы сравнили активность тромбоцитов, которую измеряли методом проточной цитофлуориметрии, у здоровых добровольцев (ЗД) и пациентов с ИТП, а также в группах пациентов с разным уровнем кровотечений. Для выявления факторов, которые могли бы повлиять на активность тромбоцитов у пациентов с ИТП, мы проанализировали взаимосвязи между параметрами их функциональной активности и (1) уровнем антитромбоцитарных аутоантител (тромбоцит-ассоциированных IgG, ТА-IgG), (2) размером тромбоцитов, (3) содержанием РТ.

## МЕТОДИКА

### *ЗД и пациенты с ИТП*

В исследование были включены 65 ЗД и 84 пациента с ИТП. Пациенты наблюдались в гематологических клиниках г. Москвы, преимущественно в Национальном медицинском исследовательском центре гематологии. ИТП диагностировали согласно международным рекомендациям [2] с использованием следующих критериев: (1) изолированная тромбоцитопения (количество тромбоцитов  $<100 \times 10^9/\text{л}$ ), (2) отсутствие заболеваний, вызывающих вторичную тромбоцитопению, в том числе антифосфолипидного синдрома, системной красной волчанки, лимфопролиферативных заболеваний и т.д. У всех пациентов с тромбоцитопенией измеряли тромбоцит-ассоциированные IgG (ТА-IgG) и плазменный гликокалицин. Из исследования

исключали пациентов без повышения ТА-IgG ( $<200\%$  от контрольных значений у ЗД), индикатора наличия аутоантител на поверхности тромбоцитов, и со значительным снижением плазменного гликокалицина ( $<50\%$  от контрольных значений у ЗД), индикатора нарушения продукции тромбоцитов в костном мозге. Большинство пациентов были с впервые диагностированной ( $<3$  месяцев,  $n=24$ ) или персистирующей формой ИТП (3–12 месяцев,  $n=47$ ), а меньшинство — с хронической формой ИТП ( $>12$  месяцев,  $n=13$ ). На момент обследования ни один из пациентов не получал специфическую терапию ИТП: внутривенный иммуноглобулин, кортикостероиды, агонисты рецепторов тромбопозтина (ТПО) или другое лечение. Пациентов с впервые диагностированной ИТП обследовали до начала любой терапии, а пациентов с персистирующей и хронической ИТП — в то время, когда они не получали терапии как минимум в течение одной недели (в большинстве случаев после неэффективного курса кортикостероидов). Степень кровотечения оценивали с использованием шкалы, рекомендованной Международной рабочей группой по ИТП (от 1 до 4 баллов) [26]. Оценку проводил квалифицированный гематолог на основании анамнеза и жалоб пациентов (недавние эпизоды внутренних кровотечений, кровотечения из носа, дёсен, посттравматические кровотечения, меноррагии у женщин, и т.д.), физического осмотра (петехии, экхимозы, гематомы и т.д.) и анализа крови (количество эритроцитов и уровень гемоглобина). ИТП была первично диагностирована в гематологических клиниках, и затем диагноз был подтверждён после проведения дополнительных лабораторных анализов в ходе визита пациента в Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии кардиологии имени академика Е.И. Чазова (НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова). Количество тромбоцитов у включённых в исследование ЗД было  $\geq 150 \times 10^9/\text{л}$  и они не принимали препараты, влияющие на функцию тромбоцитов.

### *Забор крови*

Кровь у ЗД и пациентов с ИТП собирали из локтевой вены в 5% ЭДТА или 3,8% цитрат натрия в соотношении кровь:антикоагулянт 9:1, используя иглы диаметром не менее 18 G (более тонкие иглы и вакутейнеры не применяли для предотвращения возможной активации тромбоцитов). Кровь, антикоагулированную ЭДТА, использовали для подсчёта тромбоцитов, измерения РТ, прямого светорассеяния тромбоцитов (FSC, forward scattering) и ТА-IgG, а также для подготовки образцов плазмы для определения гликокалицина и ТПО. Кровь, антикоагулированную цитратом натрия, использовали для оценки активности тромбоцитов.

### *Подсчёт тромбоцитов*

Подсчёт тромбоцитов проводили в гематологическом анализаторе Abacus Junior B (“Diatron Ltd.”, Австрия). Прибор регулярно калибровали с помощью стандартных образцов крови.

## ФУНКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ИММУННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ

### *Ретикулярные тромбоциты*

Ретикулярные тромбоциты (РТ) определяли по содержанию в них остаточных нуклеиновых кислот, используя в качестве красителя тиазоловый оранжевый (ТО), как описано ранее [25]. В образцах без ТО 5 мкл цельной крови смешивали с 990 мкл реагента BD FACS Flow ("BD Bioscience", США) и 5 мкл CD42b-APC ("BD Biosciences"). В образцах с ТО 5 мкл цельной крови смешивали с 940 мкл реагента BD FACS Flow, 5 мкл CD42b-APC и 50 мкл раствора ТО (10 мкг/мл). Образцы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 2500 g в течение 3 мин, и осадок ресуспендировали в 350 мкл реагента BD FACS Flow. Анализ проводили в проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II ("BD Biosciences") с использованием программного обеспечения BD FACS Diva ("BD Biosciences"). Тромбоциты выявляли ("гейтировали") в соответствии с их размером и по окрашиванию специфическим маркером CD42b-APC. Тромбоциты считали положительными по окраске ТО, когда их флуоресценция превышала флуоресценцию >99% тромбоцитов в образце без ТО, и рассчитывали процент ТО положительных, т.е. РТ в общей популяции (РТ, %).

### *Светорассеивание тромбоцитов*

Среднее значение прямого светорассеяния тромбоцитов (FSC, forward scattering), характеризующее размер тромбоцитов, определяли методом проточной цитофлуориметрии в том же образце, что и РТ (см. выше), и выражали в условных единицах (у.е.).

