

Paveldimų trombocitų funkcijos sutrikimų laboratorinės diagnostikos algoritmas

Gintarė Surplytė¹, Aušra Janiulionienė¹, Mantas Radzevičius²,
Miglė Janeliūnienė¹, Rėda Matuzevičienė²

¹Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centras

Center of Laboratory Medicine, Vilnius University Hospital Santaros Klinikos

²Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra

Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University

El. paštas: gintare.surplyte@santa.lt

Santrauka

Trombocitai – mažos cirkuliuojančios bebranduolės plokštelės, kurios atlieka esminį vaidmenį tinkamai inicijuojant hemostazę. Bet kurio žingsnio, inicijuojančio trombocitų sąveiką su kraujagyslės sienele ir reguliuojančio trombocitų aktyvaciją, defektas sukelia krešulio susidarymo sutrikimą ir lemia nenormalų kraujavimą. Paveldimi trombocitų sutrikimai yra heterogeninė retų ligų grupė, kuriai gali būti būdinga ne tik sutrikusi trombocitų funkcija, bet ir sumažėjęs trombocitų skaičius. Tikrasis šių sutrikimų

paplitimas gali būti nepakankamai įvertintas, kadangi sunkius sutrikimus diagnozuoti gana lengva, tačiau jie yra reti, o lengvesnius sutrikimus apibūdinti sunkiau ir tikėtina, kad jie yra dažnesni, nei manyta anksčiau. Šios apžvalgos tikslas – aptarti geriausiai žinomus metodus, pasitelkiamus tiriant pacientus, kuriems įtariamas paveldimas trombocitų funkcijos sutrikimas.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Atlikta literatūros apžvalga *PubMed*, *ScienceDirect*, *ResearchGate* ir *Google Scholar* duomenų bazėse.

Išvados. Galimo trombocitų kilmės kraujavimo sutrikimo vertinimas ir diagnozės patvirtinimas laipsniškai rutuliojasi nuo Tarptautinės trombozės ir hemostazės draugijos patvirtinto kraujavimo vertinimo įrankio taikymo, pradinių tyrimų, tokių kaip paprasčiausias bendras hematologinis tyrimas, iki sudėtingų genetinių tyrimų. Ir nors kai kurie diagnostikai rekomenduojami tyrimai atliekami tik specializuotose laboratorijose ar juos vis dar reikia standartizuoti bei atlikti išsamesnius tyrimus diferencijuojant sutrikimus, visų jų rezultatai prisideda prie trombocitų funkcijos defekto apraiškos apibūdinimo ir galutinės diagnozės suformulavimo.

Reikšminiai žodžiai: trombocitai, kraujavimo sutrikimai, trombocitų funkcijos tyrimai.

ĮVADAS

Trombocitai – mažos cirkuliuojančios bebranduolės plokštelės, kurios atlieka esminį vaidmenį tinkamai inicijuojant hemostazę. Bet kurio žingsnio, inicijuojančio trombocitų sąveiką su kraujagyslės sienele ir reguliuojančio trombocitų aktyvaciją, defektas sukelia krešulio susidarymo sutrikimą ir lemia nenormalų kraujavimą. Paveldimi trombocitų sutrikimai (angl. *Inherited platelet disorders* – IPD) yra heterogeninė retų ligų grupė, kuriai gali būti būdinga ne tik sutrikusi trombocitų funkcija, bet ir sumažėjęs trombocitų skaičius. Jų klinikinė reikšmė labai skiriasi priklausomai nuo konkrečios ligos ir netgi to paties tipo – nuo beveik nereikšmingos iki pavojingos gyvybei, todėl ankstyva ir tiksli diagnozė yra be galo svarbi. Tikrasis šių sutrikimų paplitimas nėra žinomas, ir nors manoma, kad siekia nuo 2 iki 3 iš 100 000 asmenų [1], tačiau gali būti nepakankamai įvertinti, kadangi sunkius sutrikimus diagnozuoti gana lengva, tačiau jie yra reti, o lengvesnius sutrikimus apibūdinti sunkiau ir tikėtina, kad jie

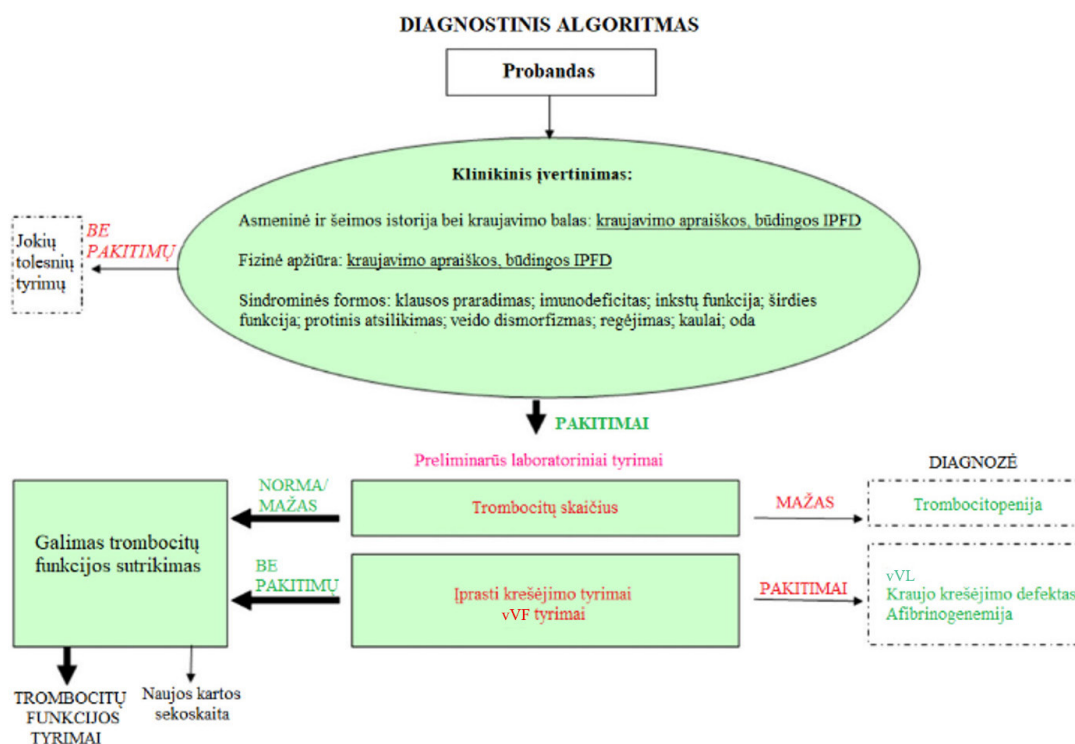
yra dažnesni, nei manyta anksčiau. Dėl to lengvi sutrikimai gali likti nepastebėti, nebent šeiminė kraujavimų anamnezė paskatins anksti atlikti tyrimus arba kol hemostazinis iššūkis (pvz. operacija) nesukels kraujavimo. Visgi, per pastaruosius kelis dešimtmečius buvo padaryta didelė pažanga gerinant IPD diagnostiką, pradedant kraujavimo istorijos įvertinimu ir baigiant genetiniais tyrimais, suteikiančiais svarbių įžvalgų apie įvairių paveldimų patologijų priežastis. Šios apžvalgos tikslas – aptarti gerai žinomus metodus, pasitelkiamus tiriant pacientus, kuriems įtariamas paveldimas trombocitų funkcijos sutrikimas.

