

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ЦЕНТР ЭКСТРЕННОЙ И РАДИАЦИОННОЙ
МЕДИЦИНЫ ИМ. А.М. НИКИФОРОВА» МЧС РОССИИ

На правах рукописи

ГАБРИЛЬЧАК АНАСТАСИЯ ИВАНОВНА

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ ХРОНИЧЕСКОГО
ТЕЧЕНИЯ ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ
ПУРПУРЫ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Гусякова Оксана Анатольевна**

Санкт-Петербург - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Характеристика мегакариоцитопоеза и тромбоцитобразования	13
1.1.1 Транскрипционное регулирование мегакариоцитопоеза	14
1.1.2 Влияние микроокружения на процесс мегакариоцитопоеза	17
1.1.3 Эндомитоз и образование гранул при мегакариоцитопоезе	20
1.1.4 Образование тромбоцитов	22
1.2 Антигенная и функциональная характеристика тромбоцитов.	
Жизненный цикл тромбоцитов	27
1.2.1 Роль GPIIb/IIIa и других гликопротеинов в клиренсе тромбоцитов	29
1.2.2 Роль лизосомальных гликозидаз в клиренсе тромбоцитов	34
1.2.3 Роль апоптоза в элиминации тромбоцитов	36
1.3 Характеристика тромбоцитопоеза и патогенез при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре	37
1.3.1 Генетические факторы риска развития идиопатической тромбоцитопенической пурпуры	39
1.3.2 Факторы экологического риска	40
1.3.3 Жизненный цикл тромбоцитов при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре	41
1.3.4 Иммунопатологические процессы при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
2.1 Характеристика обследуемого контингента	47
2.1.1 Сбор образцов сыворотки крови	53
2.1.2 Сбор образцов цельной крови	53
2.1.3 Сбор образцов костного мозга	53
2.1.4 Получение миелоплазмы	54
2.2 Используемые методы исследования	54

2.2.1 Миелограмма	54
2.2.1.1 Подсчет миелокариоцитов	54
2.2.1.2 Подсчет мегакариоцитов	54
2.2.1.3 Окраска препаратов костного мозга	55
2.2.1.4 Микроскопическое исследование под малым увеличением	55
2.2.1.5 Подсчет миелограммы с иммерсионным объективом	55
2.2.2 Мегакариоцитограмма	56
2.2.3 Гематологические методы исследования	60
2.2.4 Биохимические методы исследования	62
2.2.5. Электрофоретическое разделение белков	64
2.2.6 Серологические методы исследования	65
2.2.7 Статистическая обработка результатов исследований	66
2.3 Валидация биохимических методик исследования миелоплазмы	67
2.3.1 Эксперимент на определение правильности аналитических методов исследования миелоплазмы. Расчет общей аналитической ошибки.	68
2.3.2 Эксперимент на определение линейности и рабочего диапазона	71
2.3.3 Эксперимент на определение аналитической специфичности методик в миелоплазме	73
2.3.4 Эксперимент на определение прецизионности биохимических методик в миелоплазме.	74
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ РОСТКОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ И РАЗЛИЧНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРОЙ	75
3.1. Результаты исследования миелограмм у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой	75

3.2. Изменения мегакариоцитарного ростка у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой	77
3.3. Результаты исследования общего анализа крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой. Взаимосвязи с мегакариоцитограммой	82
ГЛАВА 4. ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОСТНОГО МОЗГА И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И ПОЛА	87
4.1 Характеристика показателей костного мозга и периферической крови детского и взрослого населения с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой	88
4.2 Характеристика групп детского населения с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой	95
4.3 Характеристика групп взрослого населения с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой	102
4.4 Гендерная вариабельность показателей костного мозга и периферической крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой	103
4.5 Результаты исследования миелограмм, мегакариоцитограмм и биохимических показателей периферической крови у пациентов взрослого населения с хронической формой ИТП	103
ГЛАВА 5. ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ КОСТНОГО МОЗГА (МИЕЛОПЛАЗМЫ) ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРЕ	107
5.1 Биохимический и цитокиновый профиль миелоплазмы у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой	107
5.1.1 Показатели обмена железа в миелоплазме и плазме у пациентов	

с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой	114
5.1.2 Активность аланинаминотрансферазы в миелоплазме пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой	118
5.1.3 Цитокиновый профиль миелоплазмы пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой	120
5.2 Особенности состава миелоплазмы при хронической форме идиопатической тромбоцитопенической пурпуры	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	127
ВЫВОДЫ	156
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	157
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	158
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	161
ПРИЛОЖЕНИЕ	196

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Морфологическое описание костного мозга в настоящее время остается ведущим лабораторным исследованием для пациентов с гематологическими заболеваниями, миелограмма отражает качественный и количественный состав ядросодержащих клеток кроветворной ткани, однако дает неполную информацию о возможных нарушениях гемопоэза (Луговская С.А., Почтарь М.Е., 2018).

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) относится к наиболее частым причинам развития геморрагического синдрома (Морозова В.Т., Авдеева Н.А., 2006). Заболеваемость ИТП в мире у взрослых составляет около 10 на 100 тыс. населения в год (Segal J.B., Powe N.R., 2006; Rodeghiero F., Marranconi E., 2020), а среди детей, по данным разных исследователей, заболеваемость первичной ИТП колеблется от 1,5-2,0 до 13,0 на 100 тыс. детского населения (С.П. Кривова, 2006; К.Б. Волкова, 2010; Shaw J. et al., 2020). Хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура входит в Перечень жизнеугрожающих и хронических прогрессирующих редких (орфанных) заболеваний, которые приводят к сокращению продолжительности жизни граждан или их инвалидности (утверждено постановлением Правительства РФ от 26 апреля 2012 г. № 403 с изменениями и дополнениями от 20 ноября 2018 г. № 1390, 5 июня 2020 г. № 829). Использование стандартного комплексного обследования пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой имеет низкую диагностическую ценность, и этот диагноз остается «диагнозом исключения». В большинстве случаев причину развития ИТП установить не удается (Меликян А.Л. и др., 2017, Бессмельцев С.С., 2020).

Отмечается рост хронической формы болезни, как среди детей, так и среди взрослого населения, наряду с нарастанием частоты тяжелого течения с опасными для жизни кровотечениями (Arnold D.M. 2013; Kubasch A.S. et al., 2020). Таким образом, актуален поиск как новых показателей, так и нового биоматериала. Интерстициальная жидкость костного мозга (миелоплазма) остается мало

изученным биоматериалом (Krashin E. et al., 2017). Существует ряд ограничений исследования миелоплазмы, а именно, сложность получения биоматериала, недостаточность разработки методологии исследования, отсутствие валидированных методик и нехватка накопленных данных о влиянии факторов преаналитического этапа.

В литературе не представлены сведения о прогностической роли тех или иных факторов, влияющих на характер течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Не решены проблемы оценки прогноза течения и исхода ИТП на основании анализа изменений клинико-лабораторных показателей в дебюте заболевания. Совершенствование методов клинической лабораторной диагностики позволит улучшить диагностику заболевания и оценить риск хронизации болезни, что повысит эффективность лечения ИТП.

Степень разработанности темы исследования

Проведенные исследования установили, что идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура является аутоиммунным заболеванием с неизвестной этиологией (Долгов В.В., Свиринов П.В., 2005). Мало изучена возрастная вариабельность показателей мегакариоцитогаммы (Румянцев А.Г., Масчан А.А., 2015; Меликян А.Л., 2017),

На данный момент мало изучен биохимический и цитокиновый состав миелоплазмы. В литературе приводятся разрозненные данные, касающиеся влияния цитокинов на процесс гемопоэза (Iversen P.O., Wiig H., 2005), описания биохимического состава миелоплазмы при миеломной болезни (Krashin E. et al., 2017), протеомного состава миелоплазмы у разных возрастных групп (Wang W. et al., 2010). При этом не разработаны референсные величины для показателей миелоплазмы, не определена диагностическая роль параметров при различных заболеваниях, нет данных по составу интерстициальной жидкости костного мозга при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре.

В научных источниках встречаются единичные сведения о предикторах хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Показано, что более высокое исходное значение показателя среднего объема

тромбоцитов (MPV) может использоваться в качестве прогностического фактора хронического течения ИТП у детей (Lee Y.K. et al., 2021). Отсутствуют сведения о возможных предикторах в центральном звене кроветворения в костном мозге у детей и взрослых.

Цель исследования: выявить лабораторные предикторы развития хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

Задачи исследования:

1. Изучить характер морфофункциональных изменений мегакариоцитарно-тромбоцитарного звена гемопоэза в костном мозге и периферической крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой.

2. Оценить изменения мегакариоцитограммы у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой в зависимости от формы течения заболевания и возраста.

3. Установить аналитические характеристики биохимических методик исследования миелоплазмы – линейность, прецизионность, правильность и аналитическую специфичность.

4. Изучить диагностическую значимость биохимических и иммунологических показателей – содержание ферритина, трансферрина, растворимых рецепторов трансферрина, уровня железа, активности аланинаминотрансферазы, уровни интерлейкинов 6 и 8, эритропоэтина, фактора роста эндотелия сосудов в миелоплазме у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой.

5. Разработать дифференциально-диагностический алгоритм прогнозирования развития хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

Научная новизна

Получены новые данные, раскрывающие возрастные особенности морфофункциональных изменений мегакариоцитарно-тромбоцитарного звена гемопоэза при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре. На основе этих

данных предложено разделение характерных изменений мегакариоцитограмм на 2 типа – детский и взрослый.

Впервые предложен преаналитический стандарт исследования интерстициальной жидкости костного мозга с детализацией этапов пробоподготовки и способа получения миелоплазмы. Проведено определение линейности, прецизионности, правильности и аналитической специфичности для пяти биохимических методик (определение содержания железа, ферритина, трансферрина, растворимых рецепторов трансферрина (sTfR) и активности аланинаминотрансферазы) с целью их валидации для определения возможности тестирования образцов миелоплазмы.

Определена диагностическая значимость исследования показателей миелоплазмы у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой с выделением характерных предикторов хронического течения.

Разработан способ оценки метаболической активности мегакариоцитарного ростка костного мозга (Патент № 2018109674).

На основе выявленных предикторов предложен диагностический алгоритм ведения пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой с выделением группы риска хронизации течения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены новые теоретические знания об интерстициальной жидкости костного мозга, впервые охарактеризованы метаболические показатели (содержание железа, ферритина, трансферрина, растворимых рецепторов трансферрина (sTfR) и активности аланинаминотрансферазы) и уровни цитокинов (интерлейкины 6 и 8, эритропоэтин, фактор роста эндотелия сосудов) в миелоплазме при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре. Валидация биохимических методик миелоплазмы позволяет использовать их для практического применения.

Внесены дополнительные критерии при описании мегакариоцитограммы при ИТП у детей и взрослых, предложена типизация вариантов отклонения показателей мегакариоцитарного ростка.

Предложен новый диагностический алгоритм прогноза хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, использование которого дает возможность дифференцированно подходить к лечению ИТП в гематологических центрах.

Методология и методы исследования

Согласно поставленным целям и задачам была сформирована методология диссертационного исследования, основанная на принципах биоэтики. Методологическая основа диссертационной работы состоит в последовательном применении общенаучных, теоретико-эмпирических и специальных методов научного познания и включает в себя поиск и изучение лабораторных и клинических данных отечественной и зарубежной литературы по диагностике ИТП. Дизайн работы основывается на ретроспективном исследовании и представляет собой комплекс сравнительного клинического и экспериментального исследования с применением современных статистических методов обработки полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Возрастные особенности мегакариоцитопоза отражают различия в ответе костного мозга на аутоиммунную агрессию, что находит проявление в характере типизации мегакариоцитограмм.

2. Определение содержания железа, ферритина, интерлейкина-8 и фактора роста эндотелия сосудов в интерстициальной жидкости костного мозга и плазме крови может использоваться для прогноза хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

3. Применение новой модели прогноза хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры с использованием выявленных предикторов позволяет определить риски развития хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры у юношеской группы и взрослых с чувствительностью 85,25%, специфичностью 93,55% и диагностической точностью 88,0%.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов диссертационного исследования основана на детальном теоретическом анализе данных, соответствии разработанному дизайну, достаточности выборки обследованных (311 пациентов). Использованы современные методы исследования, статистический анализ соответствует поставленным целям и задачам. Результаты работы были представлены и обсуждены на XXI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Качество лабораторных исследований – условие безопасности пациентов» (Москва, 2016); на научно-практической конференции, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета, по теме: «Лабораторная диагностика на этапе обследования и мониторинга лечения пациентов» в рамках тридцать второй образовательной недели (Самара, 2018); IV, V Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2018, 2019); на XVII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 75-летию Южно-Уральского государственного медицинского университета (Челябинск, 2019); на XXIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Лабораторная служба в современных реалиях» (Москва, 2019); на научно-практической конференции «Актуальные вопросы лабораторной медицины» (Самара, 2021).

Публикации по результатам исследования

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 3 в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК России для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 3.3.8 – Клиническая лабораторная диагностика, 3 статьи – в международной базе Scopus, получен 1 патент.

Личный вклад автора

Диссертант непосредственно выполнял все этапы проведения исследования. Совместно с научным руководителем д.м.н., доцентом Гусяковой О.А. проведена формулировка цели и задач, а также разработка дизайна исследования.

Самостоятельно выполнен сбор и анализ зарубежной и отечественной литературы, проведены лабораторные исследования и статистическая обработка результатов, написан текст диссертации. Подготовка публикаций и докладов по теме исследования осуществлялась совместно с сотрудниками кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ. Разработка алгоритма ведения пациентов с ИТП выполнена совместно с врачами-гематологами Самарского областного гематологического центра.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Задачи и научные положения, выносимые на защиту, соответствуют паспорту специальности 3.3.8 – Клиническая лабораторная диагностика, пунктам 1, 2, 3, 7 области исследования паспорта специальности.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследований используются в работе клинико-диагностических лабораторий Клиник Самарского государственного медицинского университета, ГБУЗ «Самарская областная детская клиническая больница имени Н.Н. Ивановой», Тольяттинской городской клинической больницы № 5. Результаты проведенного исследования включены в программу практических занятий и лекционного курса для студентов, ординаторов и врачей клинической лабораторной диагностики на кафедре фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на русском языке в объеме 201 страницы машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, глав собственных исследований (3 главы), а также заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 31 таблицей и 54 рисунками. Список литературы содержит 307 источников, из них 15 отечественных и 292 – зарубежных авторов.