### *Тромбоцит-ассоциированные IgG*

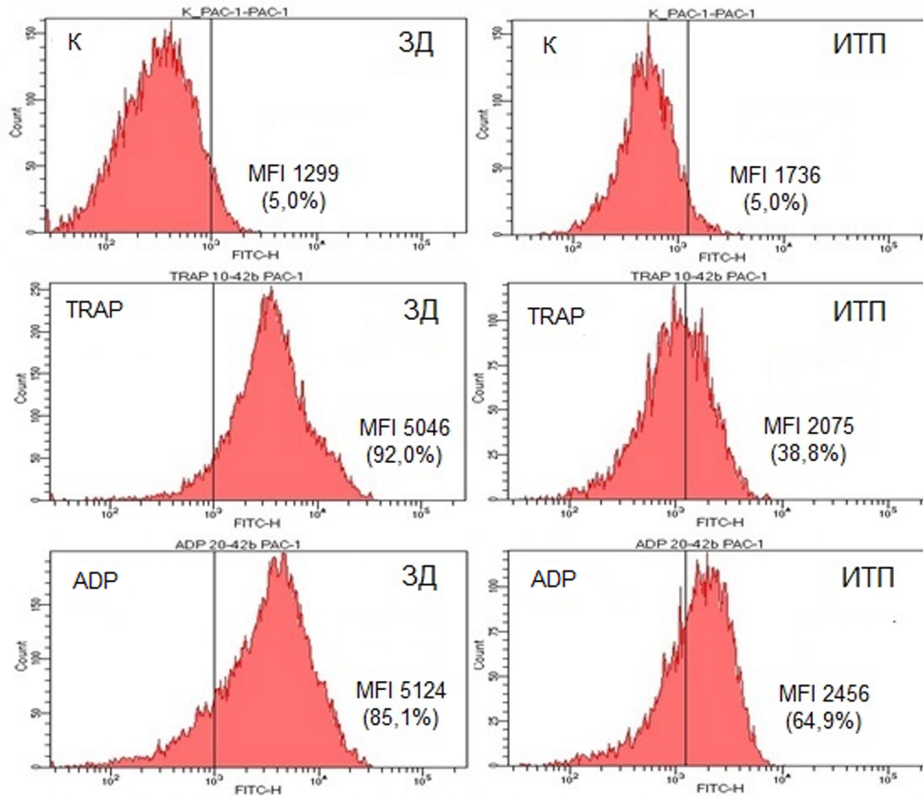
Тромбоцит-ассоциированные IgG (ТА-IgG) определяли по связыванию с тромбоцитами FITC-меченых аффинно очищенных поликлональных антител козы против IgG человека (анти-IgGч-FITC) ("ИМТЕК", Россия) с помощью проточной цитофлуориметрии. В связи с низким количеством тромбоцитов у пациентов с ИТП кровь, антикоагулированную ЭДТА, отстаивали в течение 30 мин при комнатной температуре для частичного осаждения эритроцитов и собирали обогатённый тромбоцитами супернатант. Образцы разводили в соотношении 1:5 фосфатно-солевым буфером (150 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) содержащим 5 mM ЭДТА и 2% BSA, добавляли 10 мкг/мл CD42b-Alexa Fluor 647 ("ИМТЕК") и 30 мкг/мл анти-IgGч-FITC и инкубировали при 37°C в течение 30 мин в темноте. Образцы в объёме 60 мкл разводили 250 мкл реагента BD FACS Flow и анализировали в проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II с использованием программного обеспечения BD FACS Diva. Тромбоциты выявляли ("гейтировали") в соответствии с их размером и по окрашиванию CD42b-Alexa Fluor 647. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI, mean fluorescence intensity) для связывания анти-IgGч-FITC оценивали в условных единицах (у.е.) у каждого пациента с ИТП

и сравнивали с таковой в контрольной группе ЗД. ТА-IgG у пациентов выражали в % от контрольных образцов ЗД, принятых за 100%. Пример определения ТА-IgG приведён в Дополнительных материалах (рис. S1).

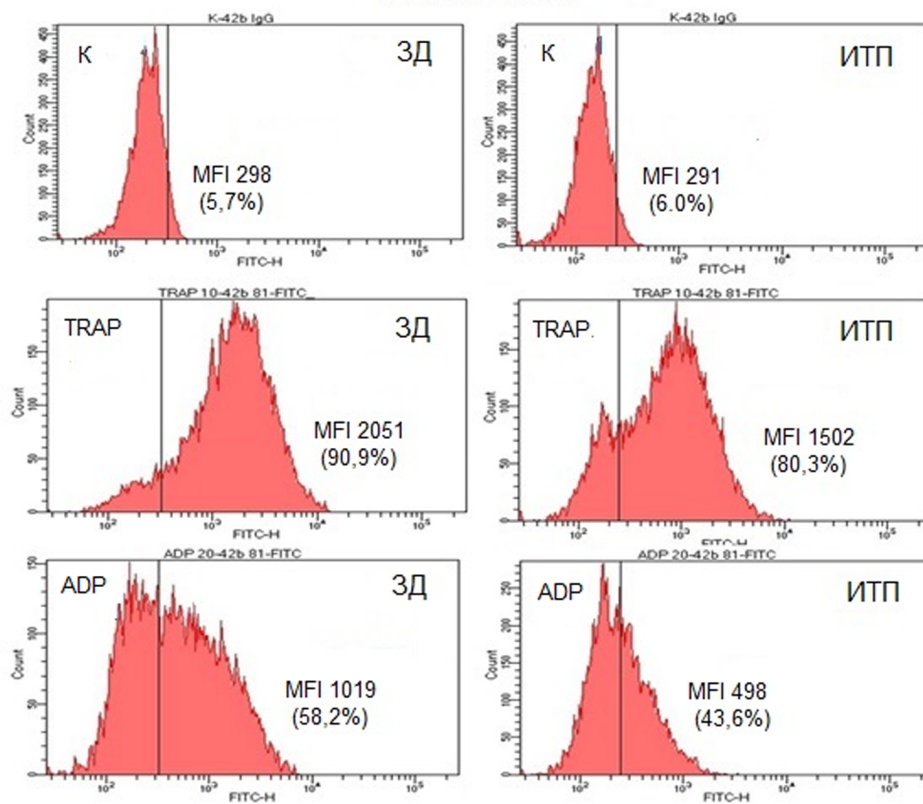
### *Функция тромбоцитов*

Функциональную активность тромбоцитов оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по экспонированию на поверхности тромбоцитов маркеров активации, активированной формы GPIIb/IIIa и белка мембран альфа-гранул P-селектина, измеряя связывание с ними антител PAC-1 и CD62P соответственно, как подробно описано ранее [25]. Из-за низкого количества тромбоцитов у пациентов с ИТП кровь, антикоагулированную цитратом натрия, отстаивали в течение 30 мин при комнатной температуре для частичного осаждения эритроцитов и собирали обогатённый тромбоцитами супернатант. Образцы разбавляли раствором Тироде/HEPES без CaCl<sub>2</sub> (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% декстрозы, 5 mM HEPES, pH 7,35, 1 mM MgCl<sub>2</sub>), содержащим 0,35% BSA. Для ЗД и пациентов с ИТП с количеством тромбоцитов >50×10<sup>9</sup>/л использовали разведение 1:5, а для пациентов с ИТП с более низким количеством тромбоцитов — более низкие разведения (до 1:2). К 60 мкл разведённых образцов крови добавляли 3 мкл CD42b-APC и либо 10 мкл PAC-1-FITC ("BD Biosciences"), либо 5 мкл CD62P-FITC ("ИМТЕК"), либо 5 мкл мышиного IgG-FITC ("ИМТЕК"). Контрольный мышиный IgG-FITC использовали для оценки неспецифического связывания с тромбоцитами антитела CD62P, относящегося к классу IgG. В то же время этот контроль не применяли для связывания антитела PAC-1, относящегося к классу IgM. Тромбоциты не активировали или активировали 10 мкМ TRAP (пептид, активирующий рецептор тромбина (последовательность SFLLRN), любезно предоставлен М.В. Овчинниковым, НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова), или 20 мкМ или 2,5 мкМ ADP ("AppliChem", Германия). Образцы с антителами и агонистами инкубировали в течение 15 мин при 37°C в темноте, фиксировали равным объёмом 2% параформальдегида в течение 40 мин в темноте, разбавляли 250 мкл реагента BD FACS Flow и анализировали в проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II с использованием программного обеспечения BD FACS Diva. Тромбоциты выявляли ("гейтировали") в соответствии с их размером и по окрашиванию PAC-1-FITC и CD62P-FITC (в условных единицах, у.е.) и процент тромбоцитов, положительных по PAC-1 и CD62P (PAC-1+ и CD62P+). Тромбоциты считали PAC-1+ и CD62P+, если их флуоресценция превышала таковую у 95% тромбоцитов в контрольных пробах (не активированные тромбоциты для PAC-1 и не активированные тромбоциты с мышиными контрольными IgG-FITC для CD62P). Примеры связывания PAC-1 и CD62P у ЗД и пациентов с ИТП приведены на рисунке 1.