Anamnezės surinkimas

Pacientų, kuriems įtariamas trombocitų kilmės kraujavimo sutrikimas, diagnostikos algoritmo pirmoji ir paradoksaliai sunkiausia užduotis yra įvertinti, ar pasireiškiantis kraujavimas atsirado dėl paveldimos būklės, susijusios su įgimtu molekulinio defektu, ar gali būti susijęs su įgyta

disfunkcija (1 pav.). Kadangi fiziologinį ir pataloginį kraujavimą atskirti dažnai yra sudėtinga, buvo sukurta keletas kiekybinių polinkio į kraujavimą vertinimo klausimynų, vadinamų kraujavimo vertinimo įrankiais (angl. *Bleeding assesment tool* – BAT), siekiant standartizuoti kraujavimo istorijos rinkimą, pagerinti diagnostikos tikslumą ir jautrumą, tiksliau apibūdinti simptomų sunkumą ir galbūt numatyti būsimą kraujavimo riziką. 2005 m. buvo paskelbtas pirmasis toks BAT, pavadintas Vičencos kraujavimo klausimynu. Tai – pusiau kiekybinė priemonė, pagrįsta standartizuotu klausimynu, skirtu nustatyti reikšmingiems kraujavimo pasireiškimams, dėl kurių reikėtų atlikti tolesnius laboratorinius

tyrimus, kad būtų galima tiksliai diagnozuoti 1 tipo von Vilebrando ligą (vVL) [2]. Bėgant metams šis BAT buvo modifikuotas, o 2010 m. paskelbtas patobulintas Tarptautinės trombozės ir hemostazės draugijos (angl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis* – ISTH) BAT [3]. Nors pirminiuose tyrimuose pagrindinis dėmesys buvo skiriamas vVL sergantiems pacientams ar moterims, kurioms būdinga menoragija [4, 5], vėliau įrodyta, kad jis gali būti naudingas ir skiriant paveldimu trombocitų funkcijos sutrikimu (angl. *Inherited platelet function disorder* – IPFD) sergančius pacientus nuo sveikų kontrolinių asmenų ar net paveldimų trombocitopenijų atvejų [6].



1 pav. Trombocitų funkcijos sutrikimų laboratorinės diagnostikos algoritmas. Adaptuota iš [7]

Fig 1. Algorithm for laboratory diagnosis of platelet function disorders. Adapted from [7]

Dabar galiojantį kraujavimo vertinimo klausimyną apima tipinių 14 kraujavimo simptomų, kurie vertinami skale nuo 0 iki 4 balų [3]. Jei ISTH-BAT klausimynas nenaudojamas, pataloginį kraujavimą galima įtarti, kai pasireiškiantis kraujavimas yra pasikartojantis, užsitęsęs, savaiminis, pasireiškia po chirurginių intervencijų ar traumų ir yra sunkesnis nei pažeidimas, kraujuojama iš kelių vietų, kraujavimas sukelia anemiją ir (ar) reikalauja medicinos pagalbos. Be to, kai kurie IPFD yra susiję su lengvu kraujavimu, kuris nesiekia ISTH-BAT teigiamumo slenksčio (≥ 4 vyrams, ≥ 6 moterims ir ≥ 3 vaikams [8]). Tokiu atveju koreliacija su klinikiu vaizdu, ypač papildomais sindrominiais požymiais, yra labai svarbi. Pavyzdžiui, su *MYH9* genu susijusioms ligoms gali būti būdingi klausos defektai, nefritas ir (ar) katarakta, *Wiskott–Aldrich* sindromas siejasi su egzema ir padidėjusiu jautrumu infekcijoms [9], mutacijos *RUNX1* gene – su mielodisplazinių sindromų ar ūminių mieloleukemijų atvejais [10].

Į klausimyną neįtraukta informacija apie šeimos anamnezę, kuri dažnai suteikia papildomos informacijos, ypač jei

šeimos nariams yra buvę hemoraginių simptomų ir požymių, susijusių su žiniomis apie pakitusį trombocitų skaičių ar funkciją. Tiesa, šeimos anamnezė gali būti neinformatyvi (neigima) ir klaidinanti sporadinių mutacijų atveju.

Įvairios natūralios ar sintetinės molekulės gali sukelti trombocitų funkcijos sutrikimą, tad norint atmesti įgytą trombocitų disfunkciją, kuri pasireiškia dažniau nei paveldimi defektai, reikalinga išsami informacija apie specifinių maistinių medžiagų ar preparatų vartojimą. Alkoholis [11] ar tokie maistiniai komponentai, kaip kofeinas, česnakai ir ciberžolė, gali turėti įtakos trombocitų funkcijai, jei reguliariai vartojami didelėmis dozėmis, pavyzdžiui, kaip maisto papildai [12]. Paprastai maistinių medžiagų įtaka trombocitų funkcijai labai skiriasi tarp asmenų, o ir daugumos jų įtaka trombocitų funkcijai vis dar išlieka prieštaringa arba nepakankamai apibūdinta.