ГЛАВА I

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика мегакариоцитопоэза и тромбоцитобразования

Мегакариоцитопоэз – сложный многоступенчатый процесс, который включает дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток в мегакариоцитарную линию, пролиферацию предшественников, созревание мегакариоцитов и процесс тромбоцитобразования. Поскольку тромбоциты являются вторым по распространенности типом клеток в крови и играют решающую роль в гемостазе и тромбозе, понимание особенностей мегакариопоэза и характера функционирования тромбоцитов имеет важное значение для оценки здоровья человека. Гемопоэтические стволовые клетки представляют собой мультипотентные клетки, которые могут либо самовосстанавливаться, либо дифференцироваться в различные линии кроветворения, в частности, - в общего лимфоидного предшественника (CLP) и общего миелоидного предшественника (CMP). Далее CMP дифференцируется в предшественника гранулоцитов/макрофагов и предшественника мегакариоцитов-эритроцитов (MEP). MEP отвечает за производство мегакариоцитов и эритроцитов в костном мозге. Интересно участие цитохрома P450 2E1 (CYP2E1) в дифференциации клеточных линий костного мозга. Он вовлечен в биоконверсию и биотрансформацию ксенобиотиков у человека, присутствует в основном в клетках печени, но недавно был обнаружен в стволовых кроветворных клетках. Сверхэкспрессия CYP2E1 направляет на мегакариоцитарную линию дифференцировки MEP, а подавление экспрессии – на эритроидную линию (Tang Y. et al., 2014). Далее мегакариоциты подвергаются уникальному процессу созревания до образования тромбоцитов. Этот сложный процесс происходит в специализированных нишах в костном мозге, где мегакариоциты находятся в тесном взаимодействии с эндотелиальными клетками сосудов, образуют выросты протромбоцитов и выделяют тромбоциты в периферическую кровь (Deutsch V.R., Tomer A., 2013).

Поскольку концентраты тромбоцитов, используемые для переливания, имеют короткий срок хранения (4-5 дней) и поставляются добровольными донорами, появляется много данных о получении мегакариоцитов *ex vivo* из разных источников. Сначала получали колонии мегакариоцитов из стволовых клеток с использованием стволовых клеток пуповинной крови (Robert A. et al., 2012), эмбриональных стволовых клеток (Takayama N. et al., 2008), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (Avanzi M.P., Mitchell W.B., 2014) и даже стромальных стволовых клеток эндометрия (Wang J. et al., 2012). Были использованы и более неожиданные источники. Так, получены колонии мегакариоцитов из стромальных клеток костного мозга линии OP9 (Matsubara Y. et al., 2013), стромальных клеток жировой ткани (Ono-Uruga Y. et al., 2016), преадипоцитов линии 3T3-L1 (Matsubara Y. et al., 2010) и фибробластов (Ono Y. et al., 2012). В то же время нерешенным остается вопрос о функциональности выращенных в культуре тромбоцитов. Как известно, тромбоциты играют важную роль не только в реакциях гемостаза, но и в восстановлении стенок сосудов, процессов воспаления и др., и пока неясно, какие из этих нормальных функций способны осуществить выращенные в культуре тромбоциты.

1.1.1. Транскрипционное регулирование мегакариопоэза

Регуляция мегакариопоэза включает в себя как внешние, так и внутренние сигналы, и в конечном итоге контролируется факторами транскрипции. Ряд экспериментов показал, что GATA-1 является центральным регулятором дифференциации и созревании мегакариоцитов. При отсутствии GATA-1 мегакариоциты задерживаются в созревании, проявляют выраженную гиперпролиферацию и продуцируют измененные увеличенные тромбоциты *in vivo* (Orkin S.H et al., 1998). Молекула GATA-1 содержит три области: С-участок, N-участок и активационный домен. С-участок имеет ДНК-связывающий домен, содержащий цинк. N-участок связывается с ДНК и белковым кофактором FOG1. Активационный домен несет ответственность за активацию транскрипции GATA-

1. Анализ гетерозиготных самцов мышей (которые имеют либо активный аллель GATA-1, либо мутантный аллель дикого типа) показал, что GATA-1 необходим для терминальной дифференциации конечных эритроидных и мегакариоцитарных клеток и играет важную роль *in vivo* для направления конечных гемопоэтических предшественников на дифференциацию по эритроидным или мегакариоцитарным путям (Takahashi S. et al., 1998). В исследованиях Pope N.J., Bresnick E.H. (2010) было показано, что GATA-1 участвует в регуляции мегакариопоэза путем связывания с последовательностями нуклеиновых кислот на участках, регулирующих экспрессию генов-мишеней, и либо стимулирует, либо подавляет экспрессию этих генов. Другой транскрипционный белковый кофактор FOG-1 взаимодействует с GATA-1 и стимулирует или ингибирует активность GATA-1 в зависимости от ситуации в клетке. Это взаимодействие имеет решающее значение для дифференциации мегакариоцитов (Wang X. et al., 2002; Tsang A.P. et al., 1997). FOG-1 связывается с NuRD-корцепторным комплексом, который участвует в АТФ-зависимом ремоделировании хроматина, чтобы опосредовать транскрипционную репрессию GATA-1 в процессе мегакариопоэза (Hong W. et al., 2005; Gao Z. et al., 2010), и была обнаружена молекулярная основа этого взаимодействия (Lejon S. et al., 2011). Fli-1 является белком семейства ETS – это мономерные факторы транскрипции, которые связывают последовательность ДНК, богатую пуринами, GGA (A/T). Было показано, что он является одним из основных регуляторов мегакариопоэза (Bastian L.S. et al., 1999). В исследованиях Hart A., Melet F., Grossfeld P. et al. (2000) и Kawada H., Ito T., Pharr P.N. et al. (2001) у мышей, у которых отсутствовал фактор транскрипции Fli-1, развивался дисмегакариоцитопоэз, сокращалось количество мегакариоцитов, что приводило к тромбоцитопении. Дальнейшие исследования показали, что Fli-1 является основным регулятором поздних стадий мегакариоцитарной дифференцировки и может работать вместе с GATA-1 посредством белок-белковых взаимодействий, чтобы активировать экспрессию генов, связанных с терминальной дифференцировкой мегакариоцитов (Eisbacher M. et al., 2004). Было показано, что другой белок семейства транскрипционных факторов ETS – PU.1 взаимодействует

с GATA-1 непосредственно, а эти белки ингибируют функции друг друга (Morceau F., Schnekenburger M., Dicato M., 2004). В ряде исследований было высказано предположение о том, что изменения концентрации PU.1 играют определенную роль в принятии решений о судьбе клеток во время гемопоэза. В частности, снижение концентрации PU.1 требуется для нормального развития предшественников мегакариоцитов и эритроцитов (DeKoter R.P., Kamath M.B., Houston I.B., 2007).

Фактор транскрипции NF-E2 – гетеродимерный белковый комплекс, состоящий из субъединицы p45 и небольших белков семейства Maf, первоначально идентифицированный как фактор транскрипции эритропоэза, также имеет решающее значение для правильной дифференциации мегакариоцитов. Принудительная экспрессия субъединицы p45-NF-E2 избирательно усиливает многие аспекты мегакариопоэза, включая созревание мегакариоцитов, образование протромбоцитов и высвобождение тромбоцитов. Кроме того, сверхэкспрессия p45 увеличивает приоритетность мегакариопоэза, одновременно ингибируя дифференцировку лейкоцитов (Fock E.L., Yan F., Pan S., 2008). У мышей, у которых отсутствует p45 NF-E2 (NF-E2), наблюдалась глубокая тромбоцитопения, вызванная остановкой тромбоцитобразования у зрелых мегакариоцитов (Shivdasani R.A. et al., 1995).

Следующий транскрипционный белок – это RUNX1 (он же AML1). Ранее ген RUNX1 был определен как один из участников хромосомной перестройки t(8;21). Исследования *in vitro* и данные о болезнях человека, включая миелодиспластические синдромы и предрасположенность к острой миелоидной лейкемии, показывают, что RUNX1 играет одну из ключевых ролей в гематопоэзе у взрослых (Berger R. et al., 2006). В RUNX1-дефицитном костном мозге созревание мегакариоцитов ингибировалось (Ichikawa M. et al., 2004). Истощение RUNX1 в клетках UT-7/GM приводило к усиленной экспрессии мегакариоцитарных маркеров и полиплоидизации, однако пролиферация клеток снижалась, и избыточная экспрессия RUNX1 уменьшала активность промоторов гена мегакариоцитов. Эти результаты показывают, что RUNX1 ингибирует

терминальную фазу дифференциации мегакариоцитов и способствует сдвигу мегакариоцитограммы в сторону незрелых форм (Nagai R. et al., 2006). RUNX1 взаимодействует с другими факторами транскрипции, такими как GATA-1 (Elagib K.E. et al., 2003) и Fli-1 (Huang H. et al., 2009). Профиль охвата генома RUNX1 был основан на моделях клеточных линий. Результаты предполагают, что при дифференцировании линий мегакариоцитарных клеток RUNX1 взаимодействует с GATA1, AP-1 и ETS для организации программ транскрипции, специфичных для клеток, посредством партнерских отношений с транскрипционными факторами (Pencovich N., Jaschek R., Tanay A., 2011). Некоторые виды микроРНК, такие как miR-125b и miR-660, высоко экспрессируются в мегакариоцитах, усиливая мегакариопоэз (Emmrich S. et al., 2012). Регуляция мегакариопоэза осуществляется и с помощью сигнальных путей митоген-активируемой протеинкиназы MAPK. Большинство описанных транскрипционных факторов являются участниками сигнальных путей ERK1/2 MAPK и p38 MAPK (Mazharian A., Watson S.P., 2009).

С появлением методов секвенирования и геномике все большее число новых генов идентифицировано для участия в регуляции мегакариопоэза. Был проведен мощный метаанализ исследований ассоциации генома (GWAS) в количестве до 66 867 человек европейского происхождения, а затем обширная биологическая и функциональная оценка. В процессе исследования ученые определили 68 геномных локусов, которые надежно связаны с уровнем тромбоцитов и являются предполагаемыми новыми регуляторами мегакариопоэза и образования тромбоцитов (Gieger C. et al., 2011). Однако не все механизмы реализации генетической информации достоверно установлены, этот процесс является точкой приложения многих ученых различных специальностей.

1.1.2. Влияние микроокружения на процесс мегакариоцитопоэза

Процессы мегакариоцитопоэза и производства тромбоцитов происходят в сложном микроокружении костного мозга в узкоспециализированных

остеобластических и сосудистых нишах, где градиенты хемокинов, факторов роста, кальция, кислорода и адгезионных взаимодействий регулируют мегакариопоэз и миграцию мегакариоцитов (Bastian L.S., Kwiatkowski B.A., 1999). Прямое доказательство важности микросреды для мегакариопоэза было получено Slayton W.B. et al. (2005). Было обнаружено, что неонатальные стволовые клетки, продуцирующие небольшие мегакариоциты с низким содержанием ДНК в новорожденной печени, были способны продуцировать мегакариоциты, которые были достаточного размера и имели нормальные уровни плоидности при трансплантации взрослым. Вероятно, что баланс между факторами, которые ингибируют мегакариопоэз, такими как трансформирующий фактор роста β и тромбоцитарный фактор-4, и факторы, которые стимулируют мегакариопоэз, такие как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, тромбопоэтин, IL-6 или IL-11, строго регулируется и отличается в каждом органе и на каждом этапе развития. Это приводит к различным микросредам и способствует наблюдаемым изменениям размера и плоидности мегакариоцита в процессе развития (Slayton W.B. et al., 2005).

Факторы, используемые для стимуляции созревания мегакариоцитов *in vitro* и *in vivo*, включают лиганд flt-3, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-9 (IL-9), фактор стволовых клеток человека (SCF), тромбопоэтин и эритропоэтин. Лиганд flt-3 относят к ранним факторам роста, его воздействие происходит еще на стадии плюрипотентных стволовых клеток (Li K. et al., 2000), так же, как и SCF стимулирует их пролиферацию (Tanaka R. et al., 1992). Доказано сильное влияние на пролиферацию мегакариоцитов IL-3 и IL-6 (Koike K. et al., 1990). Некоторые интерлейкины вызывают стимуляцию мегакариопоэза в комбинации с другими ростовыми факторами, например, IL-1 проявляет свое действие в присутствии как IL-3, так и IL-6 (Warren M.K., Conroy L.B., 1989), IL-9 может стимулировать мегакариопоэз в присутствии эритропоэтина и/или SCF (Fujiki H. et al., 2002). Эритропоэтин оказывает сильное влияние на пролиферацию SCF/IL-3-

индуцированные мегакариоциты, что объясняет клинические наблюдения, при которых высокие уровни эритропоэтина часто связаны с интенсивностью тромбоцитоза (Cardier J.E., Erickson-Miller C.L., Murphy M.J.Jr., 1997).

Тромбопоэтин является основным регулятором мегакариопоэза (Ramsfjell V., et al., 1996). Его действие распространяется не только в мегакариопоэзе, но и на ранней стадии гемопоэза (Tanimukai S. et al., 1997). Тромбопоэтин важен для созревания мегакариоцитов, и после его устранения предотвращается полное созревание IL-3-индуцированного мегакариоцита (Kaushansky K. et al., 1995). При предельном разведении тромбопоэтин обладает прямой пролиферативной биологической активностью, тогда как другие цитокины не эффективны, кроме IL-3, проявляющего менее выраженный эффект (Debili N. et al., 1995). Известно, что тромбопоэтин реализует свой эффект, взаимодействуя с рецептором c-mpl (CD 110), активируя сигнальный путь ERK 1/2. В литературе представлены данные об обнаружении нового активирующего варианта рецептора тромбопоэтина Mpl-D в популяции бластных клеток при остром мегакариобластном лейкозе, который может играть роль в патогенезе этого заболевания (Wang Q. et al., 2013). Таким образом, вышеперечисленные ростовые факторы являются синергистами друг друга и обеспечивают многогранное и многокомпонентное регулирование мегакариопоэза.