РАС-1-FITC



CD62P-FITC



**Рисунок 1.** Измерение функциональной активности тромбоцитов у ЗД и пациентов с ИТП (как указано). Связывание с тромбоцитами антитела РАС-1-FITC против активированной формы GPIIb/IIIa (верхняя панель) и антитела CD62P-FITC против P-селектина (нижняя панель). Проточная цитофлуориметрия, примеры гистограммы флуоресценции.

## ФУНКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ИММУННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ

Тромбоциты не активировали (контроль без агонистов (К)) или активировали TRAP 10 мкМ (TRAP) или ADP 20 мкМ (ADP). Показаны значения MFI и % PAC-1+ или CD62P+ тромбоцитов (в скобках).

### Гликокалицин

Уровень гликокалицина в плазме крови измеряли с помощью самостоятельно разработанного ИФА, как описано ранее [20, 27]. Образцы плазмы от нескольких ЗД смешивали, замораживали в аликвотах при  $-70^{\circ}\text{C}$  и использовали в качестве стандартного пула плазм для калибровочной кривой. Уровень гликокалицина у пациентов и тестируемых ЗД выражали в % от содержания гликокалицина в стандартном пуле плазм, принятого за 100%.

### Тромбопоэтин

Уровень тромбопоэтина (ТПО) в плазме крови измеряли с помощью набора Quantikine® ELISA для ТПО человека ("R&D Systems", США) в соответствии с рекомендациями производителя.

### Статистика

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 12 ("Stat Soft", США). Большинство переменных не соответствовало нормальному распределению (тест Шапиро-Уилка) и, в связи с этим, для анализа результатов использовали непараметрическую статистику. Переменные представляли в виде медиан и 25–75 перцентилей. Для сравнения групп использовали: для количественных переменных — тест Манна-Уитни, для качественных — критерий Хи-квадрат. Для корреляционного анализа использовали тест Спирмена. Построение и анализ ROC кривых выполняли с помощью программы Med Calc 15.8 ("MedCalc Software", США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика ЗД и пациентов с ИТП

Основные характеристики ЗД и пациентов с ИТП, приведённые в таблице 1, свидетельствуют об отсутствии существенных различий между группами по возрасту и соотношению мужчин и

Таблица 1. Основные характеристики ЗД и пациентов с ИТП

	ЗД (n=65)	Пациенты с ИТП (n=84)
Возраст	57 (48–66)	52 (37–61)
Пол, м/ж	27/38	32/52
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	199 (168–243)	29 (19–46)***
FSC, у.е.	19696 (16747–23406)	30760 (25585–39673)***
PT, %	11,4 (8,5–15,4)	16,5 (10,2–21,1)**
TA-IgG, % от контроля <sup>1</sup>	100 (88–115)	500 (370–820)***
Гликокалицин, % от контроля <sup>2</sup>	100 (68–120)	75 (60–100)
ТПО, нг/мл	0,86 (0,36–2,34)	1,16 (0,56–3,36)

Примечание. 1 – Пациентов с TA-IgG <200% от контрольного значения у ЗД в исследование не включали. 2 – Пациентов с гликокалицинем <50% от контрольного у ЗД в исследование не включали. Представлены медианы (25–75%). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – достоверность отличий от группы ЗД.

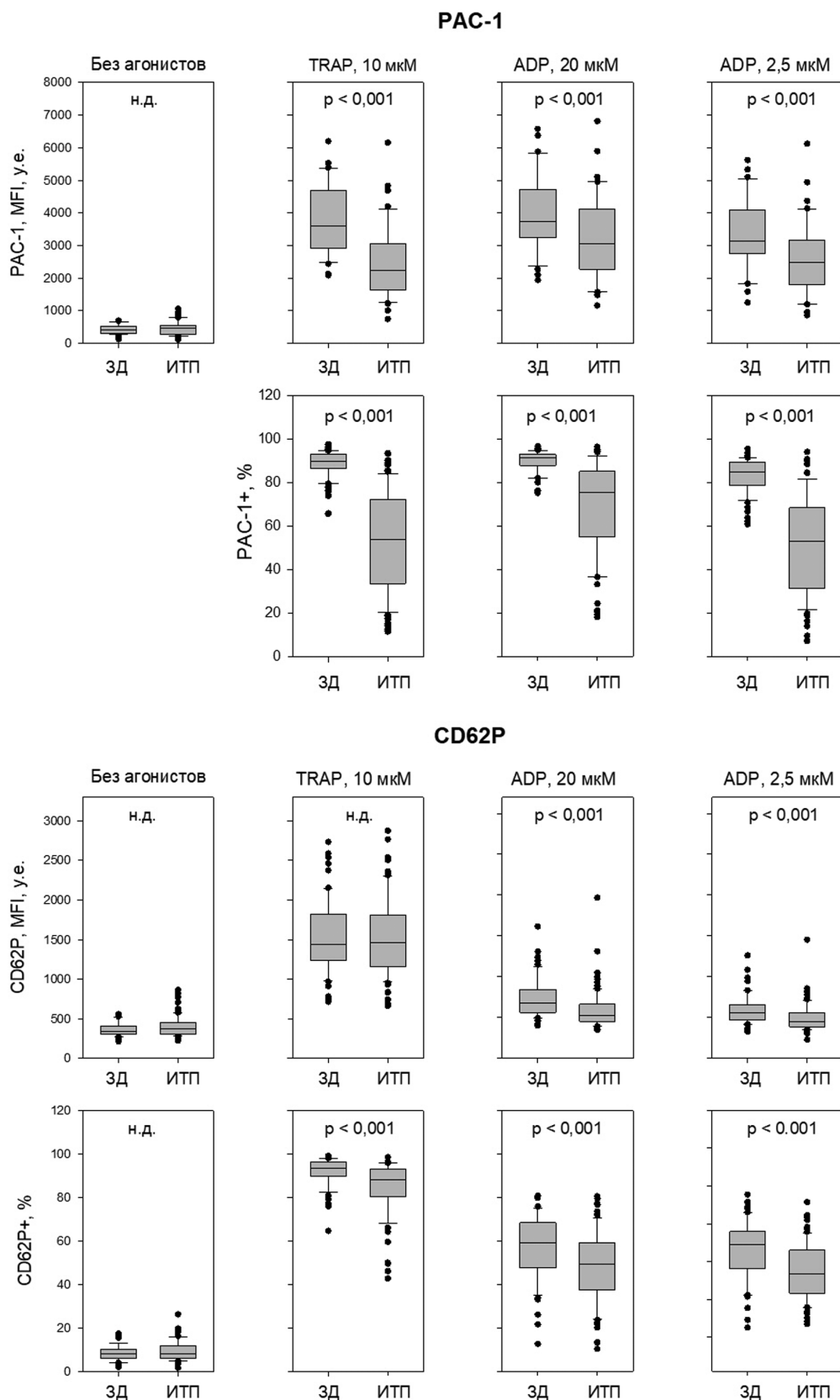
женщин. Количество тромбоцитов в группе ИТП было значительно ниже по сравнению со ЗД (медианы  $29 \times 10^9/\text{л}$  и  $199 \times 10^9/\text{л}$  соответственно). Размер тромбоцитов (оцененный с помощью показателя FSC) и процент PT (PT, %) были значительно выше в группе ИТП. Уровень TA-IgG у пациентов с ИТП составил 500% (медиана) от контрольного уровня группы ЗД (принято за 100%). Гликокалицин плазмы и ТПО были приблизительно одинаковыми в обеих группах.