Medicininės būklės, sukeliančios įgytą trombocitų disfunkciją, apima hematologines sąlygas, turinčias įtakos megakariopoezei (mieloproliferacinės ligos) [13], būklės,

kai baltymai trukdo prisijungti prie trombocitų receptorių (paraproteinemija) [14], organų pažeidimus (inkstų nepakankamumas) [15] ir sumažėjusią trombocitų funkciją po trombocitų aktyvacijos, kuri atsiranda arba *in vivo* (dėl traumos ar širdies vožtuvų ydų) [16], arba *ex vivo* (atliekant ekstrakorporinę membraninę oksigenaciją) [17].

Pirminis laboratorinis ištyrimas

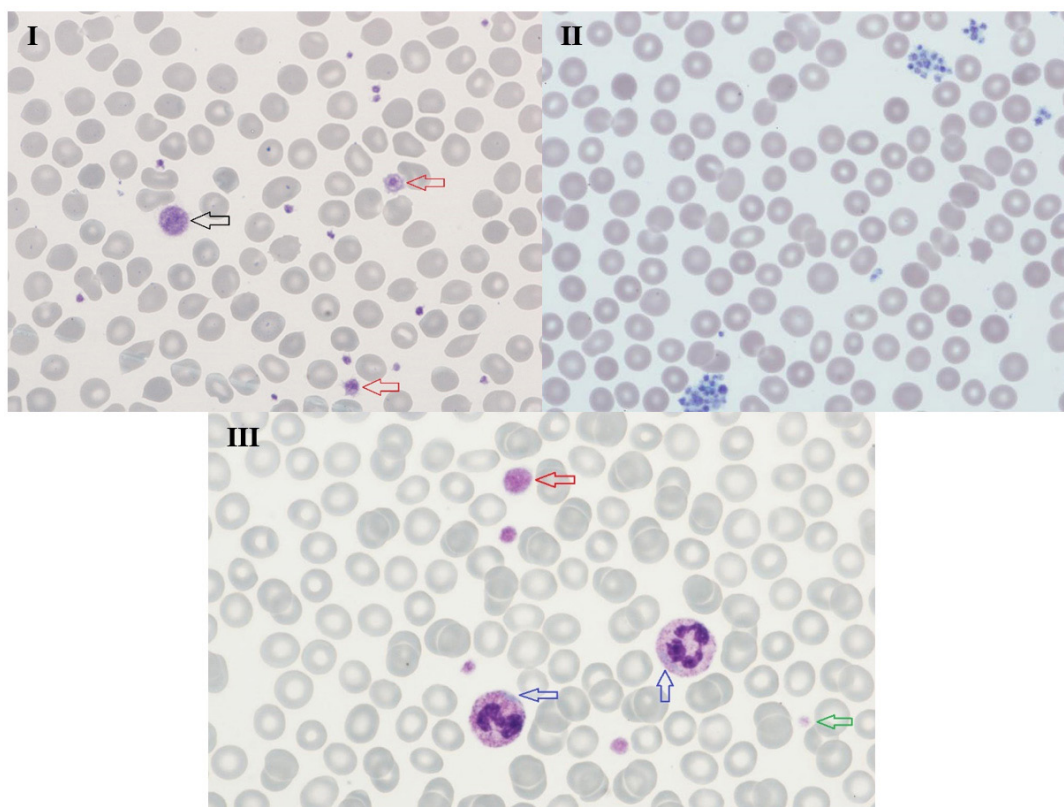
Jei klinikinis įvertinimas ir (ar) kraujavimo balas rodo aiškių nukrypimų nuo normos, kurie išlieka atmetus galimas įgytų kraujavimo sutrikimų priežastis, probandui atliekami pradiniai preliminarūs laboratoriniai tyrimai: protrombino laiko, aktyvinto dalinio tromboplastino laiko, trombino laiko, fibrinogeno matavimai bei XIII faktoriaus tyrimai, kas gali padėti įvertinti galimus koaguliacijos kelių defektus, o von Vilebrando faktoriaus (vVF) antigeno ir jo aktyvumo bei ristocetino kofaktoriaus aktyvumo vertinimas svarbus įtariant vVL [18].

Bendras hematologinis tyrimas ir periferinio kraujo tepinėlio vertinimas

Bendras hematologinis tyrimas, atliekamas automatiniais hematologiniais analizatoriais, yra vienas paprasčiausių ir dažniausiai naudojamų tyrimų klinikinėje praktikoje, kurio atlikimu pradedamas veikiausiai visų ligų ištyrimas. Automatiniai hematologiniai analizatoriai leidžia greitai, lengvai ir nebrangiai nustatyti periferiniame kraujyje cirkuliuojančių trombocitų skaičių, taip pat ir įvairius trombocitų rodiklius: vidutinį trombocitų tūrį (MPV), trombocitų pasiskirstymą pagal dydį (PDW), didelių trombocitų skaičiaus santykį su bendru trombocitų skaičiumi (P-LCR), trombocritą (PCT) ir nesubrendusių trombocitų frakciją (IPF). Remiantis šiais rodikliais jau galima numatyti esant galimą trombocitų tipo sutrikimą. Pavyzdžiui, remiantis tyrimu įrodyta, jog MPV >12,4 fL yra 83 % jautrus ir 89 % specifinis skiriant IPFD nuo imuninės trombocitopenijos [19]. Taip pat žinoma, jog IPF vertė esant IPFD paprastai būna didesnė, palyginti su imunine trombocitopenija ir kitomis trombocitopenijomis [20].