Не только микроокружение и клетки стромы оказывают влияние на мегакариоциты, существует и обратная связь. Мегакариоциты играют роль в пролиферации и дифференцировке остеобластов и остеокластов, что объясняет наблюдаемое клинически развитие остеосклероза при мегакариоцитозе (Kasena M.A., Ciovasco W.A., 2010). Интересно, что мегакариоциты стимулируют пролиферацию остеобластов и, наоборот, ингибируют развитие остеокластов (Kasena M.A., et al., 2006). Недавно было обнаружено, что рецептор тромбопоэтина c-Mpl экспрессируется как на остеобластах, так и на остеокластах (Meijome T.E., Vaughman J.T., Hooker R.A., 2006).

1.1.3. Эндомитоз и образование гранул при мегакариопоэзе

В ходе дифференцировки мегакариоцитов происходит накопление и образование специфических гранул, характерных для тромбоцитов, благодаря которым они реализуют свои многочисленные и разнообразные функции. Этот процесс идет параллельно эндомитозу мегакариоцитов.

Эффективность эндомитоза реализуется несколькими механизмами. Во-первых, это достигается ингибированием киназы Aurora B. Данный фермент играет важную роль в процессе сегрегации хромосом. Он представляет собой серин/треонинкиназу и локализуется на теломерах стволовых клеток, где он взаимодействует с незаменимым теломерным белком TEF1 кинетохора и прикрепляет митотическое веретено деления к центромере (Vinod B. et al., 2017). Было показано, что мегакариоциты экспрессируют функциональную киназу Aurora B при эндомитозе (Geddis A.E., Kaushansky K., 2004). Во время дифференцировки мегакариоциты подвергаются повторным незавершенным клеточным циклам, в которых митоз прерывается в поздней анафазе с нарушением как кариокинеза, так и цитокинеза, называемого эндомитозом. Для реализации этих процессов решающее значение имеет ингибирование киназы Aurora B, частично благодаря ее фосфорилированию белком Ggase, активирующим серогруппу белка Rho, MgcRacGAP, который, в свою очередь, изменяет активность белка RhoA (Geddis A.E., Kaushansky K., 2006).

Мегакариоциты сначала подвергаются пролиферативной 2N стадии, в которой их пролиферация через клеточный цикл идентична другим гематопоетическим клеткам. Затем мегакариоциты подвергаются эндомитозу и накапливают содержание ДНК 4N, 8N, 16N, 32N, 64N и даже 128N в одном полиплоидном ядре перед продолжением их окончательного созревания и последующего образования протромбоцитов (Machlus K.R., Thon J.N., Italiano J.E. Jr., 2014). Переход от митоза к эндомитозу соответствует позднему блоку цитокинеза, при котором образование центральной борозды происходит в обычном режиме, но сократительное кольцо отличается, поскольку отсутствует

накопление немышечного миозина IIА (Lordier L. et al., 2008). Как правило, чистый дефект цитокинеза продуцирует многоядерную клетку, но мегакариоциты характеризуются одним полилобулярным ядром. Анализируя ядерную кинетику при эндомитозе, было обнаружено наличие нуклеоплазматических мостиков в большинстве многополюсных клеток эндомитоза из телофазы до отказа цитокинеза, что указывает на то, что эндомитоз мегакариоцитов представляет собой дефект кариокинеза. Это объясняет, почему полиплоидные мегакариоциты обнаруживают одно полилобулярное ядро наряду с увеличением плоидности (Lordier L. et al., 2012). RhoA ГТФаза играет многогранную роль в созревании мегакариоцитов. Путь RhoA является центральным в сборке сократительного кольца во время цитокинеза. Активированный RhoA регулирует полимеризацию актина и активацию миозина в срединной зоне посредством взаимодействия с различными эффекторами (Slayton W.B., Wainman D.A., Li X.M., 2005). Ингибирование передачи Rho киназы (ROCK) приводит к увеличению полиплоидизации в мегакариоцитах, полученных из пуповинной крови (Avanzi M.P. et al., 2014). Удаление RhoA в мегакариоцитах *in vivo* привело к значительной макротромбоцитопении. Такие мегакариоциты были крупнее, имели более высокую плоидность и плотные мембраны с инвагинацией микротрубочек (Suzuki A. et al., 2013). Следовательно, факторы обмена гуанина GEF-H1 и ECT2, которые необходимы для активации RhoA во время цитокинеза, должны быть снижены для полиплоидизации мегакариоцитов (Gao Y. et al., 2012).

Циклинзависимые киназы – это протеинкиназы, для которых характерна необходимость в отдельной субъединице – циклине, обеспечивающем домены, необходимые для ферментативной активности. Данные киназы играют важную роль в контроле клеточного деления и транскрипции в ответ на несколько внеклеточных и внутриклеточных сигналов (Malumbres M., 2014). Поскольку разновидности белков-циклинов участвуют в регуляции эндомитоза мегакариоцитов, таких как циклин D-типа (Sun S. et al., 2001), циклин E и циклин A (Eliades A., Papadantonakis N., Ravid K., 2010), некоторые ингибиторы циклин-

зависимой киназы также оказываются в роли фиксаторов при эндомитозе, включая p19INK4D (Gilles L. et al., 2008) и p21Cip1/Waf1 (Baccini V. et al., 2001).

Зрелые тромбоциты содержат обильные запасы секреторных везикул, включающие плотные гранулы, лизосомы и α -гранулы (50-80 на тромбоцит), которые переносят эндогенно синтезированный или эндоцитозный материал и образуются из везикул комплекса Гольджи в мегакариоцитах. Микровезикулы постепенно созревают в α -гранулы, которые переносятся в протромбоциты (Kahr W.H. et al., 2013). Функция тромбоцитов во многом зависит от содержимого в их гранулах.

Наиболее распространенными везикулами в тромбоцитах являются α -гранулы. Синдром «серого тромбоцита» - редкое наследственное расстройство, характеризующееся тромбоцитами с дефицитом α -гранул (Nurden A.T., Nurden P., 2007), что делает его хорошей моделью для изучения биогенеза α -гранул в мегакариоцитах. Было показано, что белок VPS33B и Sec1/Munc18 участвуют в образовании внутриклеточных везикул, это важно для созревания α -гранул в мегакариоцитах, но не для их секреции (Lo B. et al., 2005). Белок VPS16B был идентифицирован как VPS33B-связывающий белок, который также необходим для развития α -гранул тромбоцитов (Urban D. et al., 2012).

Плотные δ -гранулы являются представителями семейства тканеспецифических, связанных с лизосомой органелл и происходят из ранних эндосом мегакариоцитов (Meng R. et al., 2012). Показано, что некоторые ГТФ-связывающие белки играют критическую роль в биогенетике плотных гранул мегакариоцитов, включая Rab38 (Ninkovic I. et al., 2008), Rab27a и Rab27b (Tolmachova T. et al., 2007).

1.1.4. Образование тромбоцитов

Существует две модели, объясняющие процесс образования тромбоцитов. В фрагментационной модели мегакариоциты, мигрируя из костного мозга в легкие, отшнуровывают тромбоциты. В альтернативной модели тромбоциты

высвобождаются через образование многочисленных длинных выростов – протромбоцитов (Junt T. et al., 2007). По мере созревания мегакариоцитов из предшественников происходит систематическая серия событий. Клетки сначала подвергаются ядерному эндомитозу, синтезу органелл и динамическому цитоплазматическому созреванию и увеличиваются в размерах. Далее происходит формирование микротрубочек, исходящих из centrosом. До начала формирования протромбоцитов происходит разборка centrosомы и перемещение микротрубочек к периферии клеток. Образование протромбоцитов начинается с формирования толстых псевдоподий. Скольжение перекрывающихся микротрубочек приводит к удлинению и истончению протромбоцитов. Этот процесс осуществляется по всему периметру цитоплазмы мегакариоцита. По мере удлинения протромбоцитов формируются изгибы, из которых образуются сложные ветвящиеся структуры. Вся цитоплазма мегакариоцитов превращается в массу протромбоцитов, которые высвобождаются из клетки. Ядро в конечном итоге экструдируется из массы протромбоцитов, и отдельные тромбоциты высвобождаются из концов выростов протромбоцитов (Patel S.R., Hartwig J.H., Italiano J.E.Jr., 2005). Вышеописанная модель была подтверждена *in vitro* в мегакариоцитах, выращенных из мышечных эмбриональных стволовых клеток печени (Patel-Hett S. et al., 2008; Patel-Hett S. et al., 2011), а также *in vivo* с помощью изображений и видеороликов образования протромбоцитов, выделяющихся в синусоидальные кровеносные сосуды костного мозга (Junt T. et al., 2007). Параллельно росту протромбоцитов осуществляется миграция органелл (гранул, митохондрий и др.) из центра клетки в формирующиеся выросты. Движение органелл происходит со скоростью 0,2 мкм/мин, при этом часто возникают паузы и изменения направления движения. Существует 2 механизма перемещения: органеллы двигаются вдоль микротрубочек, а связанные микротрубочки перемещаются относительно друг друга (Richardson J.L. et al., 2005). Смещение микротрубочек относительно друг друга представляет собой процесс, который можно разделить на повторяющиеся фазы – растяжение, пауза и ретракция. И важную роль в этом играют белок цитоплазматический динеин

(Bender M. et al., 2015) и β 1-тубулин (Seo H. et al., 2018). Имеются данные о том, что ядро мегакариоцита в процессе образования протромбоцитов подвергается апоптозу и в дальнейшем фагоцитируется макрофагами. Выявлена первая мутация в гене, кодирующем цитохром C, который усиливает апоптозную активность мегакариоцитов и приводит к наследственной тромбоцитопении (Morison I.M. et al., 2008).

В процессах апоптоза важную роль в клетках играют каспазы. Их активация происходит внешним (через рецепторы Fas, TRAIL и TNFR с последующей активацией каспазы-8) и внутренним путем (при высвобождении цитохрома C из митохондрий с активацией каспазы-9). С одной стороны, процессы апоптоза связаны с образованием протромбоцитов. Утверждается, что внутренняя активация каспаз, либо активация оксидом азота (Battinelli E. et al., 2001) приводит к увеличению образования протромбоцитов (Clarke M.C. et al., 2003). Оба этих вывода свидетельствуют о положительном эффекте внутреннего пути апоптоза для мегакариоцитов (White M.J., Kile B.T., 2010; Josefsson E.C. et al., 2011). С другой стороны, было обнаружено, что Fas-реагирующий внешний путь апоптоза в мегакариоцитах не стимулирует выработку тромбоцитов, а запускает каспазо-8-опосредованную гибель клетки (Josefsson E.C., Burnett D.L., Lebois M., 2014). Также показано, что отсутствие как про-, так и антиапоптотических белков не влияет на образование тромбоцитов и что инактивирование каспазы-9 не изменяет скорость тромбоцитообразования (White M.J. et al., 2012). Таким образом, роль апоптоза в образовании тромбоцитов остается до конца неясной.

Тромбоциты выделяются непосредственно в синусоиды костного мозга. Крупные протромбоциты могут выделяться в кровоток, где они путем фрагментации распадаются на зрелые тромбоциты (Junt T. et al., 2007). Для формирования протромбоцитов и самого процесса отшнуровки важна миграция мегакариоцитов от пролиферативных остеобластов в периваскулярную нишу (Brown E. et al., 2018). Этот процесс активируется действием Src-киназы и Syk-киназы и ингибируется фосфолипазой $Cy2$ (Mazharian A. et al., 2010). Адгезия мегакариоцита и эндотелиальных клеток происходит через рецептор интегрина

$\alpha_v\beta_3$ (Zeng D.F. et al., 2018), после чего образование протромбоцитов идет интенсивнее, и преобладает внутрисосудистый тип формирования протромбоцитов (Kowata S. et al., 2014). Обнаруживаются циркулирующие мегакариоциты в периферической крови, а также в легких и селезенке. Их роль в этих органах до конца не изучена. Показано, что количество циркулирующих мегакариоцитов ассоциируется с хорошей выживаемостью пациентов при распространенном раке предстательной железы (Xu L. et al., 2017).

Существуют три основных внутриклеточных участника, которые вовлечены в формирование тромбоцитов: они включают в себя инвагинационную мембранную систему, микротрубочки и Rho ГТФазу (Bluteau D. et al., 2009). Мембранная система, сформированная во время созревания мегакариоцитов, поддерживает контакт с внеклеточной средой и, в первую очередь, служит мембранным запасом для образования протромбоцитов (Guo T., Wang X., Qu Y., 2015). Микротрубочки отвечают за элонгацию протромбоцита. Скорость элонгации в среднем составляет 0,85 мкм/мин в зависимости от количества микротрубочек. Первоначально требуется полимеризация молекул тубулина, а в дальнейшем скольжение перекрывающихся микротрубочек приводит к увеличению длины протромбоцита (Patel S.R. et al., 2005). Было показано, что некоторые виды Rho ГТФаз играют определенные роли в отшнуровке тромбоцитов. Так, например, Rho ГТФаза RhoA, участвующая в созревании мегакариоцитов, как было описано выше, также регулирует отшнуровку тромбоцитов после созревания мегакариоцита, контролируя активность актина (Kaushansky K., 2009). Эти результаты были подтверждены экспериментами, выполненными на отдельной линии трансгенных мышей, у которых в мегакариоцитах отсутствовала RhoA. Были нарушены процессы функционирования актина, что привело к развитию макротромбоцитопении (Pleines I. et al., 2012). Другие представители Rho ГТФаз, Rac1 и Cdc42, реализуют свой эффект, нормализуя работу тубулина в процессе отшнуровки тромбоцитов (Pleines I. et al., 2013). Функционирование актина регулируют и другие факторы. Например, протеинкиназа $C\alpha$ вызывает структуризацию актина (Rojnuckarin

P, Kaushansky K., 2001), а серотонин (5-гидрокситриптамин) через активацию пути Erk1/2 запускает реорганизацию F-актина в процессе формирования протромбоцита, что приводит к усилению мегакариопоэза (Ye J.Y. et al., 2014).