У пациентов с ИТП была выявлена сильная обратная корреляция между количеством тромбоцитов и TA-IgG ( $R = -0,605$ ,  $p < 0,001$ ). Размер тромбоцитов (показатель FSC) и PT, % напрямую коррелировали друг с другом, как у пациентов с ИТП, так и у ЗД ( $R = 0,578$ ,  $p < 0,001$  и  $R = 0,605$ ,  $p < 0,001$  соответственно).

### Функциональная активность тромбоцитов у пациентов с ИТП

Функциональную активность тромбоцитов у пациентов с ИТП в сравнении со ЗД оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии, измеряя связывание с тромбоцитами антитела PAC-1-FITC, узнающего активированный GPIIb/IIIa, и антитела CD62P-FITC, узнающего мембранный белок  $\alpha$ -гранул Р-селектин. Оценивали MFI и процент PAC-1+ и CD62P+ до и после активации тромбоцитов. У ЗД и пациентов с ИТП низкие базовые уровни связывания PAC-1 и CD62P не активированными тромбоцитами ("без агонистов") не различались. Однако после активации тромбоцитов с помощью TRAP и ADP у пациентов с ИТП большинство показателей связывания PAC-1 и CD62P были достоверно снижены (рис. 2). При активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP снижение было более выражено для PAC-1, чем для CD62P: как PAC-1 MFI, так и PAC-1+, % были снижены примерно на 30–40%, в то время как CD62P MFI оставался на прежнем уровне, а CD62P+, % был ниже только на 8%. При активации тромбоцитов ADP под действием обеих концентраций снижение было почти одинаковым (около 20%) для всех показателей, за исключением PAC-1+, % для 2,5 мкМ ADP (39%).

У пациентов с ИТП все показатели индуцированного агонистами связывания PAC-1 (MFI и PAC-1+, % для всех агонистов) обратно



**Рисунок 2.** Функциональная активность тромбоцитов у ЗД и пациентов с ИТП (как указано). Экспонирование активированного GPIIb/IIIa (связывание антитела РАС-1, верхняя панель) и Р-селектина (связывание антитела CD62P, нижняя панель). Тромбоциты не активировали (“без агонистов”) или активировали 10 мкМ TRAP, 20 мкМ ADP и 2,5 мкМ ADP. Представлены медианы, 25–75%, 5–95% и отдельные значения выше и ниже 5–95% для РАС-1 MFI (y.e.), РАС+, % и CD62 MFI (y.e.) и CD62P+, %. *p* – достоверность различий между ЗД и пациентами с ИТП, н.д. – недостоверно.

## ФУНКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ИММУННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ

коррелировали с уровнем ТА-IgG (R от -0,302 до -0,446) (табл. 2). Однако для связывания CD62P значимая корреляция была обнаружена только для показателя CD62P+, % при активации тромбоцитов TRAP 10 мкМ (R = -0,389) (табл. 2).

В соответствии с нашими более ранними результатами [25] у ЗД большинство значений MFI для связывания PAC-1 и CD62 напрямую коррелировали с размером тромбоцитов (показатель FSC) и PT, % (табл. 3). Однако у пациентов с ИТП значимые корреляции были установлены только для CD62P MFI при активации тромбоцитов TRAP 10 мкМ.

### Пациенты с ИТП с разным уровнем кровотечений

Мы сравнили пациентов с ИТП без кровотечений и с низким уровнем кровотечений, соответствующим 0/1 баллам оценочной шкалы кровотечений

(группа 0/1), и пациентов с более тяжёлыми кровотечениями, соответствующими 2/3 баллам (группа 2/3) (в нашей группе не было пациентов с наиболее опасными кровотечениями, соответствующими 4 баллам). Эти группы не различались по возрасту и соотношению мужчин и женщин. Не было выявлено различий в уровнях гликокалицина и ТПО и размера тромбоцитов (показатель FSC) (ТРО и FSC были немного выше в группе 2/3, но различия были статистически незначимыми). В группе 2/3 количество тромбоцитов было ниже (на 34%), а ТА-IgG и PT, % выше (на 55% и 59% соответственно) по сравнению с группой 0/1 (табл. 4).

Некоторые показатели функциональной активности тромбоцитов были понижены в группе 2/3 (рис. 3). Эти различия были более выражены

Таблица 2. Корреляции показателей функциональной активности тромбоцитов и ТА-IgG у пациентов с ИТП

	Связывание PAC-1 / ТА-IgG	
	PAC-1 MFI, у.е.	PAC-1+, %
Без агонистов	-0,127	—
10 мкМ TRAP	-0,445***	-0,373***
20 мкМ ADP	-0,426***	-0,302**
2,5 мкМ ADP	-0,442***	-0,380***
	Связывание CD62P / ТА-IgG	
	CD62P MFI, у.е.	CD62P+, %
Без агонистов	0,181	0,080
10 мкМ TRAP	0,018	-0,389***
20 мкМ ADP	-0,020	-0,202
2,5 мкМ ADP	0,020	-0,191

Примечание. Представлены коэффициенты корреляции. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – достоверность корреляций.