Ir nors bendras hematologinis tyrimas suteikia informacijos apie trombocitų skaičių ir dydį, ji gali būti netiksli. Kiekvienu nepaaiškinamos trombocitopenijos ar trombocitozės, trombocitų dydžio ar pasiskirstymo anomalijų atveju būtina iširti periferinio kraujo tepinėlį. Pirmiausia į morfologinę analizę turi būti įtrauktas trombocitų skaičiaus įvertinimas, siekiant patvirtinti hematologiniais analizatoriais nustatytą trombocitų skaičių ir atmesti galimas klaidingai mažo ar klaidingai padidėjusio trombocitų skaičiaus priežastis. Antrasis periferinio kraujo tepinėlio vertinimo žingsnis yra nustatyti trombocitų dydį ir morfologines savybes, o tai taip pat gali padėti gauti informacijos apie pagrindinę sumažėjusio ar padidėjusio trombocitų skaičiaus priežastį. Paprastai vertinant periferinio kraujo tepinėlius trombocitų dydį galima nesunkiai interpretuoti lyginant trombocitų skersmenį su raudonųjų kraujo kūnelių skersmeniu. Trombocitai, siekiantys eritrocitų dydį (3–7 μ m), vadinami dideliais arba makrotrombocitais, o trombocitai, dydžiu

pranokstantys net raudonuosius kraujo kūnelius (t. y. didesni nei 7, iki 20 μ m), yra vadinami gigantiškais trombocitais. Sveiki asmenys paprastai turi mažiau nei 5 % didelių trombocitų [21]. Varijuojantis trombocitų dydis rodo trombocitų anizocitozę, kuri naujagimiams yra ryškesnė nei suaugusiems individams, nes gimstant atsiranda didesnio dydžio trombocitų. Atliekant diagnostinį tyrimą pacientui, sergančiam trombocitopenija, trombocitų dydis turi diagnostinę reikšmę. Trombocitopenija su mažais trombocitais rodo, kad gali būti sutrikusi trombocitų gamyba kaulų čiulpuose, pvz. aplazinės anemijos, megaloblastinės anemijos ar kaulų čiulpų infiltracijos atvejais, o didesnė tikimybė, kad bus didelių trombocitų, yra susijusi su padidėjusia trombocitų apykaita ir gali reikšti tokius sutrikimus kaip imuninė trombocitopenija ar trombozinė mikroangiopatija [22]. Be to, tiek mažus, tiek didelius trombocitus galima pastebėti esant paveldimoms trombocitopenijoms. Galimos tam tikros įgytos trombocitų morfologijos anomalijos, pavyzdžiui, sergant mielodisplaziniu sindromu. Kai kurios nepiktybinės būsenos taip pat gali rodyti sutrikusią trombocitų morfologiją, ypač hipogranuliaciją. Degranuliacija *in vitro* gali atsirasti dėl sunkios flebotomijos, širdies ir plaučių šuntavimo arba gali būti sukelta etilendiamintetraacetato (EDTA) [23]. Hipogrudėtumas gali rodyti ir bent kelias paveldimų trombocitų sutrikimų formas esant trombocitopenijai bei normalaus dydžio arba padidėjusiems trombocitams, tačiau tokios ligos nėra dažnos. Pavyzdžiui, pilkųjų trombocitų sindromui būdingi trombocitai yra dideli, tačiau juose beveik visiškai nėra α -granulių, todėl tokios ląstelės atrodo pilkos ir blyškios [24]. Hipogrudėtų trombocitų taip pat gali būti esant kitiems paveldimiems sutrikimams, pvz. Chediak–Higashi, Hermansky–Pudlak ir Griscelli sindromams dėl tankių granulių sumažėjimo arba trūkumo ir pan. [22]. Gigantinių α -granulių buvimas gali rodyti Paris–Trousseau trombocitopeniją. Galimi ir kitokie morfologiniai pokyčiai. Pavyzdžiui, su GATA1 genu susijusių ligų atvejais pacientų trombocituose pastebimos ryškios vakuolės. Trombocitų sancaupų buvimas, nepaisant visų pastangų išvengti trombocitų aktyvacijos ruošiant kraujo tepinėlius, gali rodyti 2B tipo arba trombocitų tipo vVL [24]. Be to, kai kurie kitų periferinių kraujo ląstelių morfologiniai pokyčiai gali būti labai naudingi radiniai diferencijuojant įvairius IPD. Tarp paveldimų trombocitopenijų išpūdingiausi morfologiniai pokyčiai pastebimi su MYH9 genu susijusių ligų atvejais. Pavyzdžiui, esant May–Hegglin anomalijai neutrofilų periferijoje aptinkami dideli, šviesiai mėlyni, verpstės formos citoplazminiai intarpai. Esant kitiems sindromams, kuriems būdingas neutrofilų intarpų susidarymas (pvz. Fechtner ir Sebastian sindromai), citoplazminiai intarpai yra mažesni, blyškūs ir jų daugiau [22]. Tiriamiesiems, kurių trombocitai yra blyškūs, raudonųjų kraujo kūnelių anizopoikicitozės radimas gali patvirtinti su GATA1 genu susijusių ligų įtarimą. Eritrocitų, primenančių burną (t. y. stomatocitų), buvimas ir trombocitų makrocitozė gali rodyti sitosterolemiją [24]. Trombocitų ypatybės vertinant šviesiniu mikroskopu vaizduojamos 2 paveiksle.