Кроме внутренних сигнальных молекул, микроокружение периваскулярной ниши обеспечивает внешние стимулы, включая коллаген IV типа, фибронектин, ламинин, фибриноген и фактор Виллебрандта (Poirault-Chassac S. et al., 2013), необходимые для индукции тромбоцитообразования (Larson M.K., Watson S.P., 2006). В то же время коллаген типа I полностью ингибирует образование тромбоцитов (Balduini A. et al., 2008).

Интересно, что дефицит железа является частой причиной реактивного тромбоцитоза. Показано, что недостаток железа не влияет на выработку гемопоэтических факторов роста, таких как тромбопоэтин, IL-6 или IL-11, но при этом увеличивает плоидность и размер мегакариоцитов, что и приводит к тромбоцитозу (Evstatiev R. et al., 2014). При недостатке железа повышается экспрессия фактора HIF2 α , индуцируемого гипоксией, и увеличивается содержание фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A в супернатантах мегакариоцитарных культур (Jimenez K. et al., 2015). Известно, что для реализации сигнала VEGF существуют три рецептора – VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3 (также называемые FLT1, KDR и FLT4 соответственно). По мере дифференцировки от гемопоэтической стволовой клетки до зрелого мегакариоцита рецепторы VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3 экспрессируются и реэкспрессируются на разных стадиях развития соответственно, сменяя друг друга. Показано их важное действие в процессах пролиферации, дифференцировки, полиплоидизации мегакариоцитов и адгезии с эндотелиальными клетками (Yang J.G., Wang L.L., Ma D.C., 2018). Так, например, активация рецептора VEGFR1 стимулирует CXCR4-зависимую миграцию мегакариоцитов в периваскулярную нишу (Pitchford S.C., Lodie T., Rankin S.M., 2012). Несмотря на разноплановость действия VEGF в процессах мегакариопоэза, до конца не изучена роль фактора роста эндотелия сосудов при тромбоцитопениях.

1.2. Антигенная и функциональная характеристика тромбоцитов.

Жизненный цикл тромбоцитов

Объем тромбоцитов варьирует от 5 до 10 мкм³. Среди тромбоцитов по их диаметру можно выделить несколько популяций: зрелые – диаметром 2-4 мкм (80-95%), «молодые» формы – макротромбоциты размером свыше 4 мкм (3-15%) и «старые» – микротромбоциты размером менее 2 мкм (3-15%). При циркуляции тромбоциты находятся в неактивном состоянии и морфологически имеют дисковидную форму, которая при их активации меняется на сферическую (Морозова В.Т., Авдеева Н.А., 2006). Таким образом, морфологически можно выделить три формы тромбоцитов, возникновение которых связано с функциональным состоянием мегакариоцитов и зависит от их плоидности. Первая форма – это дисковидные тромбоциты, которые наиболее широко представлены в крови здоровых людей. Дисковидные тромбоциты отшнуровываются зрелыми мегакариоцитами с плоидностью 16N и 32N. Вторая – удлиненные биполярные протромбоциты, морфологически похожие на длинные выросты-образования и сформированные незрелыми мегакариоцитами, которые имеют низкую плоидность (4N, 8N и 16N). Третья форма – сферические («ретикулярные») тромбоциты (Cr), самые крупные по размеру, составляют 4-5 мкм. Эта форма имеет слоистый вид, напоминающий вид цитоплазмы зрелого мегакариоцита, и содержит множественные бабулярные выросты на мембране. Сферические тромбоциты образуются мегакариоцитами с плоидностью выше 64N. Кроме предыдущих трех форм, напрямую связанных с мегакариопозом, выделяют четвертую субпопуляцию, которая напоминает сферические тромбоциты, но имеет меньшие размеры – 1-2 мкм, гладкую поверхность и различное число псевдоподий (Ci). При активации тромбоцита происходит образование последней субпопуляции из дисковидных форм (Бурячковская Л.И., Учитель И.А., Сумароков А.Б., 2007).

Мы привыкли видеть тромбоциты в качестве главного участника в первичном гемостазе, но кроме этого, тромбоциты участвуют в иммунных

реакциях и воспалении путем выделения цитокинов и факторов роста (Gawaz M., Langer H., May A.E., 2005; Weyrich A.S., Zimmerman G.A., 2004). Тромбоциты также обладают способностью к эндо- и экзоцитозу, что обеспечивает еще одну функцию этих клеток – защитную. Доказана способность тромбоцитов к адгезии и фагоцитозу некоторых видов микроорганизмов и вирусов, что обеспечивает устойчивость организма-хозяина (Youssefian T. et al., 2002). Еще одна функция тромбоцитов – транспортная: благодаря адгезии различных веществ на поверхности клетки возможен транспорт этих веществ. Эти многофункциональные клетки, благодаря активным веществам, содержащимся внутри гранул, участвуют в регуляции сосудистого тонуса (Harrison P., 2005). Появляются данные об участии тромбоцитов в росте, метастазировании и уничтожении раковых клеток (Gupta G.P., Massagué J., 2004; Okada M. et al., 1996). Ангиотрофическая функция тромбоцитов обеспечивает нормальную проницаемость и целостность стенок сосудов. Тромбоциты могут поддерживать целостность сосудов несколькими способами, в зависимости от типа и тяжести повреждения сосудов. В случае незначительного повреждения, ограниченного эндотелиальным слоем (например, расширение сосудов и открытие эндотелиальных соединений), тромбоциты прилипают к нему и распространяются по открытой базальной мембране, иногда образуя нетромбогенный «псевдоэндотелий». Примечательно, что адгезия тромбоцитов к экспонированному субэндотелиальному матриксу чувствительна к коллагеназе, что указывает на возможную роль взаимодействия тромбоцитов/коллагена. При небольшом повреждении, затрагивающем и базальную мембрану (например, в результате диапедеза нейтрофилов в ткани), тромбоциты закрывают сосудистые нарушения, заполняя эндотелиальные промежутки и соединяя основание разрыва базальной мембраны. GPVI способствует адгезии тромбоцитов к этим участкам. В случае тяжелой травмы происходит обнажение глубоких слоев стенки сосуда и/или тканей, окружающих сосуда, что приводит к образованию тромбина и полной активации тромбоцитов, тем самым вызывая агрегацию тромбоцитов через интегрин $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (Boulaftali Y. et al., 2018). Вот почему снижение количества

тромбоцитов приводит к дистрофии эндотелия сосудов: он становится проницаем для плазмы и эритроцитов, что сопровождается мелкими кровоизлияниями (петехиями). Тромбоциты способны взаимодействовать с клетками-предшественниками костного мозга, что вызывает их миграцию в места повреждения сосудов для ремоделирования сосудистой стенки. Эти взаимодействия с лейкоцитами и эндотелиальными клетками сосудов происходят как напрямую через рецепторы, так и косвенно через механизмы, управляемые хемокинами (Radziwon-Balicka A. et al., 2013; Stellos K., Gawaz M., 2007).

1.2.1. Роль GPIb α и других гликопротеинов в клиренсе тромбоцитов

Гликопротеин (GP) Iba является основной субъединицей рецепторного комплекса тромбоцитов для фактора фон Виллебранда (ФВ), который также содержит субъединицы GPIb β , GPIX и GPV (Huizinga E.G. et al., 2002; Li R., Emsley J., 2013). Гликопротеиновый комплекс GPIb/IX/V является продуктом четырех генов, расположенных в коротком плече хромосомы 17, длинном плече хромосомы 22, и два гена расположены на хромосоме 3. GPIb α также связывается с рядом лигандов или контррецепторов в кровотоке, включая лейкоцитарный интегрин α M β 2, α -тромбин и P-селектин. Он широко экспрессируется на поверхности тромбоцитов и мегакариоцитов. Внеклеточный домен GPIb α состоит из N-концевого лиганд-связывающего домена, O-гликозилированного муциноподобного участка и механосенсорного домена (Zhang W. et al., 2015). N-концевой лиганд-связывающий домен GPIb α и внеклеточные домены GPIb β и GPIX усилены N-связанными гликанами – N-ацетилглюкозаминами, которые присоединены к атому азота остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование представляет собой присоединение N-ацетилгалактозамина к атому кислорода белка, остаткам серина или треонина. Отсутствие комплекса GPIb-IX-IV может привести к снижению содержания сиаловой кислоты на 80% на единицу площади поверхности тромбоцитов (Ware J., Russell S., Ruggeri Z.M., 2000). Роль GPIb α в процессах гемостаза заключается в активации агрегации тромбоцитов, благодаря

дегрануляции α -гранул тромбоцитов и дополнительной секреции фактора фон Виллебранда, Р-селектина и других активных веществ (Savage B., Almus-Jacobs F., Ruggeri Z.M., 1998; Kleinschnitz C. et al., 2007). Гликаны на GPIb α играют решающую роль в опосредовании клиренса тромбоцитов через связывание с лейкоцитарным интегрином α M β 2 макрофагов и печеночным рецептором Эшвелла-Морелла (Josefsson E.C. et al., 2005; Grewal P.K. et al., 2013; Rumjantseva V., Hoffmeister K.M., 2010).

Фактор фон Виллебранда в кровотоке не связывается самопроизвольно с GPIb α тромбоцитов. При повреждении стенки сосудов происходит иммобилизация фактора фон Виллебранда и его конформационное изменение, после чего становится возможным взаимодействие фактора фон Виллебранда с GPIb α тромбоцитов. Дальнейшая передача сигнала осуществляется через инозитолфосфатную систему, в результате чего увеличивается концентрация Ca^{2+} в цитоплазме тромбоцитов и формируется комплекс кальмодулин-4- Ca^{2+} -миокиназа. Активная миокиназа фосфорилирует миозин, что вызывает морфологическую трансформацию тромбоцитов, и они меняют форму с дисковидной на сферическую, облегчая адгезию (Feys H.V. et al., 2016; Ruggeri Z.M., Mendolicchio G.L., 2015). У пациентов с болезнью Виллебранда типа 2В часто наблюдается тромбоцитопения, что вызвано повышенным сродством фактора фон Виллебранда с GPIb α (Lillicrap D., 2013), комплексы фактор фон Виллебранда/тромбоциты распознаются и удаляются макрофагами в печени и селезенке (Casari C. et al., 2013). Как данные комплексы распознаются и элиминируются, еще предстоит выяснить. Недавние наблюдения показали, что мембраносенсорный домен в GPIb α меняет конформацию, когда на N-концевой лиганд-связывающий домен действует механическая сила натяжения через связанный домен A1 фактора фон Виллебранда (Zhang W. et al., 2015). В процессе циркуляции тромбоцитов в периферической крови происходит потеря сиаловых кислот из GPIb α под действием активных сиалидаз, что приводит к обнажению предпоследней поверхностной галактозы. Сайт расщепления находится в середине механосенсорного домена GPIb α , после чего он становится мишенью

для металлопротеиназ, и запускается клиренс тромбоцитов (Jansen A.J. et al., 2012). Связывание десИАлированного GPIb α тромбоцитов с фактором фон Виллебранда увеличивается после его активации (Sorensen A.L. et al., 2009), что индуцирует апоптоз тромбоцитов (Li S. et al., 2010). Хотя лежащие в основе молекулярные механизмы, включая местоположение и степень десИАлирования, еще предстоит выяснить, эти результаты предполагают новый механизм, связывающий активацию тромбоцитов с десИАлированием тромбоцитов, апоптозом и клиренсом, в котором изменения гликозилирования GPIb α играют центральную роль. Эти данные также показывают, что при определенных обстоятельствах фактор фон Виллебранда может рассматриваться как «фактор очистки тромбоцитов» (Li R., Hoffmeister K.M., Falet H., 2016).

Как мы видим, потеря сиаловой кислоты идентифицирована как детерминанта удаления стареющего тромбоцита (Grozovsky R. et al., 2015). Тромбоциты с низким уровнем сиаловых кислот взаимодействуют с печеночным рецептором Эшвелла-Морелла – это трансмембранный гетеролигомерный комплекс гликопротеина, состоящий из субъединиц ASGPR1 (HL-1) и ASGPR2 (HL-2). Данный рецептор в основном рассматривается как эндоцитарный (Grewal P.K., 2010). Во время взаимодействия тромбоцитов с рецептором Эшвелла-Морелла в гепатоцитах инициируется сигнальный каскад с помощью Janus-киназы 2 (JAK2), сигнального белка и фактора транскрипции STAT3, что вызывает продукцию тромбопоэтина и, следовательно, увеличивается количество мегакариоцитов. Этот механизм обратной связи представляет связь рецептора Эшвелла-Морелла и десИАлированных тромбоцитов в качестве критической контрольной точки для гомеостаза тромбопоэтина, что указывает на то, что выработка тромбопоэтина в гепатоцитах регулируется и не является конститутивной. Тромбоцитопения является распространенным побочным эффектом лечения ингибиторами JAK1/2, которое клинически используется при миелопролиферативных заболеваниях (Levine R.L., Gilliland D.G., 2008; LaFave L.M., Levine R.L., 2012).

На всех клетках млекопитающих присутствуют интегрины, представляющие собой гетеродимерные трансмембранные гликопротеины. Наиболее важный класс интегринов лейкоцитов – семейство $\beta 2$. К этому семейству относится гетеродимерный интегрин $\alpha M\beta 2$, экспрессируемый на поверхности многих лейкоцитов, связанных с иммунной системой. Субъединица αM содержит катион-зависимый лиганд-связывающий I-домен, который опосредует воспаление, регулируя адгезию и миграцию лейкоцитов, и участвует в нескольких иммунных процессах, таких как фагоцитоз, клеточная цитотоксичность, хемотаксис и клеточная активация. Он вовлечен в систему комплемента из-за его способности связывать инактивированный компонент комплемента 3b (iC3b), и интегрин $\alpha M\beta 2$ служит фагоцитарным рецептором для iC3b (Xia Y. et al., 2002). Домен αM также связывается с GPIIbA тромбоцитов, и взаимодействие происходит через макрофаг-1 антиген или Mac-1 (гомологичный домену фактора фон Виллебранда A1) и N-концевой лиганд-связывающий домен GPIIbA, который содержит повторяющиеся участки, богатые лейцином. Помимо связывания компонента комплемента iC3b, субъединица αM имеет лектиновый сайт для связывания с β -глюканом (Thornton B.P. et al., 1996). Под воздействием холода происходят изменения в составе гликана GPIIbA (Badlou B.A. et al., 2006), что приводит к связыванию тромбоцитов с макрофагами, сокращая их жизненный цикл. Лектиновый домен распознает циркулирующие тромбоциты, индуцируемые холодом, через воздействие N-ацетилглюкозамина на поверхности тромбоцитов (Josefsson E.C. et al., 2005). Старение *in vivo* и *in vitro* приводит к глубоким изменениям в экспрессии и клиренсе гликанов через многочисленные лектиновые рецепторы, локализованные на макрофагах и гепатоцитах.