Таблица 3. Корреляции показателей функциональной активности тромбоцитов, FSC и PT, % у ЗД и пациентов с ИТП

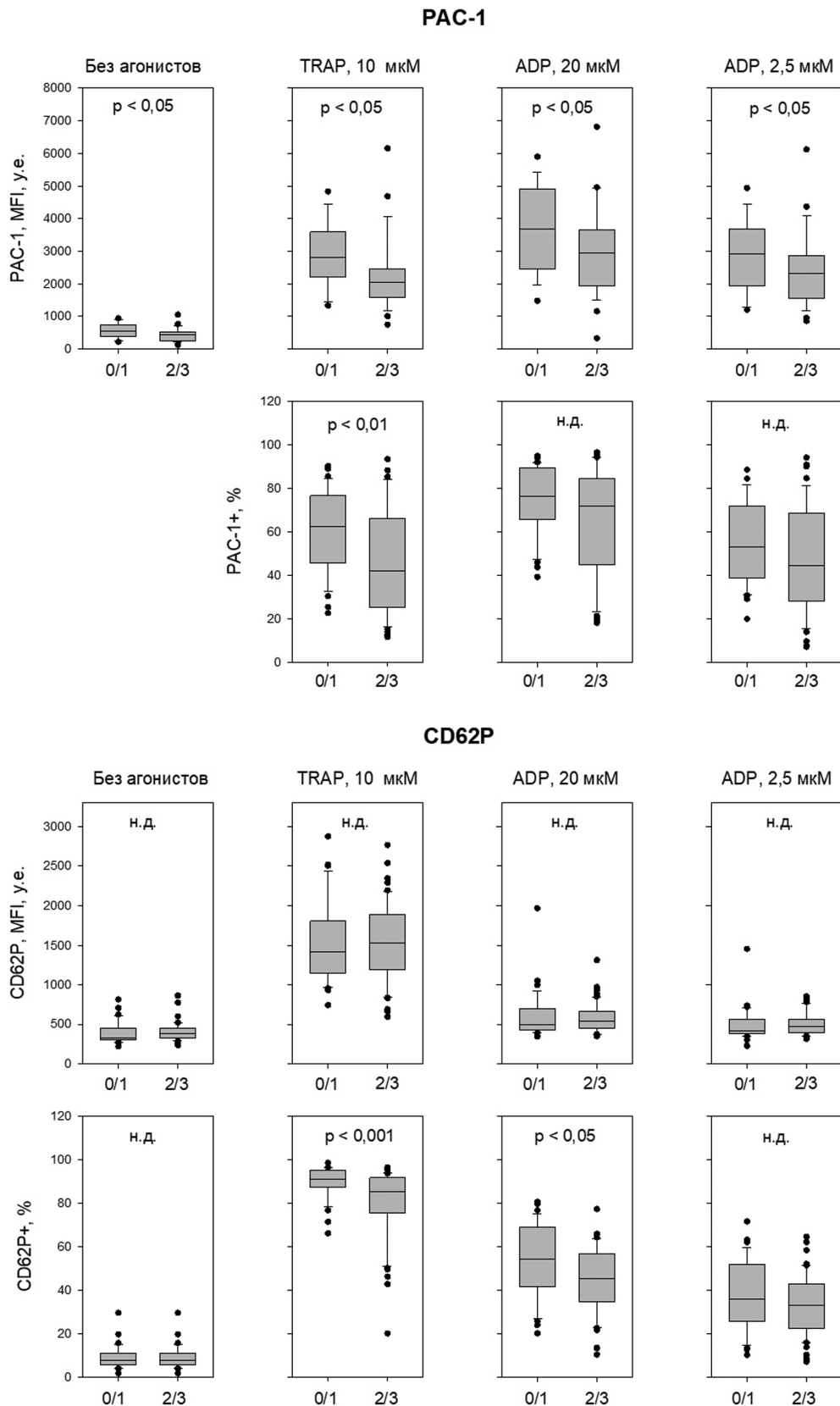
	ЗД		ИТП	
	PAC-1, MFI / FSC		PAC-1, MFI / PT	
Без агонистов	0,194	0,288*	0,431***	-0,016
10 мкМ TRAP	0,311*	0,185	0,386**	0,069
20 мкМ ADP	0,376**	0,012	0,465***	-0,085
2,5 мкМ ADP	0,291*	0,052	0,376**	-0,062
	CD62P, MFI / FSC		CD62P, MFI / PT	
	Без агонистов	0,151	0,284*	0,012
10 мкМ TRAP	0,464***	0,599***	0,495***	0,446***
20 мкМ ADP	0,450***	0,141	0,507***	0,029
2,5 мкМ ADP	0,452***	0,193	0,536***	0,099

Примечание. Представлены коэффициенты корреляции. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – достоверность корреляций.

Таблица 4. Основные характеристики пациентов с ИТП с различным уровнем кровотечений

	Уровень кровотечения 0/1 (n=34)	Уровень кровотечения 2/3 (n=50)
Возраст	51 (36–62)	53 (39–60)
Пол, м/ж	14/20	18/32
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	38 (23–48)	25 (14–38)**
FSC, у.е.	29970 (25219–35543)	32883 (26524–44038)
PT, %	11,3 (7,9–18,8)	18 (13,1–23,0)**
ТА-IgG, % от контроля	400 (340–570)	620 (410–850)**
Гликокалицин, % от контроля	75 (60–110)	73 (60–95)
ТПО, нг/мл	0,95 (0,51–2,93)	1,21 (0,62–3,41)

Примечание. Представлены медианы (25–75%). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – достоверность отличий от группы 0/1.



**Рисунок 3.** Функциональная активность тромбоцитов у пациентов с ИТП с разным уровнем кровотечений – группы 0/1 и 2/3. Экспонирование активированного ГП IIb/IIIa (связывание антитела РАС-1, верхняя панель) и Р-селектина (связывание антитела CD62P, нижняя панель). Тромбоциты не активировали (“без агонистов”) или активировали 10 мкМ TRAP, 20 мкМ ADP и 2,5 мкМ ADP (как указано). Представлены медианы, 25–75%, 5–95% и отдельные значения выше и ниже 5–95% для РАС-1 MFI (у.е.), РАС+, % и CD62 MFI (у.е.) и CD62P+, %. *p* – достоверность различий между группами 0/1 и 2/3, н.д. – недостоверно.

## ФУНКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ИММУННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ

для связывания PAC-1. Достоверные различия для PAC-1 MFI были выявлены после активации тромбоцитов TRAP и 20 мкМ ADP (снижение на 20% в обоих случаях) и для базового уровня без агонистов (снижение на 21%), а для PAC-1+, % после активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP (снижение на 24%). Однако для CD62P MFI не было выявлено никаких различий после активации тромбоцитов любым агонистом или для базового уровня без агонистов, а для CD62P+, % было обнаружено лишь небольшое, хотя и статистически значимое снижение, когда тромбоциты были активированы TRAP 10 мкМ и ADP 20 мкМ (11% и 16% соответственно).

Мы провели ROC-анализ для возможных маркеров тяжёлых кровотечений, используя показатели с наибольшим различием между группами 0/1 и 2/3: количество тромбоцитов, TA-IgG, PT, % и PAC-1+, % после активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP (другие показатели активности тромбоцитов в группе 2/3 были снижены в меньшей степени). Были рассчитаны оптимальные пороговые значения для всех маркеров, и все модели оказались статистически значимыми с площадями под кривой от 0,668 до 0,697. Специфичность всех маркеров была довольно высокой — более 80% (низкий уровень ложноположительных результатов), но чувствительность была недостаточной — от 42% до 56% (высокий уровень ложноотрицательных результатов) (табл. 5, ROC-кривые — рисунок S2 Дополнительных материалов).