2 pav. Trombocitų ypatybės vertinant šviesiniu mikroskopu. I vaizdas: trombocitų anizocitozė; gigantinis trombocitas (juoda rodyklė), dideli trombocitai (raudonos rodyklės). II vaizdas: trombocitų sankaupos. III vaizdas: hipogrūdėtas trombocitas (žalia rodyklė), citoplazminiai intarpai neutrofilų periferijoje (mėlynos rodyklės) (1000×, Wright–Giemsa dažymas)

Fig 2. Characteristics of platelets as assessed by light microscopy. Image I: platelet anisocytosis; giant platelet (black arrow), large platelets (red arrows). Image II: platelet aggregates. Image III: hypogranular platelet (green arrow), cytoplasmic inclusions in the periphery of neutrophils (blue arrows) (1000×, Wright–Giemsa staining)

Atrankiniai tyrimai

Kraujavimo laikas

Trombocitų funkcijos tyrimai prasidėjo 1910 metais, kai Duke pristatė kraujavimo laiko įvertinimą, atlikęs nedidelį pjūvį ausies lezgelio odoje ir registruodamas laiką, kurio reikia, kad pjūvio vietoje susidarytų krešulys ir sustabdytų kraujo tekėjimą [25]. Tai buvo pirmasis bandymas įvertinti trombocitų gebėjimą suformuoti kamštį ir daugelį metų išliko unikaliu atrankiniu testu įgimtiems ar įgytiems trombocitų sutrikimams nustatyti. Pailgėjęs kraujavimo laikas teoriškai gali rodyti vVL, funkcinį trombocitų sutrikimą arba kraujagyslių sutrikimą, pvz. skorbutą ar vaskulitą. Tačiau kraujavimo laiko vertinimui šiuo būdu įtakos turi įvairūs kintamieji, pvz. odos storis pradūrimo vietoje, žaizdos dydis ir gylis, – visa tai trukdo tiksliai interpretuoti tyrimo rezultatus. Dėl šių priežasčių kraujavimo laiko vertinimas ilgainiui tapo nerekomenduojamu laboratoriniu tyrimu [26].

Trombocitų funkcijos tyrimai

Trombocitų funkcijos analizatorius (angl. *Platelet function analyzer*) PFA-100 ir neseniai atnaujinta jo versija PFA-200 yra greitai, pusiau automatiniai ir paprasti

prietaisai, kuriais matuojama su trombocitais susijusi pirminė hemostazė visame kraujyje didelio šlyties srauto sąlygomis [27]. Pacientams, sergantiems sunkiais trombocitų funkcijos sutrikimais, pastebimas ilgesnis vadinamasis „uždarymo“ laikas, tačiau jis nėra jautrus lengvesniems trombocitų funkcijos sutrikimams, tad esant tam tikram klinikiniam įtarimui gali būti reikalingi papildomi tyrimai. Be to, rezultatams įtakos turi vVF lygis, mažas hematokritas (<25 %) ir mažas trombocitų skaičius (<50 × 10⁹/l) [28]. Nepaisant to, šis prietaisas vis dar naudojamas daugelyje diagnostikos laboratorijų visame pasaulyje, greičiausiai dėl plataus prieinamumo, mažos kainos, automatizavimo ir greito apdorojimo. Nors šis tyrimas yra labai paplitęs, jis nėra įtrauktas į rekomenduojamų įtariamų IPFD patikros tyrimų grupę dėl nepakankamo specifiškumo ir jautrumo bei mažo atkuriamumo, todėl turėtų būti neprivalomas [29].

Neseniai buvo sukurta nauja PFA kasetė, kurios membrana yra padengta adenosino difosfatu (ADP), joniniu kalciumu ir prostaglandinu E1. Tyrimas buvo atliekamas pacientams, gydomiems klopidoogreliu, tačiau jis naudingas ne tik P2Y12 inhibitorių stebėsenai, bet ir yra jautrus vidutinio sunkumo / sunkiems įgimtiems P2Y12 defektams [30].

Diagnostiniai tyrimai

Šviesos pralaidumo agregometrija

Šviesos pralaidumo agregometrija (angl. *Light transmission aggregometry* – LTA) yra vienas plačiausiai naudojamų trombocitų funkcijos tyrimų, atliekamas dažniausiai naudojant trombocitais papildytą plazmą su įvairiais trombocitų agonistais – epinefrinu, ADP, kolagenu, arachidono rūgštimi ir ristocetinu. Remiantis ISTH gairėmis, galima pasitelkti ir išplėstinį agonistų rinkinį, papildomai naudojant, pavyzdžiui, trombino receptorių aktyvinantį peptidą. LTA matuoja agonistų sukeltus optinio tankio ar drumstumo pokyčius trombocitais papildytoje plazmoje. Agregacija vertinama atsižvelgiant į daugybę parametru, įskaitant gautos vaizdinės kreivės formos pasikeitimą, *lag* fazę, nuolydį, antrinės bangos buvimą, maksimalią agregacijos amplitudę ir kreivės grįžtamumą. Remiantis visais šiais aspektais

užregistruotas trombocitų agregacijos modelis gali būti būdingas tam tikriems sutrikimams ir pakreipti diagnozę specifinių IPFD linkme (žr. lentelę). Visgi rezultatus derėtų vertinti atsižvelgiant ir į paciento anamnezę, kadangi, pavyzdžiui, kraujo sąlytis su dirbtinėmis membranomis, naudojamomis atliekant ekstrakorporinę membraninę oksigenaciją, gali sukelti trombocitų disfunkciją dėl jų aktyvacijos procedūros metu ir dėl to trombocitai „išsenka“. Šių ląstelių agregacijos sutrikimas taip pat nustatomas esant keletui onkohematologinių sutrikimų, pavyzdžiui, sergant lėtine ir ūmine leukemija bei mielodisplaziniu sindromu [29]. Nors šviesos pralaidumo agregometrija ir buvo laikoma auksinio standarto metodu, tačiau paaiškėjo, kad jo tikslumas mažas, o ir esant mažam trombocitų skaičiui ($<150 \times 10^9/l$) rezultatus tampa sudėtinga interpretuoti, taip pat reikalingas palyginti didelis kiekis kraujo (20–50 ml), kurį gali būti sunku paimti vaikams, kuriems įtariama IPD.