Адгезию тромбоцитов как к фибриллярному (тип I или III), так и к нефибриллярному (тип II или IV) коллагену осуществляет комплекс GPIa/IIa (называемый также – интегрин $\alpha 2/\beta 1$), который представляет собой $\alpha 2$ -цепь с массой 165 кД, а GPIIa – $\beta 1$ -цепь с массой 145 кД (Benedicte P.N., 2011). На один тромбоцит приходится не очень большое распространение интегрин $\alpha 2/\beta 1$, что составляет от 800 до 3000 молекул. Показано, что в зависимости от количества

гетеродимера на мембране тромбоцитов меняется способность связывания с коллагеном (Marjoram R.J. et al., 2014).

Прикрепление тромбоцитов к коллагену наряду с тромбоцитарным интегрином $\alpha 2\beta$ обеспечивает гликопротеин GPVI. Этот гликопротеин присоединяется к аминокислотной последовательности глицил-пролил-оксипролил (Knight C.G. et al., 1999). При присоединении к рецептору лиганда GPVI формируется комплекс GPVI-Fc γ , который вызывает фосфорилирование FcR γ , что запускает активацию PLC γ 2, дегрануляцию и агрегацию тромбоцитов (Gremmel T., Frelinger A.L., Michelson A.D., 2016). GPVI имеет высокую степень сродства с Fc α R и рецепторами NK-клеток (Boulaftali Y. et al., 2018).

Комплекс GPIIb/IIIa представляет собой гетеродимер (называемый также – интегрин α Ib/ β 3) и является поверхностным рецептором тромбоцитов. Передача сигнала возможна от других рецепторов, таких как рецепторы адгезии GPVI и GPIb/IX/V, а также рецепторы, связанные с G-белком (например, рецепторы тромбина PAR-1 и PAR-4), и рецепторы АДФ (P2Y1 и P2Y12), что приводит к активации комплекса GPIIb/IIIa. В это время меняется конформация гликопротеинового комплекса, и становится возможным соединение тромбоцита с фибриногеном. Iib/IIIa-рецептор способен распознать две характерные аминокислотные последовательности. Первая состоит из аминокислот L-аргинил-глицил-L-аспартил-L-серина, она встречается в фибронектине, факторе Виллебранда, витронектине и фибриногене (Pierschbacher M.D., Ruoslahti E., 1984; Cohen D.J. et al., 2018). Нужно отметить, что большинство интегринов легко узнают последовательность аргинил-глицил-аспарагил, поэтому пептиды, в состав которых входит данная последовательность аминокислот, проявляют себя как конкурентные ингибиторы взаимодействия Iib/IIIa рецепторов тромбоцитов с фибриногеном. Вторая последовательность аминокислот, которую распознают Iib/IIIa-рецепторы, лизил-глутамил-аланил-глицил-аспартил-валин, находится только в карбоксильном конце γ -цепей фибриногена (Farrell D.H. et al., 1992; Zafar H. et al., 2017).

1.2.2. Роль лизосомальных гликозидаз в клиренсе тромбоцитов

Сиалидазы (или нейраминидазы) представляют собой ферменты гликозидгидролазы, которые расщепляют гликозидные связи сиаловой (или нейраминовой) кислоты. Сиалидазы представляют собой большое семейство, обнаруженное в ряде организмов. Удаление сиаловой кислоты с гликоконъюгатов клеточной поверхности влияет на межклеточные взаимодействия, способность связывания с растворимыми молекулами, вирусами, бактериями и простейшими и модулирует клеточную активность (Miyagi T., Yamaguchi K., 2012). Значение сиалидазной активности для нормальной функции эукариотических клеток было выведено из разнородных клинических проявлений людей с генетическим дефицитом сиалидазы (Stamatos N.M. et al, 2005; Pshezhetsky A.V., Ashmarina L.I., 2013). По меньшей мере, четыре сиалидазы млекопитающих были описаны в геноме человека: сиалидазы с 1 по 4 (Neu1-4) (Monti E., 2010). Neu1 представляет собой лизосомальный фермент нейраминидазы млекопитающих, тогда как Neu3 экспрессируется на поверхности клетки, где он может играть роль в модулировании содержания ганглиозидов в липидном бислое.

Потеря сиаловой кислоты с поверхности тромбоцитов обусловлена активацией тромбоцитарных сиалидаз, т.е. Neu1 и Neu3, экспрессируемых в гранулярных компартментах и на плазматической мембране соответственно (Jansen A.J. et al., 2012). Тромбоцитарные нейраминидазы Neu1 и Neu3 воздействуют на сиаловые кислоты, обнаруженные в субъединице GPI_{IIb} рецепторного комплекса фактора фон Виллебранда, обнажая остатки β-галактозы и открывая GPI_{IIb} для воздействия металлопротеиназы. Интересно, что инкубация тромбоцитов с ингибитором сиалидазы, 2-дезоксидезокси-2,3-дегидро-N-ацетилнейраминовой кислотой (DANA), улучшает восстановление и выживание тромбоцитов, хранящихся при 4°C у мышей (Skripchenko A. et al., 2014).

Количество тромбоцитов регулируется активностью сиалидазы в клинических условиях. Например, десиамирование связано с апоптозом и фагоцитозом тромбоцитов у пациентов с длительной изолированной

тромбоцитопенией после трансплантации аллогематopoэтических стволовых клеток (Zhang X.H. et al., 2015). Ингибитор сиалидазы, осельтамивир фосфат (Тамифлю®), уменьшает клиренс тромбоцитов у пациентов, указывая на то, что сиалидазы удаляют сиаловую кислоту из циркулирующих тромбоцитов. Исследователи также сообщили об успешном лечении осельтамивиром фосфатом у пациента с хронической идиопатической тромбоцитопенической пурпурой с аутоантителами против GPIb-IX (Shao L. et al., 2015). Следовательно, содержание сиаловой кислоты в тромбоцитах является важным фактором, который диктует взаимодействие тромбоцитов с другими клеточными системами (гепатоцитами, макрофагами), чтобы вызвать клиренс.

Тромбоциты также экспрессируют β -галактозидазу в гранулярных компартментах и на их поверхности (Jansen A.J. et al., 2012). β -галактозидазы гидролизуют β -галактозиды в моносахариды. Субстраты β -галактозидазы включают лактозу, ганглиозид GM1, лактозилкерамиды и различные гликопротеины (Sandhoff K., Harzer K., 2013). Поскольку β -галактозидаза высоко экспрессируется и накапливается в лизосомах в стареющих клетках, она используется в качестве биомаркера старения как *in vivo*, так и *in vitro* в качественных и количественных анализах (Klement K., Goodarzi A.A., 2014).

Термин «лизосома» был образован, чтобы передать идею мембраносвязанной литической органеллы, которая содержит гидролазы, активные при кислотном pH внутри клеток. Считается, что лизосомы являются конечной точкой эндоцитарного пути, по которому белки и внеклеточные частицы доставляются для деградации рядом протеаз и липаз (Kornfeld S., Mellman I., 1989). Тем не менее, некоторые исследования показывают, что лизосомы также функционируют как секреторные органеллы. Дегрануляция и секреция лизосом четко контролируется, обеспечивая важные регуляторные механизмы в иммунной системе и ряде других типов клеток, в частности, – мегакариоцитах и тромбоцитах. Генетические дефекты, вызывающие секреторные дефекты лизосом, связаны с альбинизмом, иммунодефицитом и нарушениями тромбоцитов (Stinchcombe J., Bossi G., Griffiths G.M., 2004). Тромбоциты и

мегакариоциты содержат секреторные лизосомы, которые могут высвобождать нейраминидазы и β -галактозидазы (Li R., Hoffmeister K.M., Falet H., 2016).

1.2.3. Роль апоптоза в элиминации тромбоцитов

Время циркуляции тромбоцитов в периферической крови зависит от процессов апоптоза. В тромбоцитах протекает собственный классический путь апоптоза, который регулирует продолжительность жизни клетки. В тромбоците широко представлены белки семейства Bcl-2, которые являются основными регуляторами митохондриального пути апоптоза. Они оказывают решающее воздействие на изменение проницаемости наружной мембраны митохондрий. В семействе Bcl-2 различают проапоптотические и антиапоптотические белки. Показано, что продолжительность циркуляции тромбоцитов увеличивается у мышей, у которых отсутствуют проапоптотические белки Bax и Bak, и наоборот, ускоряется клиренс тромбоцитов у мышей, у которых отсутствуют антиапоптотические белки Bcl-2, Bcl-xL и Mcl-1, а также при воздействии миметика ВНЗ АВТ-737 (ингибитор антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-w) (Kile B.T., 2014). В процессе апоптоза играют роль и нейроминидазы. Так, например, экспрессия и активность Neu3 связана с устойчивостью к апоптозу, особенно в линии лейкозных клеток K562 (Tringali C. et al., 2009). Интересно, что ингибирование Neu3 в K562 запускает мегакариоцитарную дифференцировку клеток K562. Высокая экспрессия Neu3 в раковых клетках также связана с защитой от апоптоза в опухолевых клетках (Miyagi T. et al., 2012; Yamaguchi K. et al., 2012).

Средняя продолжительность жизни тромбоцитов составляет 9-10 суток (Долгов В.В., Свирин П.В., 2005). Интересно, что у новорожденных и взрослых мышей скорость продуцирования тромбоцитов одинакова, но у тромбоцитов новорожденных продолжительность жизни на 1 день дольше. Это связано с тем, что тромбоциты новорожденных имеют более высокие уровни антиапоптотического белка Bcl-2 и более устойчивы к апоптозу, индуцированному ингибитором Bcl-2/Bcl-xL АВТ- 737, чем взрослые

тромбоциты. Тем не менее, генетическая абляция или фармакологическое ингибирование только Vc1-2 не сокращают время циркуляции тромбоцитов и не снижают их количество у новорожденных мышей, что указывает на существование дополнительных механизмов, обеспечивающих более длительную продолжительность жизни тромбоцитов у новорожденных (Liu Z.J. et al., 2014). Хотя полезность мышинных моделей исследования гемостаза очевидна, при интерпретации данных следует учитывать присущие различия между тромбоцитами мыши и человека (Ware J., 2004). Одним из наиболее очевидных отличий от гемостаза человека является тот факт, что в крови мышей гораздо больше циркулирующих тромбоцитов (Levin J., Ebbe S., 1994). В среднем у мышей в цельной крови содержится в три раза больше тромбоцитов по сравнению с человеческой кровью, и у отдельных линий мышей имеется довольно широкий диапазон числа тромбоцитов (Jackson C.W. et al., 1990). Срок жизни циркулирующего тромбоцита мыши также приблизительно вдвое меньше, чем у тромбоцитов человека, и более быстрому обмену, вероятно, способствует образование тромбоцитов из мегакариоцитов, присутствующих в селезенке мыши (Tsakiris D.A. et al., 1999). Поэтому все вышеперечисленные факторы необходимо учитывать при исследовании гемостаза на мышинных моделях.

1.3. Характеристика тромбоцитопоза и патогенез при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура является аутоиммунным заболеванием и характеризуется снижением тромбоцитов в периферической крови ниже $100 \times 10^9 / \text{л}$. Клиническими проявлениями могут быть петехии на коже, экхимозы и кровотечения у 2/3 пациентов. Заболеваемость ИТП в мире у взрослых составляет около 10 на 100000 населения в год (Segal J.B., Powe N.R., 2006), а распространенность варьирует от 1,6 до 3,9 случаев на 100000 населения (Melikyan A.L., Pustovaya E.I., 2016; Schoonen W.M., Kucera G., Coalson J., 2009). В 2009 году были опубликованы рекомендации по терминологии, диагностике и

лечению идиопатической тромбоцитопенической пурпуры у детей и взрослых, разработанные международной группой признанных экспертов в ходе нескольких согласительных конференций (Rodeghiero F., Stasi R., Gernsheimer T., 2009). У взрослых в 80% случаев заболевание имеет хроническое течение, а у детей, наоборот, преобладает острое. В связи с отсутствием четких критериев диагноз ИТП является диагнозом исключения, для установления которого требуется проведение комплексного обследования, исключающего заболевания и состояния иммунной и неиммунной природы, протекающие с тромбоцитопенией (Румянцев А.Г., Масчан А.А. 2020; Neunert C., Lim W., Crowther M., 2011). Вторичная иммунная тромбоцитопения определяется как ИТП, вызванная другими заболеваниями или особенностями лечения. К ним относятся аутоиммунные расстройства, лимфопролиферативные расстройства, инфекционные агенты, переливание или индукция лекарственными средствами, что в сумме составляет 20% случаев ИТП (Cines D.V. et al., 2009; Moulis G. et al., 2014).