### ОБСУЖДЕНИЕ

В проведённом исследовании мы оценивали функциональную активность тромбоцитов у пациентов с ИТП в сравнении со ЗД. С помощью проточной цитофлуориметрии определяли экспонирование на поверхности тромбоцитов двух маркеров активации, активированной формы рецептора фибриногена, GPIIb/IIIa, и белка мембран альфа-гранул, P-селектина, измеряя связывание с ними флуоресцентно меченых антител PAC-1 и CD62P соответственно. Связывание обоих антител было несколько снижено у пациентов с ИТП, что согласуется с частью ранее полученных в отдельных работах результатов, также указывающих на снижение показателей функциональной активности тромбоцитов у пациентов с ИТП, измеренных с помощью проточной цитофлуориметрии [10, 11]. Однако в других работах, было зарегистрировано увеличение показателей активации [12, 13] или получены разнонаправленные результаты — одновременное снижение и

увеличение показателей активации в зависимости от используемого агониста тромбоцитов [14, 15]. Эти несоответствия могут быть частично объяснены различиями в критериях включения пациентов с ИТП. В отличие от других авторов, мы не включали в исследование пациентов без повышения TA-Ig (т.е. без доказанной аутоиммунной компоненты в развитии тромбоцитопении) и со значительным снижением гликокалицина плазмы (т.е. с признаками гипопродуктивной тромбоцитопении). Ещё одной причиной противоречивости получаемых результатов могут быть различия в анализируемых группах — в некоторых работах обследовали пациентов исключительно с хроническим течением заболевания [12] или пациентов детского возраста [13]. Некоторыми авторами у пациентов с ИТП было выявлено повышение уровня базовой активации тромбоцитов (без добавления экзогенных агонистов) [11, 13, 15, 16]. Однако, как и некоторые другие авторы [6, 12], мы не наблюдали такого повышения, предположительно из-за соблюдения мер предосторожности, снижающих активацию тромбоцитов во время взятия крови, в частности не использование тонких игл и вакутейнеров.

Связывание антитела PAC-1 с тромбоцитами у пациентов с ИТП отрицательно коррелировало с содержанием TA-IgG, характеризующим общий уровень антитромбоцитарных аутоантител на поверхности тромбоцитов. Обратная корреляция наблюдалась для обоих показателей связывания PAC-1 (MFI и PAC-1+, %) при активации тромбоцитов всеми используемыми агонистами. Поскольку антитромбоцитарные аутоантитела чаще всего направлены против GPIIb/IIIa [1–3], можно предположить, что они могут препятствовать связыванию PAC-1 с его активационно-зависимым эпитопом в GPIIb/IIIa. Известно, что антитело PAC-1 узнаёт эпитоп внутри или близкий к месту связывания фибриногена, экспонирующемуся при активации тромбоцитов. Это позволяет предположить, что некоторые аутоантитела, ингибирующие его связывание, также могут подавлять активность GPIIb/IIIa в отношении связывания фибриногена, его физиологического лиганда. Однако PAC-1 относится к классу IgM антител, и вследствие крупного размера, связывание PAC-1 может быть нарушено не только аутоантителами к его конкретному эпитопу, но и к эпитопам, расположенным на некотором расстоянии, которые не обязательно ингибируют связывание фибриногена и последующую агрегацию тромбоцитов. Это вопрос требует прояснения,

Таблица 5. ROC-анализ маркеров кровотечений. Сравнение групп пациентов с ИТП с 0/1 и 2/3 баллами по шкале кровотечений

Маркер	Пороговое значение	AUC	Чувствительность	Специфичность
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$\leq 20 \times 10^9/\text{л}$	0,673**	42%	85%
TA-IgG, % от контроля	>610%	0,697***	50%	82%
PT, %	>19%	0,668**	45%	85%
PAC-1+, % (TRAP 10 мкМ)	$\leq 44\%$	0,681**	56%	81%

Примечание. AUC – площадь под кривой. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – достоверность модели.

возможно, путём тестирования непосредственно взаимодействия с тромбоцитами фибриногена у пациентов с ИТП. Снижение связывания антител CD62P не может быть напрямую объяснено действием аутоантител, которые редко направлены против Р-селектина [28]. В отличие от PAC-1, отрицательная корреляция между связыванием CD62P и TA-IgG была обнаружена только для показателя CD62+, % после активации тромбоцитов 10 мкМ TRAP.

Ранее мы продемонстрировали, что у здоровых лиц показатели MFI для связывания антител PAC-1 и CD62 коррелируют с размером тромбоцитов и PT, % [25] и подтвердили ранее полученные в настоящем исследовании результаты. В соответствии с многочисленными ранее полученными данными [17–24] мы также наблюдали у пациентов с ИТП значительное увеличение размера тромбоцитов (показатель FSC) и PT, %. Однако эти изменения не сопровождалось увеличением PAC-1 MFI или CD62P MFI. Более того, эти показатели были несколько снижены у пациентов с ИТП и не коррелировали с уровнем FSC и PT, %. Эти результаты показывают, что на экспонирование маркеров активации тромбоцитов при ИТП влияют не размер тромбоцитов и не содержание PT, а другие факторы, одним из которых могут быть аутоантитела взаимодействующие с антигенами тромбоцитов и, в частности, с GPIIb/IIIa.

Наблюдаемое снижение уровней экспонирования активированного GPIIb/IIIa и Р-селектина на поверхности тромбоцитов у пациентов с ИТП не может быть объяснено снижением общего содержания этих белков. Тромбоциты у пациентов с ИТП “моложе” (увеличенная доля PT) и крупнее, чем у ЗД. Известно, что “молодые” и крупные тромбоциты характеризуются повышенным содержанием поверхностных рецепторов тромбоцитов и внутриклеточных гранул (источник Р-селектина) [29]. В настоящей работе, используя антитела CD42b против GPIIb в качестве маркера для “гейтирования” тромбоцитов в цельной крови, мы наблюдали не снижение, а повышение содержания этого рецептора у пациентов с ИТП (данные не представлены). Мы также не регистрировали у пациентов с ИТП снижения максимальных уровней экспонирования Р-селектина (CD62P, MFI), когда активировали тромбоциты 10 мкМ TRAP, мощным агонистом, стимулирующим почти 100% высвобождение гранул и перемещение Р-селектина на поверхность тромбоцитов.

Пациенты с ИТП с более тяжёлыми геморрагическими осложнениями (группа 2/3 по сравнению с группой 0/1 в соответствии с баллами по оценочной шкале кровотечений) характеризовались более низким количеством тромбоцитов, более высокими значениями TA-IgG и PT, % и снижением некоторых параметров активации тромбоцитов. В ROC-анализе эти маркеры продемонстрировали высокую специфичность, но недостаточную чувствительность. Другими словами, мы наблюдали большое количество ложноотрицательных результатов, когда в противоречии с предложенными моделями

количество тромбоцитов и PAC-1+, % (индекс активации, изменяющийся в наибольшей степени) были выше, а TA-IgG и PT % ниже пороговых значений у пациентов с тяжёлыми кровотечениями (группа 2/3). Тот факт, что у части пациентов геморрагический синдром развивается при относительно высоком содержании тромбоцитов (в ряде случаев  $>50 \times 10^9/\text{л}$ ) и не изменённой активности тромбоцитов, свидетельствует о том, что мы до сих пор не знаем всех факторов, определяющих тяжесть кровотечений при ИТП.