Lentelė. Trombocitų agregacijos defektų subklasifikacija. Adaptuota iš [31]

Table. Subclassification of platelet aggregation defects. Adapted from [31]

	ADP	Epinefrinas	Kolagenas	Ristocetinas
<i>Epinefrino receptorių defektas</i>	N	↓	N	N
<i>Glanzmano trombastenija</i>	↓	↓	↓	N ar ↓
<i>Bernardo Soulier sindromas</i>	N	N	N	↓ ar neaptikta
<i>ADP receptorių defektas</i>	↓	N	N	N
<i>Kolageno receptorių defektas</i>	N	N	↓ ar neaptikta	N

ADP – adenosino difosfatas, N – norma, ↓ – sumažėjimas

Tėkmės citometrija

Tėkmės citometrija šiuo metu yra auksinio standarto metodas siekiant įvertinti kiekybinius ramybės būsenos trombocitų paviršiaus glikoproteinų trūkumus pacientams, kuriems įtariami įgyti ar IPD. Šiuo atveju rekomenduojama būdingų GPIIb (CD41, integrino α IIb), GPIIIa (CD61, integrino β 3), GPIIb (CD42b), GPIX (CD42a), GPIa/IIa (α 2 β 1), GPIV ir GPVI žymenų raiškos analizę [32]. Tačiau ši metodika gali būti naudojama ir tiriant trombocitų aktyvacijos pajėgumus po stimuliacijos įvairiais agonistais, kurie susijungę su receptoriais, esančiais šių ląstelių paviršiuje, skatina būdingas fiziologines reakcijas. Galiausiai, tėkmės citometrijos metodas gali būti naudojamas trombocitų prokoaguliaciniam aktyvumui vertinti. Stimuliuojant stipriu agonistu fosfatidilserinas perkeliamas iš vidinio į išorinį trombocitų membranos sluoksnį ir jį paverčia neigiamai įkrautu paviršiumi, kuris palengvina krešėjimo faktorių surinkimą efektyviam trombino susidarymui. Fosfatidilserino ekspozicija ramybės būsenos ir aktyvuotuose trombocituose gali būti įvertinta naudojant didelio afiniteto fluorescencinius zondus (pvz. aneksiną V, laktadheriną) ir taip galima aptikti sutrikusio (Scott sindromas) arba sustiprėjusio (*Stormorken* sindromas) prokoaguliacinio aktyvumo sindromus [29].

Trombocitų funkcijos tyrimas tėkmės citometru turi tam tikrų privalumų, palyginti su kitais laboratoriniais metodais. Pavyzdžiui, tyrimą galima atlikti visame kraujyje, nes tėkmės citometras geba tiksliai atskirti trombocitus nuo eritrocitų ar leukocitų. Nors galima naudoti ir trombocitais papildytą

plazmą ar trombocitų suspensijas, viso kraujo mėginiai turi keletą tokių privalumų, kaip nedidelis tiriamo kraujo kiekis bei išsaugoma fiziologinė būsena. Be to, galimybė tiesiogiai analizuoti trombocitus minimaliai apdorojant mėginius leidžia išvengti artefaktinės aktyvacijos *in vitro* bei sumažina didesnių trombocitų praradimo riziką (pvz. po centrifugavimo ruošiant trombocitais papildytą plazmą). Taip pat tėkmės citometrija yra mažiau jautri trombocitų skaičiui, todėl galima analizuoti trombocitų funkciją net esant trombocitopenijai.

Nepaisant tėkmės citometrijos metodo privalumų tiriant trombocitų funkciją, kyla ir tam tikrų sunkumų, pavyzdžiui, metodui taikyti reikia brangios įrangos ir prieinamų monokloninių antikūnų. Mėginius paruošti taip pat yra gana sudėtinga, tad nekreuoštus darbas gali lemti artefaktus.

Kiti tyrimai

Trombocitų elektroninė mikroskopija yra ypač naudinga nustatant trombocitų sekrecinės funkcijos defektus, nes suteikia galimybę įvertinti trombocitų granules ir nustatyti trombocitų ultrastruktūros pokyčius [33]. Šiuo metu tai yra vienas labiausiai paplitusių laboratorinių tyrimų, naudojamų apibūdinti įvairiems trombocitų defektams, susijusiems su citoskeleto ir granulių anomalijomis (pvz. pilkųjų trombocitų sindromas, *Paris–Trousseau* sindromas, su *MYH9* genu susijusios ligos arba *Wiskott–Aldrich* sindromas), tačiau atliekamas tik specializuotose laboratorijose.

Tromboelastografija, pasitelkiama krešulio susidarymo savybėms matuoti, leidžia įvertinti laiką, per kurį susidaro pirmasis aptinkamas fibrino krešulio lygis, ir krešulio stiprumą,

kuris atspindi trombocitų skaičiaus, trombocitų funkcijos ir fibrinogeno aktyvumo derinį [34]. Tromboelastografija nėra įprastai atliekama siekiant nustatyti trombocitų funkcijos defektus, tačiau ji gali būti naudojama kaip papildomas tyrimas diagnozei patvirtinti.

Genetinė analizė

Pastaraisiais dešimtmečiais naujos kartos sekoskaita sukėlė revoliuciją molekulinės diagnostikos srityje – ji leido nustatyti net ir retus su trombocitų funkcijos sutrikimais susijusius variantus [35]. Tai vis dažniau naudojama diagnostinė priemonė, padedanti ne tik tiksliai diagnozuoti sutrikimą, bet ir atskleisti ligos mechanizmus ir galbūt sudaryti pagrindą naujų gydymo būdų paieškai. Nors kai kuriuos IPFD, pvz. *Wiskott–Aldrich* sindromą ar su *MYH9* genu susijusias ligas, galima gana tiksliai diagnozuoti ir neatlikus genetinių tyrimų, tačiau atsižvelgiant į tai, kad yra aprašyta genotipo ir fenotipo koreliacija, diagnozei patvirtinti rekomenduojama atlikti genetinę analizę. Kartu gali būti atrastos ir naujos žinomo atsakingo geno mutacijos, taip papildant turimas genetinių duomenų bazes. Be to, priežastinio geno varianto nustatymas tampa itin svarbus su padidėjusia piktybinių navikų rizika susijusių sutrikimų (su *ANKRD26* genu ar su *ETV6* genu susiję sutrikimai) atvejais ir esant būklėms, kai klinikinis vaizdas ir laboratoriniai rezultatai nėra tokie informatyvūs ar net painūs, pavyzdžiui, matant neįprastą ligos perdavimą šeimoje, nei paprastai būdingas klasikinėi sutrikimo formai [29]. Dėl šios priežasties genetinių požymių interpretacija gali būti sudėtinga. Tiesą sakant, naujos kartos sekoskaita paprastai leidžia aptikti daugybę nežinomos ar neaiškos klinikinės reikšmės variantų, kurių ryšys su paciento fenotipu yra neaiškus. Iki šiol praneštų didelių atvejų serijų duomenys rodo, kad naujos kartos sekoskaitos būdu galima diagnozuoti beveik 50 % IPD sergančių pacientų, turinčių įgimtą trombocitopeniją, ir beveik 25 % pacientų, kuriems yra IPFD. Apibendrinant, šie duomenys rodo, kad atrinktiems ir gerai charakterizuotiems asmenims tikimybė nustatyti tikslią diagnozę yra labai didelė, tačiau daugeliui pacientų pagrindinė molekulinė IPD priežastis vis tiek gali būti nenustatyta [24]. Dėl to vis dar kyla neišspręstų etinių problemų, susijusių su nežinomos klinikinės reikšmės variantų ir netikėtų genetinių defektų atradimu ir perdavimu pacientui, pavyzdžiui, nustatant variantus, kurie padidina širdies ir kraujagyslių ligų riziką, arba variantus su polinkiu į hematologinį piktybinį naviką. Taigi pacientai turėtų būti iš anksto informuoti ir suprasti galimus tokių genetinių radinių padarinius [36].