Симптомы кровотечения у пациентов с ИТП обычно проявляются либо в легкой форме, такой как кровотечение в областях кожи и слизистой оболочки, либо в более тяжелой, опасной для жизни форме, такой как кровотечение в желудочно-кишечном или внутричерепном отделах (Neunert C. et al., 2015). Пациенты с ИТП имеют различное количество тромбоцитов в результате заболевания. То есть те, у кого количество тромбоцитов превышает 50000 на микролитр, редко кровоточат, но ниже этого «порогового» значения имеются большие различия в клинических проявлениях, которые еще не объяснены (Neunert C. et al., 2011; Меликян А.Л. и др., 2017). Тестирование функции тромбоцитов оказывается успешным в прогнозировании риска кровотечений у пациентов (Panzer S. et al., 2007; Frelinger A.L. et al., 2015). Так, незрелая фракция тромбоцитов (IPF) и тромбоэластометрические показатели плотности сгустка коррелируют с кровотечением у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой (Greene L.A. et al., 2014). Однако четких диагностических инструментов не существует, так как связи между биомаркерами и ИТП остаются ограниченными, и нет маркеров, которые могли бы предсказать

ответы на лечение (Provan D. et al., 2010). Наиболее распространенные терапевтические варианты основаны на иммуносупрессии кортикостероидами, внутривенном иммуноглобулине (IVIg) или ритуксимабе, а также стимуляции продукции тромбоцитов агонистами рецепторов тромбопоэтина (ТРО-РА).

1.3.1. Генетические факторы риска развития идиопатической тромбоцитопенической пурпуры

Многих исследователей интересует вопрос, существует ли генетическая предрасположенность развития идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Известно, что аутореактивные В-клетки и цитотоксические Т-клетки тесно связаны с патофизиологией иммунной тромбоцитопении, все больше данных накапливается о корреляции между идиопатической тромбоцитопенической пурпурой и однонуклеотидными полиморфизмами в генах, связанных с иммунитетом. Так, в Японии показано, что у взрослого населения с ИТП выявлена сверхэкспрессия DRB1*04, которая также ассоциируется с плохим ответом на лечение преднизолоном (Nomura S. et al., 1998). Среди кавказцев аллель HLA-A2 чаще встречается у пациентов с хронической формой идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (Stanworth S.J. et al., 2002). При исследовании среди бразильцев выявлена ассоциация ИТП с аллелем MICA*183, также известным как A5.1. (Maia M.H. et al., 2009). Среди бразильцев проведено широкое исследование, направленное на анализ генетических полиморфизмов рецепторов FcγIIA и FcγIIIA. Показано, что гомозиготный полиморфный генотип для FcγRIIA был значительно чаще среди пациентов по сравнению с контрольной группой (Amorim D.M. et al., 2012). В Канаде подобное исследование выявило, что у детей с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой чаще встречается полиморфизм FcγRIIa-131, характеризующийся заменой аргинина на гистидин в 131-м положении и FcγRIIa-158 с заменой валина на фенилаланин в 158 положении (Carcao M.D. et al., 2003). В Греции говорится только о значении полиморфизма FcγRIIa-158V (Papagianni A. et al., 2013). Накоплено много данных

и о полиморфизмах в генах, кодирующих специфические цито- или хемокины, такие как интерлейкин ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17, TNF- α , TGF- β и IFN- γ , которые были связаны с ИТП (Wu K.H. et al., 2005; Emmerich F. et al., 2007; Rocha A.M. et al., 2010; Pehlivan M. et al., 2011; Saitoh T. et al., 2011). Различия в исследованиях могут быть объяснены небольшим размером выборки или этнической изменчивостью. Кроме того, многие из выявленных взаимосвязей обнаруживаются не у всех пациентов и обычно наблюдаются при других аутоиммунных заболеваниях, а, следовательно, являются общими предрасполагающими факторами и мало специфичны для идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

1.3.2. Факторы экологического риска

Долгое время наличие некоторых инфекций связывали с возникновением идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, особенно у детей (Cines D.V. et al., 2009; Terrell D.R. et al., 2010). Одними из наиболее распространенных и наиболее изученных инфекционных агентов являются *Helicobacter pylori* (Takahashi T. et al., 2004; Stasi R. et al., 2009; Туев А.В и др, 2013), вирус гепатита С (Zhang W. et al., 2009) и вирус иммунодефицита человека (Li Z, Nardi M.A., Karpatkin S., 2005). Существуют также данные о цитомегаловирусе (DiMaggio D., Anderson A., Bussel J.B., 2009), вирусе Эпштейна-Барра (Wu Z. et al., 2013) и некоторых других вирусах. Отдельные случаи идиопатической тромбоцитопенической пурпуры были зарегистрированы после вакцинации, хотя и встречаются такие случаи редко (Mantadakis E., Farmaki E., Buchanan G.R., 2010; Grimaldi-Bensouda L. et al., 2012). Одним из предполагаемых механизмов, с помощью которых инфекции приводят к аутоиммунизации, является возникновение молекулярной мимикрии. В этом случае вирусные белки напоминают рецепторы тромбоцитов, чтобы избежать иммунной реакции организма-хозяина (Rose N.R., 2017). В случае иммунного ответа против этих вирусных белков может возникнуть перекрестная реактивность против

рецепторов тромбоцитов, что впоследствии приводит к аутоантителам, специфичным как для вирусного белка, так и для рецепторов тромбоцитов. Это объясняет инициацию ИТП в некоторых случаях (Zhang W. et al., 2009), которая может быть устранена путем очистки от инфекционного агента, после чего уровень аутоантител уменьшается (Takahashi T. et al., 2004; Stasi R. et al., 2009). Помимо кратковременного снижения количества тромбоцитов, инфекции иногда вызывают сильный иммунный ответ, который может сохраняться и развиваться в хроническую ИТП, что приводит к устойчивому клиренсу тромбоцитов.

1.3.3. Жизненный цикл тромбоцитов при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре

Главным образом патогенез ИТП связан с выработкой аутоантител против тромбоцитов, которые сокращают время циркуляции клеток в периферической крови, изменяют функцию тромбоцитов и/или ингибируют продукцию тромбоцитов (Cines D.V. et al., 2009). Эти аутоантитела в основном направлены против двух наиболее распространенных гликопротеиновых комплексов тромбоцитов – GPIIb-IIIa (интегрин α IIb β 3) и GPIb-IX. Опосредованное антителами разрушение тромбоцитов происходит в селезенке (Nugent D. et al., 2009; McMillan R., 2007), где взаимодействие Fc-части антител, связанных с тромбоцитами, иммуноглобулина G и Fc γ -рецепторов (Fc γ R) на макрофагах инициирует фагоцитоз. Однако, в отличие от анти- α IIb β 3-опосредованной идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, анти-GPIIb α -опосредованная ИТП часто не поддается лечению, и даже спленэктомия не дает терапевтического эффекта. Последние данные показывают, что некоторые антитела анти-GPIIb α тромбоцитов вызывают десИАлирование – процесс, который в конечном итоге приводит к клиренсу тромбоцитов через рецепторы Эшвелла-Морелла гепатоцитов, показывая, что существуют Fc γ R-независимые механизмы утилизации тромбоцитов при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре (Li J. et al., 2014 and 2015). Следует отметить, что многие антитела, нацеленные на

субъединицы GPIIb/IIIa и GPIIb/IIIa в комплексе GPIIb/IIIa-IX, не вызывают клиренса тромбоцитов (Bergmeier W. et al., 2000; Maurer E. et al., 2013), а также не все антитела против GPIIb/IIIa вызывают развитие тромбоцитопении (Liang X. et al., 2016; Yan R. et al., 2015). Вероятно, что тромбоциты секретируют активные Neu1 и Neu3 при связывании антител и/или активации тромбоцитов (Jansen A.G., et al., 2012). Представление о том, что рецептор Эшвелла-Морелла играет значительную роль в клиренсе опсонизированных и десалирированных тромбоцитов против GPIIb/IIIa, дает потенциальное объяснение рефрактерности к спленэктомии, а также к стероидной и внутривенной иммуноглобулиновой терапии.

Интересно, как меняется уровень тромбopoэтина при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре. Как известно, тромбopoэтин является ключевым гормоном, ответственным за выработку тромбоцитов, который синтезируется в печени (Varghese L.N. et al., 2017). Выделенный в кровоток тромбopoэтин включается в циркулирующие тромбоциты через рецептор TPO-R, что объясняет обратную корреляцию между уровнем тромбopoэтина и количеством тромбоцитов в периферической крови (Sauvage F.J. et al., 1996). Как описывалось выше, гепатоцитарный рецептор Эшвелла-Морелла играет важную роль в этом физиологическом процессе (Grozovsky R. et al., 2015). При тромбоцитопениях низкое количество циркулирующих TPO-R-содержащих тромбоцитов часто приводит к высоким уровням тромбopoэтина (Tahara T. et al., 1996). Интересно, что при ИТП уровень тромбopoэтина повышается незначительно и в 30% случаев остается в пределах нормы. Вероятно, что тромбоциты с присоединенным тромбopoэтином быстро удаляются при ИТП (Kosugi S. et al., 1996). Следовательно, один из терапевтических вариантов для пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой включает стимуляцию рецептора тромбopoэтина на мегакариоцитах с помощью агонистов рецепторов тромбopoэтина, которая оказывается успешной у многих пациентов (Rodeghiero F., Carli G., 2017).

1.3.4. Иммунопатологические процессы при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре

Как было описано выше, приблизительно у 60% пациентов с ИТП обнаруживаются аутоантитела, главным образом направленные к гликопротеину GPIIb/IIIa (~70%) и/или к комплексу GPIb-IX-V (~25%) (He R. et al., 1994; Kiyomizu K. et al., 2012). Антитела против GPIa – IIa или GPVI также обнаруживаются в единичных случаях (~5%) (Boylan B. et al., 2004). Нет четкой картины того, как аутоантитела против антигенов тромбоцитов генерируются, но их влияние на клиренс тромбоцитов было полностью доказано. Селезенка является основным органом, где иммунные клетки осуществляют клиренс тромбоцитов (Kuwana M. et al., 2002). В частности, макрофаги селезенки и дендритные клетки могут представлять антигены тромбоцитов Т-хелперам (Th), которые помогают В-клеткам при дифференцировке в плазматические клетки, синтезирующие антитела (Kuwana M., Okazaki Y., Ikeda Y., 2009). Плазматические клетки присутствуют в периферической крови и костном мозге, где они могут дополнительно синтезировать аутоантитела, направленные и на мегакариоциты (Chang M. et al., 2003). Аутоантитела ускоряют клиренс тромбоцитов путем удаления через макрофаги селезенки и с помощью дендритных клеток (Kuwana M., Okazaki Y., Ikeda Y., 2009), активацию системы комплемента (Peerschke E.I. et al., 2010) и апоптоза тромбоцитов (Goette N.P. et al., 2016) или путем ингибирования продукции тромбоцитов мегакариоцитами (Chang M. et al., 2003).

Первоначальные исследования, в которых изучались аутоантитела при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, выявили высокий уровень ассоциированных с тромбоцитами IgG, и вскоре было предположено, что они являются причинным фактором аутоиммунного ответа. Однако было обнаружено, что ассоциированные с тромбоцитами IgG неспецифично связываются с тромбоцитами и обнаруживаются и при других заболеваниях (George J.N., 1990), вероятно, потому что сами тромбоциты могут связывать циркулирующий IgG

через Fc γ RIIa. Большинство аутоантител, выявленных у пациентов с хронической ИТП, относятся к классу IgG, но также обнаруживаются антитела IgM и спорадически IgA (Nishioka T. et al., 2005).

У пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой обнаружены В-клетки, продуцирующие аутоантитела против тромбоцитов, в периферической крови, селезенке и костном мозге. Однако не у всех пациентов имеются В-клетки, реагирующие на тромбоциты (Kim J. et al., 2003), что позволяет предположить существование независимых от В-клеток аутоиммунных механизмов (таких как CD8⁺Т-опосредованный Т-клетками). Анализ последовательности расположения тяжелых цепей Ig показал, что эти антиромбоцитарные антитела развились из ограниченного числа клонов В-клеток. В целом, эти данные подтверждают антиген-специфический ответ CD4⁺Т-клеток у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой. В данном исследовании были отмечены доказательства селективного включения сегмента гена варибельной тяжелой цепи VH3-30, что дает дополнительные доказательства ограниченного ответа олигоклональных В-клеток, нацеленного на ограниченное количество эпитопов на антигенах тромбоцитов у пациентов с ИТП (Roark J.H., 2002).

Интересно участие CD4⁺Т-хелперов в патогенезе идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Так, цитокины, необходимые для функций Th (такие как IL-2, IL-10, IFN- γ), повышены у пациентов с ИТП (Semple J.W. et al., 1996). В то же время выявлен дисбаланс Т-клеток при ИТП: пациенты имеют нарушенное соотношение подгрупп Th1/Th2, в котором преобладает фенотип Th1 (Panitsas F.P., Mouzaki A., 2004; Wang T. et al., 2005). Стало известно, что провоспалительные клетки Th17 играют важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний (Chen X., Oppenheim J.J., 2014). Более высокие уровни клеток Th17 наблюдались в нескольких группах пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой (Guo Z.X. et al., 2009; Ma D. et al., 2008), но не во всех исследованиях (Sollazzo D. et al., 2011). Потенциальная вовлеченность другого подсемейства Th-клеток – Th22 также была исследована при

идиопатической тромбоцитопенической пурпуре. Клетки Th22 обычно стимулируют защитные и регенеративные реакции с преимущественным воздействием на эпителиальные клетки (Eyerich K., Dimartino V., Cavani A., 2017). Повышенная концентрация ИЛ-22 и повышенные уровни подгруппы Т-клеток Th22 наблюдались у пациентов с ИТП, что указывает на их роль в патогенезе этого заболевания (Hu Y. et al., 2012). Эти данные показывают, что множественные популяции Th, включая Th1/Th17/Th22, вносят вклад в патогенез ИТП. В то же время, подобные изменения соотношения популяций Th1/Th17/Th22 не специфичны только для идиопатической тромбоцитопенической пурпурой, поскольку сходные профили Th-популяций наблюдаются при других аутоиммунных заболеваниях.

Помимо аутореактивных В-клеток, CD8⁺Т-клетки также участвуют в патогенезе идиопатической тромбоцитопенической пурпурой. Т-клетки являются частью клеточного иммунитета и имеют разные эффекторные функции по сравнению с В-клетками, секретирующими антитела. Показано, что при ИТП CD8⁺Т-клетки непосредственно лизируют тромбоциты (Olsson B. et al., 2003; Qiu J. et al., 2016), индуцируют апоптоз тромбоцитов (Zhang F. et al., 2006) и ингибируют тромбопоэз мегакариоцитов (Olsson B. et al., 2008). Повышенные уровни CD8⁺Тс были обнаружены у пациентов без аутоантител (Zhao C. et al., 2008). Это свидетельствует о том, что CD8⁺Тс-клеточная опосредованная реакция может протекать и без выработки аутоантител.