Ограничением нашего исследования было исключение пациентов с ИТП с наиболее опасными кровотечениями (4 балла по шкале кровотечений), которым была необходима экстренная госпитализация и проведение немедленного интенсивного лечения. Это было обусловлено тем, что все виды ИТП специфической терапии (внутривенный иммуноглобулин, кортикостероиды, агонисты рецепторов TPO и другие) могут влиять на исследуемые характеристики тромбоцитов, включая их размер, содержание PT и функциональную активность.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о снижении функциональной активности тромбоцитов у пациентов с ИТП (снижение экспонирования на их поверхности маркеров активации — активированного GPIIb/IIIa и белка мембран альфа-гранул Р-селектина), и это снижение было более выражено у пациентов с тяжёлыми кровотечениями.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.А. Овчинникову (НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова) за предоставление TRAP.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства здравоохранения № 124020200125-3.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все добровольцы и пациенты предоставили добровольное информированное согласие на использование их образцов крови в исследовательских целях. Проведение исследования было одобрено независимым этическим комитетом НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова (протокол № 298 от 29 января 2024 г.).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала ([pbmc.ibmc.msk.ru](http://pbmc.ibmc.msk.ru)).*

ЛИТЕРАТУРА

1. *Despotovic J.M., Bussel J.B.* (2019) Immune Thrombocytopenia (ITP). In: Platelets, 4th ed. (Michelson A.D., Cattaneo M., Frelinger A.L., Newman P.J., eds., Academic Press, pp. 707–724.
2. *Provan D., Donald M., Arnold D.M., Bussel J.B., Chong B.H., Cooper N., Gernsheimer T., Ghanima W., Godeau B., González-López T.J., Grainger J., Hou M., Kruse C., McDonald V., Michel M., Newland A.C., Pavord S., Rodeghiero F., Scully M., Tomiyama Y., Wong R.S., Zaja F., Kuter D.J.* (2019) Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv.*, **3**(22), 3780–3817. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000812
3. *Martínez-Carballeira D., Bernardo Á., Caro A., Soto I., Gutiérrez L.* (2024) Pathophysiology, clinical manifestations and diagnosis of immune thrombocytopenia: contextualization from a historical perspective. *Hematol. Rep.*, **16**(2), 204–219. DOI: 10.3390/hematolrep16020021
4. *Neunert C., Noroozi N., Norman G., Buchanan G.R., Goy J., Nazi I., Kelton J.G., Arnold D.M.* (2015) Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *J. Thromb. Haemost.*, **13**(3), 457–464. DOI: 10.1111/jth.12813
5. *Psaila B., Bussel J.B., Frelinger A.L., Babula B., Linden M.D., Li Y., Barnard M.R., Tate C., Feldman E.J., Michelson A.D.* (2011) Differences in platelet function in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia compared to equally thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenia. *J. Thromb. Haemost.*, **9**(11), 2302–2310. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04506.x
6. *van Bladel E.R., Laarhoven A.G., van der Heijden L.B., Heitink-Polle K.M., Porcelijn L., van der Schoot C.E., de Haas M., Roest M., Vidarsson G., de Groot P.G., Bruin M.C.A.* (2014) Functional platelet defects in children with severe chronic ITP as tested with 2 novel assays applicable for low platelet counts. *Blood*, **123**(10), 1556–1563. DOI: 10.1182/blood-2013-08-519686
7. *Frelinger A.L. 3rd, Grace R.F., Gerrits A.J., Berny-Lang M.A., Brown T., Carmichael S.L., Neufeld E.J., Michelson A.D.* (2015) Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP. *Blood*, **126**(7), 873–879. DOI: 10.1182/blood-2015-02-628461
8. *Middelburg R.A., Carbaat-Ham J.C., Hesam H., Ragusi M.A.A.D., Zwavinga J.J.* (2016) Platelet function in adult ITP patients can be either increased or decreased, compared to healthy controls, and is associated with bleeding risk. *Hematology*, **21**(9), 549–551. DOI: 10.1080/10245332.2016.1180097
9. *Frelinger A.L. 3rd, Grace R.F., Gerrits A.J., Carmichael S.L., Forde E.E., Michelson A.D.* (2018) Platelet function in ITP, independent of platelet count, is consistent over time and is associated with both current and subsequent bleeding severity. *Thromb. Haemost.*, **118**(1), 143–151. DOI: 10.1160/TH17-06-0387
10. *Panzer S., Höcker L., Rieger M., Vormittag R., Koren D., Dunkler D., Pabinger I.* (2007) Agonist-inducible platelet activation in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia. *Eur. J. Haematol.*, **79**(3), 198–204. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.00900.x
11. *Connor D.E., Ma D.D.F., Joseph J.E.* (2013) Flow cytometry demonstrates differences in platelet reactivity and microparticle formation in subjects with thrombocytopenia or thrombocytosis due to primary haematological disorders. *Thromb. Res.*, **132**(5), 572–577. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.09.009
12. *Nishiura N., Kashiwagi H., Akuta K., Hayashi S., Kato H., Kanakura Y., Tomiyama Y.* (2020) Reevaluation of platelet function in chronic immune thrombocytopenia: impacts of platelet size, platelet-associated anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 antibodies and thrombopoietin receptor agonist. *Br. J. Haematol.*, **189**(4), 760–771. DOI: 10.1111/bjh.16439
13. *Ignatova A.A., Suntsova E.V., Pshonkin A.V., Martyanov A.A., Ponomarenko E.A., Polokhov D.M., Fedorova D.V., Voronin K.A., Kotskaya N.N., Trubina N.M., Krasilnikova M.V., Uzueva S.Sh., Serkova I.V., Ovsyannikova G.S., Romanova K.I., Hachtryan L.A., Kalinina I.I., Matveev V.E., Korsantiya M.N., Smetanina N.S., Evseev D.A., Sadovskaya M.N., Antonova K.S., Khoreva A.L., Zharkov P.A., Shcherbina A., Sveshnikova A.N., Maschan A.A., Novichkova G.A., Panteleev M.A.* (2021) Platelet function and bleeding at different phases of childhood immune thrombocytopenia. *Sci. Rep.*, **11**, 9401. DOI: 10.1038/s41598-021-88900-6
14. *Skipper M.T., Rubak P., Stentoft J., Hvas A.-M., Larsen O.H.* (2018) Evaluation of platelet function in thrombocytopenia. *Platelets*, **29**(3), 270–276. DOI: 10.1080/09537104.2017.1296566
15. *Psaila B., Bussel J.B., Linden M.D., Babula B., Li Y., Barnard M.R., Tate C., Mathur K., Frelinger A.L., Michelson A.D.* (2012) *In vivo* effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation. *Blood*, **119**(17), 4066–4072. DOI: 10.1182/blood-2011-11-393900
16. *Panzer S., Rieger M., Vormittag R., Eichelberger B., Dunkler D., Pabinger I.* (2007) Platelet function to estimate the bleeding risk in autoimmune thrombocytopenia. *Eur. J. Clin. Invest.*, **37**(10), 814–819. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2007.01855.x
17. *Bowles K.M., Cooke L.J., Richards E.M., Baglin T.P.* (2005) Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia. *Clin. Lab. Haematol.*, **27**(6), 370–373. DOI: 10.1111/j.1365-2257.2005.00726.x
18. *Kaito K., Otsubo H., Usui N., Yoshida M., Tanno J., Kurihara E., Matsumoto K., Hirata R., Domitsu K., Kobayashi M.* (2005) Platelet size deviation width, platelet large cell ration, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.*, **128**(5), 698–702. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05357.x
19. *Borkataky S., Jain R., Gupta R., Singh S., Krishan G., Gupta K., Kudesia M.* (2009) Role of platelet volume indices in the differential diagnosis of thrombocytopenia: a simple and inexpensive method. *Hematology*, **14**(3), 182–186. DOI: 10.1179/102453309X426182
20. *Khaspekova S.G., Shustova O.N., Golubeva N.V., Vasiliev S.A., Mazurov A.V.* (2015) Relationships of mean platelet volume and plasma thrombopoietin with glycofocalin levels in thrombocytopenic patients. *Acta Haematol.*, **133**(3), 295–299. DOI: 10.1159/000362531
21. *Kienast J., Schmitz G.* (1990) Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood*, **75**(1), 116–121.
22. *Ault K.A., Rinder H.M., Mitchell J., Carmody M.B., Vary C.P., Hillman R.S.* (1992) The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am. J. Clin. Pathol.*, **98**(6), 637–646. DOI: 10.1093/ajcp/98.6.637