Be etinių diskusijų dėl genetinės analizės naudojimo, ji vis dar patiria tokių apribojimų, kaip prieinamumo trūkumas, didelės išlaidos ir kartais sunkumai priskiriant patogeniškumą naujiems nustatytiems variantams [35]. Nepaisant to, būsimas laboratorinis asmenų, turinčių IPFD, įvertinimas tikrai priklausys nuo klinikinų, genetinių, morfologinių ir funkcinių tyrimų derinio.

IŠVADOS

Galimo trombocitų kilmės kraujavimo sutrikimo vertinimas ir diagnozės patvirtinimas laipsniškai rutuliojasi nuo ISTH-BAT balo vertinimo, pradinių tyrimų, tokių kaip

paprasciausias bendras hematologinis tyrimas, iki sudėtingų genetinių tyrimų. Ir nors kai kurie diagnostikai rekomenduojami tyrimai atliekami tik specializuotose laboratorijose ar juos vis dar reikia standartizuoti ir atlikti išsamesnius tyrimus diferencijuojant sutrikimus, visų jų rezultatai prisideda prie trombocitų funkcijos defekto apraiškos apibūdinimo ir galutinės diagnozės formulavimo.

Gauta: 2024 05 20

Priimta spaudai: 2024 05 30

Summary

ALGORITHM FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF INHERITED PLATELET FUNCTION DISORDERS

Gintarė Surplytė, Aušra Janiulionienė, Mantas Radzevičius, Miglė Janeliūnienė, Rėda Matuzevičienė

Platelets, small circulating anucleate cells, play an essential role in the proper initiation of hemostasis. A defect in any of the steps that orchestrate the interaction of platelets with the vessel wall and regulate platelet activation leads to impaired clot formation and results in abnormal bleeding. Inherited platelet disorders are a heterogeneous group of rare diseases that can be characterized not only by impaired platelet function but also by reduced platelet counts. Their true prevalence may be underestimated because severe disorders are relatively easy to diagnose but are rare, while milder disorders are more difficult to characterize and are likely to be more common than previously thought. The purpose of this review is to discuss the best known methods used in the investigation of patients with suspected hereditary platelet dysfunction.

Research material and methods. Literature review was performed in PubMed, ScienceDirect, ResearchGate and Google Scholar databases.

Conclusions. The evaluation and confirmation of a possible platelet-derived bleeding disorder ranges from using the International Society of Thrombosis and Hemostasis-approved bleeding assessment tool, initial tests such as a simple general hematological examination, to complex genetic tests. And although some of the tests recommended for diagnosis are performed only in some specialized laboratories or still require standardization and more detailed tests in differentiating disorders, the results of all of them contribute to the description of the manifestation of the platelet function defect and the formulation of the final diagnosis.

Keywords: platelets, bleeding disorders, platelet function tests.