Tregs являются важным контрольным пунктом для ограничения иммунитета и обеспечения иммунной толерантности. Они являются важными регуляторами, которые контролируют работу как В-, так и Т-клеток. При ИТП количество Tregs уменьшается, и снижается их функция (Yu J. et al., 2008). При лечении кортикостероидами и/или ритуксимабом идиопатической тромбоцитопенической пурпурой увеличивается уровень Treg, а также их активность (Stasi R. et al., 2008; Ling Y. et al., 2007), это указывает на то, что потеря толерантности имеет важное значение для патогенеза ИТП. Таким образом, ясно, что у пациентов с ИТП присутствуют более низкие уровни Treg, которые восстанавливаются после

успешного лечения. Тем не менее, до сих пор неясно, облегчает ли восстановление функциональности Treg непосредственно болезнь или является просто маркером восстановленной иммунной толерантности.

Подводя итог вышесказанному, следует отметить, что в процессах мегакариопоэза, клиренсе тромбоцитов и в патогенезе идиопатической тромбоцитопенической пурпуры остается много неясного. До настоящего времени по-прежнему не решены вопросы оценки прогноза течения и исхода ИТП на основании анализа изменений клинико-лабораторных показателей в начальной стадии заболевания. Таким образом, исследования, направленные на изучение прогностической значимости лабораторных тестов, раскрывающие характер течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры ввиду недостаточности и противоречивости существующей информации продолжают оставаться актуальными и востребованными.

Как и другие клетки, мегакариоциты функционально связаны с интерстициальной жидкостью костного мозга (миелоплазмой). Безусловно, необходимо накопить новый блок данных в гематологии, связанных как с оценкой роли миелоплазмы как жизнеобеспечивающего фактора, так и с расширением спектра диагностических возможностей идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Для решения данных задач была выполнена предлагаемая работа.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика обследуемого контингента

Исследования проводились на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации» в клиничко-диагностической лаборатории Клиник Самарского государственного медицинского университета и Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Самарская областная детская клиническая больница имени Н.Н. Ивановой».

Под наблюдением находились 272 человека в возрасте от 0 до 90 лет с 2014 по 2020 гг. с клиническим диагнозом «Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура» (код по МКБ 10: D69.3), которые состояли на стационарном лечении и диспансерном учете в Самарском областном гематологическом центре, развернутом на базе клиники госпитальной терапии Самарского государственного медицинского университета, а также в центре детской гематологии и онкологии Самарской области, располагающемся на базе отделения онкологии, гематологии и химиотерапии в ГБУЗ «Самарская областная детская клиническая больница имени Н.Н. Ивановой». В качестве группы сравнения были обследованы 39 пациентов с рефрактерной железодефицитной анемией (код по МКБ 10: D50.0). Средний возраст обследуемой группы составил $51,4 \pm 18,7$, распределение по полу было следующим: 38,6% составили мужчины и 61,4% – женщины.

Критерии включения в клиническую часть исследования:

1. Пациенты с впервые установленным диагнозом идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура.
2. Пациенты с железодефицитной анемией, которым по медицинским показаниям проводили пункцию костного мозга.
3. Информированное согласие на участие в письменной форме.

Критерии исключения из клинической части исследования:

1. Пациенты с вторичными тромбоцитопениями.
2. Отказ пациента от участия в исследовании.
3. Пациенты, у которых сочетались признаки тромбоцитопении и анемии
4. Положительные маркеры воспаления – количество лейкоцитов крови более $10,0 \times 10^9/\text{л}$, сдвиг лейкоформулы влево, СОЭ >10 мм/ч у мужчин и >15 мм/ч у женщин, уровень С-реактивного белка >3 мг/л, фибриногена >4 г/л.

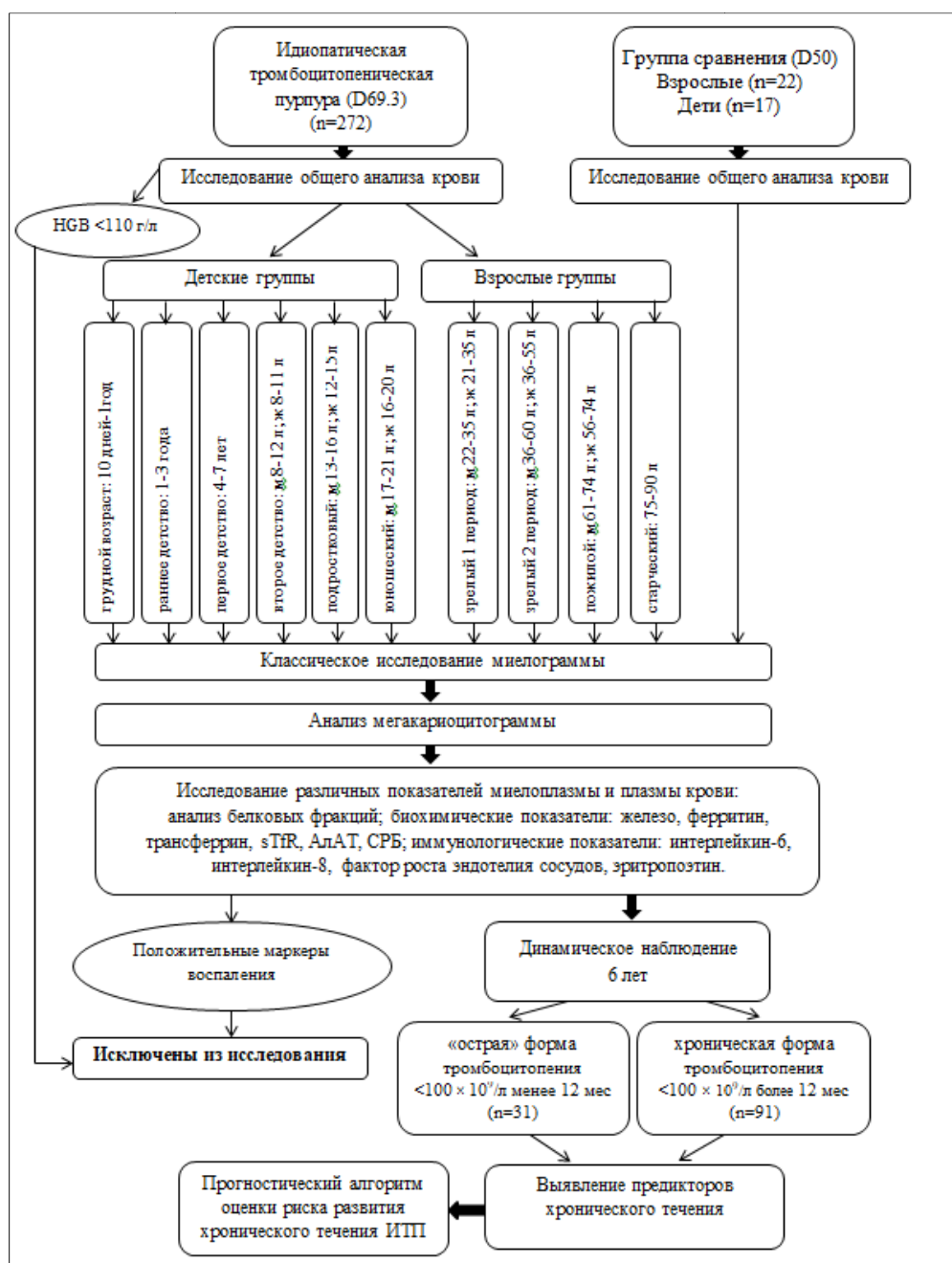


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Дальнейшее исследование пациентов проводилось согласно разработанному дизайну (рисунок 1).

Учитывая особенности возрастных изменений, все пациенты с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой были разделены на группы детского и взрослого населения (Крылов А.А., 2005). Первую группу составили пациенты от 10 дней до юношеского возраста, а именно, – мальчики до 21 года и девочки до 20 лет. Вторая группа включала в себя мужчин от 22 до 90 лет и женщин от 21 года до 90 лет. В дальнейшем, учитывая особенности возрастных изменений (Крылов А.А., 2005), группа детского населения была разделена на 6 подгрупп:

- грудной возраст – дети в возрасте от 10 дней до года;
- раннее детство – 1-3 года;
- первое детство – 4-7 лет;
- второе детство – мальчики от 8 до 12 лет и девочки от 8 до 11 лет;
- подростковый возраст – мальчики от 13 до 16 лет и девочки от 12 до 16 лет;
- юношеский возраст – юноши 17-21 год, девушки 17-20 лет.

Группа взрослого населения состояла из 4 подгрупп (рисунок 2):

- первый период зрелости – мужчины 22-35 лет и женщины 21-35 лет;
- второй период зрелости – мужчины 36-60 лет и женщины 36-55 лет;
- пожилой возраст – мужчины 61-74 года и женщины 56-74 года;
- старческий возраст – от 75 лет и до 90 лет.

Согласно полученным результатам, среди детского населения пик заболеваемости идиопатической тромбоцитопенической пурпурой приходится на возраст от 1 года до 3 лет, что обусловлено «критическими периодами иммунной системы» и режимом прививочного календаря. В возрастном периоде от 4 до 7 лет заболевание чаще встречается среди мальчиков, а в остальные возрастные периоды – у девочек. Среди взрослого населения наиболее распространено заболевание в возрасте от 36 до 74 лет, чаще болеют женщины.

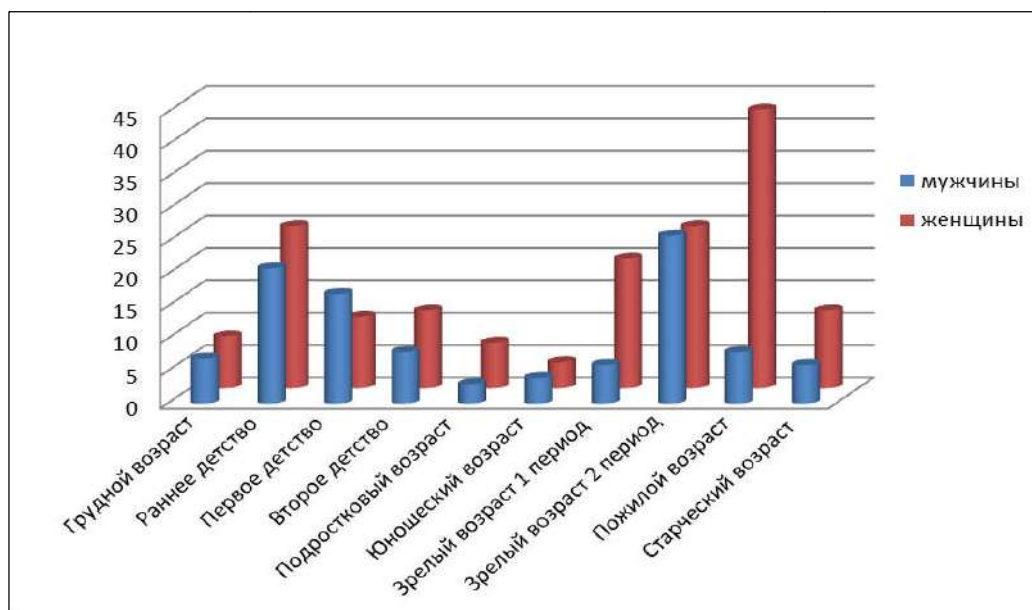


Рисунок 2 – Демографическая структура пациентов с ИТП

По характеру и выраженности геморрагического синдрома (классификация ВОЗ) пациенты распределялись следующим образом: 0-й степени – отсутствие геморрагического синдрома; 1-й степени – петехии и экхимозы (единичные); 2-й степени – незначительная потеря крови (мелена, гематурия, кровохарканье); 3-й степени – выраженная потеря крови (кровотечение, требующее переливания крови или кровезаменителей); 4-й степени – тяжелая кровопотеря (кровоизлияния в головной мозг и сетчатку глаза, кровотечения, заканчивающиеся летальным исходом) (рисунок 3).

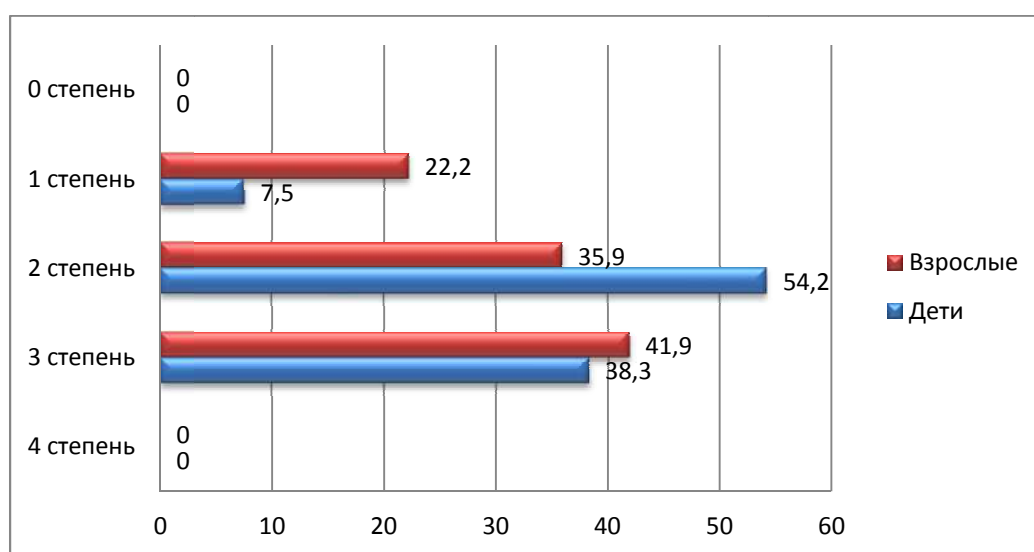


Рисунок 3 – Распределение пациентов по характеру и выраженности геморрагического синдрома ИТП у детского и взрослого населения

После проведения всех необходимых исследований пациенты с ИТП находились под динамическим наблюдением в течение 6 лет. Далее, согласно национальным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (первичной иммунной тромбоцитопении), у взрослых (Меликян А.Л., Пустовая Е.И. и др., 2018), пациентов с ИТП распределяли по длительности течения заболевания на впервые диагностированную форму (длительность до 3 мес. с момента диагностики), персистирующую форму (от 3 до 12 мес. от момента диагностики) и хроническую форму (длительность более 12 мес. от момента диагностики). Затем группы с впервые диагностированной и персистирующей формой объединили в группу «острые». Группа «острые» среди всех возрастных групп составила 61,0%, с хроническим течением – 39,0%, при этом у детей чаще встречались впервые диагностированные и персистирующие формы, тогда как у взрослых преобладало хроническое течение заболевания (рисунок 4).