23. Kurata Y., Hayashi S., Kiyoi T., Kosugi S., Kashiwagi H., Honda S., Tomiyama Y. (2001) Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycofibrin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am. J. Clin. Pathol.*, **115**(5), 656–664. DOI: 10.1309/RAW2-0LQW-8YTX-941V
24. Abe Y., Wada H., Sakakura M., Nishioka J., Tomatsu H., Hamaguchi Y., Oguni S., Shiku H., Nobori T. (2005) Usefulness of fully automated measurement of reticulated platelets using whole blood. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, **11**(3), 263–270. DOI: 10.1177/107602960501100304
25. Bodrova V.V., Shustova O.N., Khaspekova S.G., Mazurov A.V. (2022) Platelet reticulated forms, size indexes and functional activity. *Interactions in healthy volunteers. Platelets*, **33**(3), 398–403. DOI: 10.1080/09537104.2021.1922659
26. Rodeghiero F., Michel M., Gernsheimer T., Ruggeri M., Blanchette V., Busse J.B., Cines D.B., Cooper N., Godeau B., Greinacher A., Imbach P., Khellaf M., Klaassen R.J., Kühne T., Liebman H., Mazzucconi M.G., Newland A., Pabinger I., Tosetto A., Stasi R. (2013) Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group. *Blood*, **121**(14), 2596–2606. DOI: 10.1182/blood-2012-07-442392
27. Khaspekova S.G., Shustova O.N., Golubeva N.V., Naimushin Y.A., Larina L.E., Mazurov A.V. (2019) Circulating antiplatelet antibodies in pregnant women with immune thrombocytopenic purpura as predictors of thrombocytopenia in the newborns. *Platelets*, **30**(8), 1008–1012. DOI: 10.1080/09537104.2018.1557615
28. Bierling P., Bettaieb A., Fromont P., Favrin M., Duedari N. (1994) Anti-GMP140 (CD62) autoantibody in a patient with autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.*, **87**(3), 631–633. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb08327.x
29. Бодрова В.В., Шустова О.Н., Хаспекова С.Г., Мазуров А.В. (2023) Лабораторные маркеры продукции и оборота тромбоцитов. *Успехи биологической химии*, **63**, 79–102. [Bodrova V.V., Shustova O.N., Khaspekova S.G., Mazurov A.V. (2023) Laboratory markers of platelet production and turnover. *Biochemistry (Moscow)*, **88**(Suppl. 1), S39–S51.] DOI: 10.1134/S0006297923140031

Поступила в редакцию: 25.06.2025.  
 После доработки: 04.07.2025.  
 Принята к печати: 07.07.2025.

## PLATELET FUNCTIONAL ACTIVITY IN PATIENTS WITH IMMUNE THROMBOCYTOPENIA

V.V. Bodrova<sup>1\*</sup>, S.G. Khaspekova<sup>1</sup>, O.N. Shustova<sup>1</sup>, N.V. Tsvetaeva<sup>2</sup>, A.V. Mazurov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chazov National Medical Research Center of Cardiology,  
 15a Academician Chazov str., Moscow, 121552 Russia; \*e-mail: malysheva-valeri@mail.ru

<sup>2</sup>National Medical Research Center of Hematology, 4 Novy Zykovsky Proezd, Moscow, 125167 Russia

Immune thrombocytopenia (ITP) is one of the most common causes of decreased platelet count. Bleeding is the main clinical symptom of ITP; although its severity correlates with the depth of thrombocytopenia, it may also depend on changes in the functional activity of platelets. In this study we have compared platelet functional activity in healthy volunteers (HV) and in ITP patients, as well as in groups of ITP patients with different levels of bleeding. The study included 65 HV and 84 ITP patients. Platelet activity was assessed by flow cytometry. Platelets were activated with thrombin receptor activating peptide (TRAP) or ADP, and the exposure of activation markers, activated form of glycoprotein (GP) IIb-IIIa and alpha-granule membrane protein P-selectin, was determined on their surface by measuring the binding of PAC-1 and CD62P antibodies, respectively. Platelet-associated IgG (PA-IgG, an indicator of the level of antiplatelet autoantibodies), the percentage of “young” reticular platelets (RP, %) and platelet light scatter (an indicator of their size) were also assessed using flow cytofluorimetry. Platelet binding of PAC-1 (and, to a lesser extent, CD62P binding) was lower in ITP patients than in HV. In ITP patients, PAC-1 binding inversely correlated with the PA-IgG content. In contrast to HV, in ITP patients, PAC-1 and CD62P binding did not directly correlate with the platelet size and RP, %. In ITP patients with severe bleeding, the platelet count was lower, PAC-1 and CD62P binding was reduced and PA-IgG and RP, % levels were increased. Thus, a decrease in the content of activation markers on the platelet surface was registered in ITP patients; it was more pronounced in patients with severe bleeding. It is suggested that the cause of this decrease may be due to the effect of autoantibodies (PA-IgG) on platelets, and in particular on GP IIb-IIIa.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

**Keywords:** immune thrombocytopenia; platelet function; platelet antibodies; reticular platelets; platelet size; bleeding

**Funding.** This study was supported by the grant from the Russian Ministry of Health (project No. 124020200125-3).

Received: 25.06.2025; revised: 04.07.2025; accepted: 07.07.2025.