LITERATŪRA

1. Zaninetti C, Wolff M, Greinacher A. Diagnosing Inherited Platelet Disorders: Modalities and Consequences. *Hamostaseologie* 2021; 41(6): 475488. doi:10.1055/a-1515-0813.
2. Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A, Batlle J, Baudo F, Cappelletti A, et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study [published correction appears in *J Thromb Haemost* 2006 Apr; 4(4): 925]. *J Thromb Haemost* 2005; 3(12): 2619–26. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01663.x.
3. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Collier B, James P, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010; 8(9): 2063–5. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03975.x.
4. Higham JM, O'Brien PM, Shaw RW. Assessment of menstrual blood loss using a pictorial chart. *Br J Obstet Gynaecol* 1990; 97(8): 734–9. doi:10.1111/j.1471-0528.1990.tb16249.x.
5. Philipp CS, Faiz A, Dowling NF, Beckman M, Owens S, Ayers C, et al. Development of a screening tool for identifying women with menorrhagia for hemostatic evaluation. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198(2): 163.e1–163.e1638. doi:10.1016/j.ajog.2007.08.070.
6. Gresele P, Orsini S, Noris P, Falcinelli E, Alessi MC, Bury L, et al. Validation of the ISTH/SSC bleeding assessment tool for inherited platelet disorders: A communication from the Platelet Physiology SSC. *J Thromb Haemost* 2020; 18(3): 732–9. doi:10.1111/jth.14683.
7. Gresele P. Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13(2): 314–22. doi:10.1111/jth.12792.
8. Elbatarany M, Mollah S, Grabell J, Bae S, Deforest M, Tuttle A, et al. Normal range of bleeding scores for the ISTH-BAT: adult and pediatric data from the merging project. *Haemophilia* 2014; 20(6): 831–5. doi:10.1111/hae.12503.
9. Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405–44. doi:10.1080/10408363.2022.2049199.
10. Bellissimo DC, Speck NA. RUNX1 Mutations in Inherited and Sporadic Leukemia. *Front Cell Dev Biol* 2017; 5: 111. doi:10.3389/fcell.2017.00111.
11. Pashek RE, Nkambule BB, Chan MV, Thibord F, Lachapelle AR, Cunha J, et al. Alcohol intake including wine drinking is associated with decreased platelet reactivity in a large population sample. *Int J Epidemiol* 2023; 52(6): 1939–50. doi:10.1093/ije/dyad099.
12. Brennan Y, Levade M, Ward CM. Acquired platelet function disorders. *Thromb Res* 2020; 196: 561–8. doi:10.1016/j.thromres.2019.06.009.
13. Casari C, Bergmeier W. Acquired platelet disorders. *Thromb Res* 2016; 141 Suppl 2: S73–S75. doi:10.1016/S0049-3848(16)30371-1.
14. Djunic I, Elezovic I, Vucic M, Srdic-Rajic T, Konic-Ristic A, Ilic V, et al. Specific binding of paraprotein to platelet receptors as a cause of platelet dysfunction in monoclonal gammopathies. *Acta Haematol* 2013; 130(2): 101–7. doi:10.1159/000345418.
15. Lutz J, Menke J, Sollinger D, Schinzel H, Thürmel K. Haemostasis in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29(1): 29–40. doi:10.1093/ndt/gft209.
16. Sellers SL, Gulsin GS, Zaminski D, Bing R, Latib A, Sathananthan J, et al. Platelets: Implications in Aortic Valve Stenosis and Bioprosthetic Valve Dysfunction From Pathophysiology to Clinical Care. *JACC Basic Transl Sci* 2021; 6(12): 1007–20. doi:10.1016/j.jacbs.2021.07.008.
17. Balle CM, Jeppesen AN, Christensen S, Hvas AM. Platelet Function During Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adult Patients. *Front Cardiovasc Med* 2019; 6: 114. doi:10.3389/fcvm.2019.00114.
18. Daly ME, Leo VC, Lowe GC, Watson SP, Morgan NV. What is the role of genetic testing in the investigation of patients with suspected platelet function disorders? *Br J Haematol* 2014; 165(2): 193–203. doi:10.1111/bjh.12751.
19. Noris P, Klersy C, Zecca M, Arcaini L, Pecci A, Mazzini F, et al. Platelet size distinguishes between inherited macrothrombocytopenias and immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009; 7(12): 2131–6. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03614.x.
20. Ferreira FLB, Colella MP, Medina SS, Costa-Lima C, Fiusa MML, Costa LNG, et al. Evaluation of the immature platelet fraction contribute to the differential diagnosis of hereditary, immune and other acquired thrombocytopenias. *Sci Rep* 2017; 7(1): 3355. doi:10.1038/s41598-017-03668-y.
21. Palmer L, Briggs C, McFadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(3): 287–303. doi:10.1111/ijlh.12327.
22. Robier C. Platelet morphology. *J Lab Med* 2020; 44(5): 231–9.
23. Lesesve JF, Latger-Cannard V, Lecompte T. Pseudo-storage pool disease due to platelet degranulation in EDTA-collected peripheral blood: a rare artifact. *Clin Lab Haematol* 2005; 27(5): 336–42. doi:10.1111/j.1365-2257.2005.00719.x.
24. Zaninetti C, Greinacher A. Diagnosis of Inherited Platelet Disorders on a Blood Smear. *J Clin Med* 2020; 9(2): 539. doi:10.3390/jcm9020539.
25. Duke WW. The pathogenesis of purpura haemorrhagica with especial reference to the part played by the blood platelets. *Arch Intern Med* 1912; 10: 445.
26. Fritsma G. Laboratory evaluation of hemostasis 2020. 10.1016/B978-0-323-53045-3.00050-7.

27. Dovlatova N, Heptinstall S. Platelet aggregation measured by single-platelet counting and using PFA-100 devices. *Platelets* 2018; 29(7): 656–61. doi:10.1080/09537104.2018.1492109.
28. Belkacemi M, Merad Y. Variables that Influence Platelet Function Analyzer-100™ Closure Times in Healthy Algerian Adults. *Int J Appl Basic Med Res* 2021; 11(3): 154–9. doi:10.4103/ijabmr.IJABMR_532_20.
29. Gresele P, Bury L, Mezzasoma AM, Falcinelli E. Platelet function assays in diagnosis: an update. *Expert Rev Hematol* 2019; 12(1): 29–46. doi:10.1080/17474086.2019.1562333.
30. Scavone M, Germanovich K, Femia EA, Cattaneo M. Usefulness of the INNOVANCE PFA P2Y test cartridge for the detection of patients with congenital defects of the platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate. *Thromb Res* 2014; 133(2): 254–6. doi:10.1016/j.thromres.2013.11.022.
31. Borhany M, Pahore Z, Ul Qadr Z, Rehan M, Naz A, Khan A, et al. Bleeding disorders in the tribe: result of consanguineous in breeding. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 23. doi:10.1186/1750-1172-5-23.
32. Rand ML, Reddy EC, Israels SJ. Laboratory diagnosis of inherited platelet function disorders. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(4): 485–93. doi:10.1016/j.transci.2018.07.009.
33. Tomaiuolo M, Litvinov RI, Weisel JW, Stalker TJ. Use of electron microscopy to study platelets and thrombi. *Platelets* 2020; 31(5): 580–88. doi:10.1080/09537104.2020.1763939.
34. Chen A, Teruya J. Global hemostasis testing thromboelastography: old technology, new applications. *Clin Lab Med* 2009; 29(2): 391–407. doi:10.1016/j.cl.2009.04.003.
35. Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidzé M. Advances in Platelet Function Testing-Light Transmission Aggregometry and Beyond. *J Clin Med* 2020; 9(8): 2636. doi:10.3390/jcm9082636.
36. Palma-Barqueros V, Revilla N, Sánchez A, Zamora Cánovas A, Rodríguez-Alén A, Marín-Quílez A, et al. Inherited Platelet Disorders: An Updated Overview. *Int J Mol Sci* 2021; 22(9): 4521. doi:10.3390/ijms22094521.