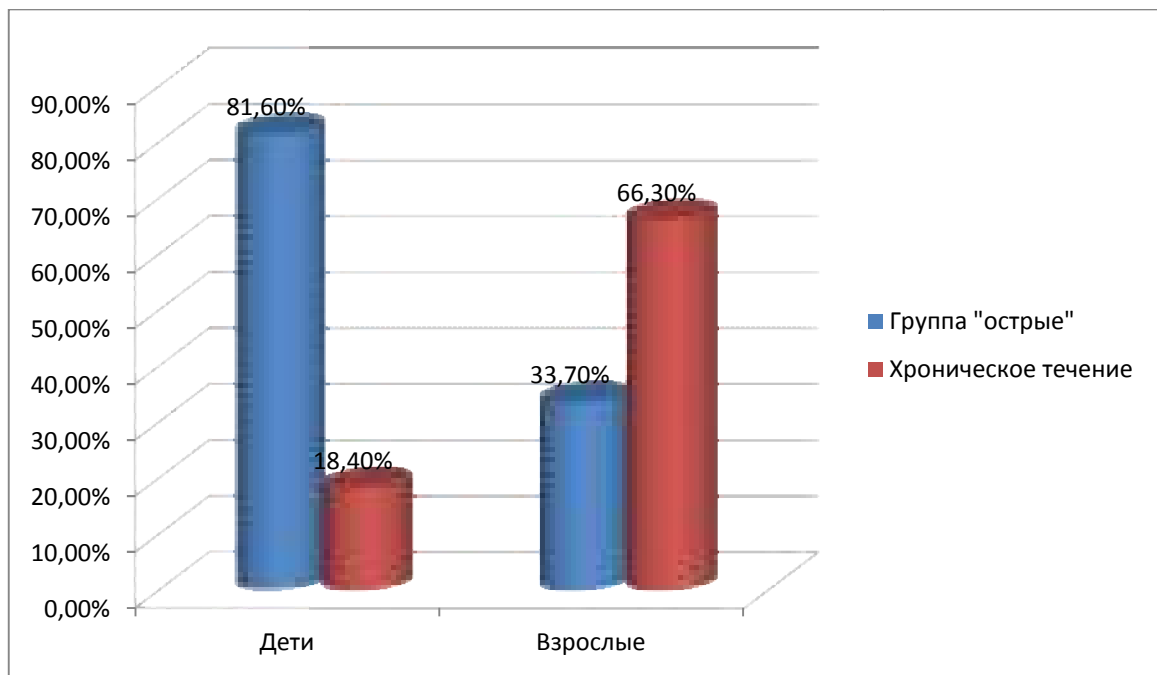


Рисунок 4 – Соотношение форм течения ИТП среди детского и взрослого населения

Выделяли 3 степени раздражения мегакариоцитарного ростка: I степень – до 20 мегакариоцитов на 250 полей зрения; II степень – от 21 до 99

мегакариоцитов на 250 полей зрения; III степень – более 100 мегакариоцитов на 250 полей зрения (рисунок 5).

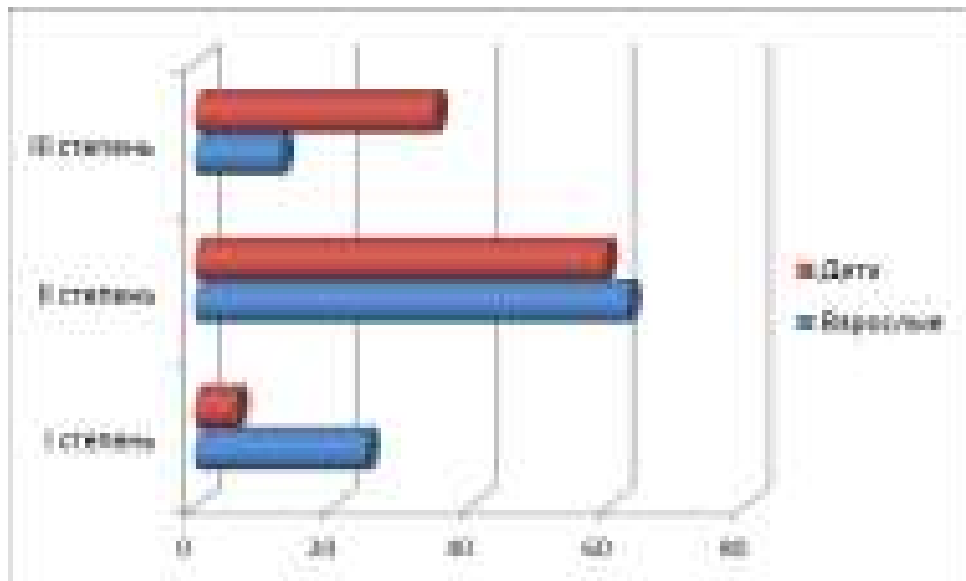


Рисунок 5 – Степень раздражения мегакариоцитарного ростка у взрослых и детей с ИТП

Изменения показателей мегакариоцитогаммы можно разделить на 2 типа: 1 тип – с преобладанием незрелых форм мегакариоцитов (мегакариобластов, промегакариоцитов, базофильных мегакариоцитов), 2 тип – с увеличением «голаядерных» форм и полихроматофильных мегакариоцитов без отшнуровки с явлениями гиперсегментации ядра. 3 тип характеризовался отсутствием качественных изменений мегакариоцитогаммы (рисунок 6).

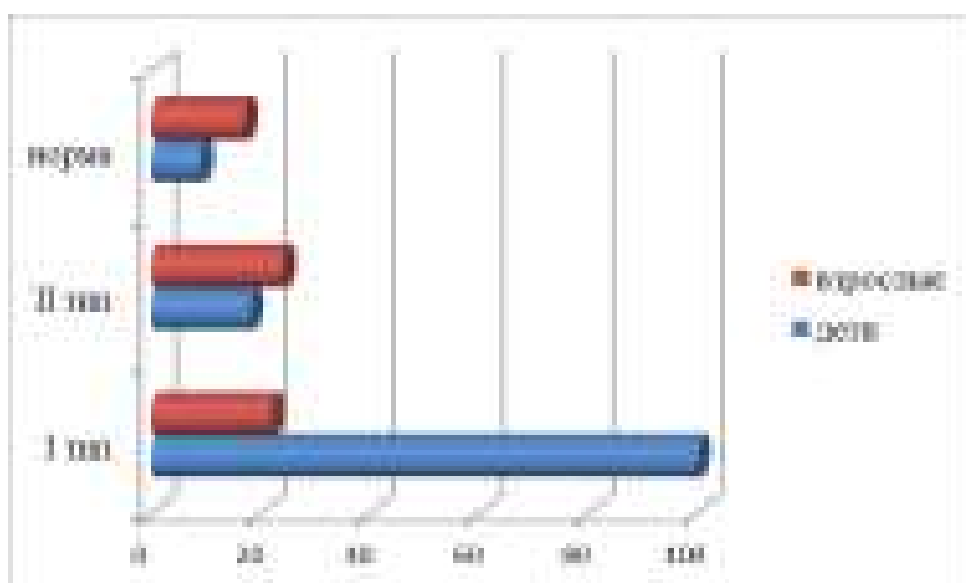


Рисунок 6 – Типы мегакариоцитогамм у детей и взрослых с ИТП

Материалом для исследования служили сыворотка крови, плазма, цельная кровь, костный мозг, миелоплазма.

2.1.1. Сбор образцов сыворотки крови

Исследуемые образцы были взяты натощак с 08.00 до 10.00. Путем флеботомии локтевой вены получали цельную кровь в объеме 4 мл в пробирки фирмы BD Vacutainer (США) с активатором свертывания кремнеземом. Сыворотку крови получали путем центрифугирования 10 минут при 1200g при 25°C.

2.1.2. Сбор образцов цельной крови

Образцы цельной крови получали путем флеботомии локтевой вены в пробирки фирмы BD Hemogardtm (США) в объеме 4 мл с антикоагулянтом К₂ЭДТА.

2.1.3. Сбор образцов костного мозга

Исследуемые образцы костного мозга получали путем трепанобиопсии подвздошной кости. Пункцию проводили в процедурном кабинете с соблюдением правил асептики и выполняли иглой Кассирского с предохранительным щитком, расстояние которого устанавливали в зависимости от конституции и возраста пациента. Из полученного материала приготавливали мазок для подсчета миелограммы и мегакариоцитограммы. Для этого биоптат из шприца под углом 45° выливали на обезжиренное предметное стекло и зашлифованным концом другого стекла выполняли тонкие мазки. После приготовления мазков аспират переносили в пробирку фирмы BD Hemogardtm (США) объемом 2 мл с антикоагулянтом К₂ЭДТА и перемешивали плавным покачиванием 8-10 раз.

2.1.4. Получение миелоплазмы

Аспират костного мозга, подготовленный вышеописанным способом, центрифугировали в течение 5 минут при 1000 g. Отделяли осадок, а надосадочную миелоплазму перемешивали с помощью вортекса в течение 15-20 секунд непосредственно перед анализом.

Проводились комплексное биохимическое, гематологическое, гемостазиологическое, серологическое исследование крови, биохимическое и серологическое исследование миелоплазмы, подсчет миелограммы и мегакариоцитогаммы у всех пациентов.

2.2. Используемые методы исследования

2.2.1. Миелограмма

Исследование миелограммы проводили для изучения клеточности костного мозга, процессов пролиферации и созревания отдельных ростков кроветворения, его клеточного состава и функционального состояния.

2.2.1.1. Подсчет миелокариоцитов

Количество миелокариоцитов определяли на анализаторе SYSMEX KX-21N апертурно-импедансным методом. В случае превышения предела линейности анализатора пунктат разводили 0,9% раствором хлорида натрия в 10 и 25 раз. После проведения повторного исследования делали пересчет и сопоставляли результаты.

2.2.1.2. Подсчет мегакариоцитов

Подсчет мегакариоцитов осуществляли путем просматривания окрашенного стандартным методом препарата костного мозга под малым увеличением, используя окуляр и объектив 10 (Луговская С.А., 2018). Препарат просматривали в области щеточки, где преимущественно концентрируются мегакариоциты. Подсчет проводили в нескольких мазках с выведением средних цифр.

2.2.1.3. Окраска препаратов костного мозга

Исследуемые препараты костного мозга фиксировали раствором фиксатора-красителя по Лейшману в течение 2-3 мин. После окончания фиксации ополаскивали препараты в буферном растворе и помещали в рабочий раствор красителя азур-эозин по Романовскому фирмы ДИАХИМ-ГЕМИСТЕЙН-Р (профессионал) (РФ) на 12 мин. Рабочий раствор готовили, смешивая краситель с буферным раствором в соотношении 1:10 – 1:15.

2.2.1.4. Микроскопическое исследование под малым увеличением

Под малым увеличением микроскопа Nikon ECLIPSE E200, используя объектив и окуляр 10, ориентировочно исследовали препараты костного мозга. Определяли плотность и распределение всех ядерных клеток, оценивали клеточность препарата, оценивали мономорфность или полиморфность, выбирали более подходящие участки для подсчета на большом увеличении.

2.2.1.5. Подсчет миелограммы с иммерсионным объективом

Под большим увеличением с иммерсионной системой объектив 100, окуляр 10 производили подробное исследование пунктата, а также дифференцированный подсчет клеток. Рассчитывали следующие индексы:

- *Лейкоэритробластическое соотношение (Л/Э)* – отношение суммы содержания всех элементов гранулоцитарного ростка костного мозга в процентах к сумме содержания всех элементов эритроидного ростка в процентах;
- *Индекс созревания нейтрофилов (ИСН)* – отношение процента промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов к проценту палочкоядерных и сегментоядерных;
- *Индекс созревания эритрокариоцитов (ИСЭ)* исчисляли как $ИСЭ = \frac{\text{полихроматофильные} + \text{оксифильные нормобласты}}{\text{общее процентное содержание всех нормобластов}}$.

2.2.2. Мегакариоцитограмма

Используя увеличение в 400 раз (объектив 40, окуляр 10), подсчитывали процентное содержание различных видов мегакариоцитов. В состав мегакариоцитограммы входят следующие виды мегакариоцитов:

Мегакариобласты – клетки диаметром 18-20 мкм с округлым ядром, хроматин которого мелкосетчатой структуры, редко в виде клубка. Конфигурация ядра более грубая, чем у недифференцированного бласта, нередко видны нуклеолы. Базофильная цитоплазма в виде узкого ободка без зернистости. Контуров клеток неровные из-за отростков цитоплазмы и образования «голубых» пластинок (рисунок 7);

Промегакариоциты – клетки диаметром 20-40 мкм с более крупным ядром и более плотным распределением хроматина (по сравнению с мегакариобластом) и тенденцией к полиморфизму: появляются складчатость и вдавления ядра, формируются линии шнурования ядра. Цитоплазма базофильная, беззернистая, в виде узкого ободка, иногда с отростками и образованием «голубых» пластинок (рисунок 8);

Мегакариоциты базофильные – клетки диаметром 60-120, с полиморфным многолопастным ядром, хроматин может быть нежной структуры, либо более зрелым. Цитоплазма базофильного цвета в виде неширокого ободка, встречаются формы с азурофильной зернистостью (рисунок 9);

Мегакариоциты полихроматофильные – клетки с размером более 40-60 мкм, с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Ядро крупное, многолопастное, светло-голубая обильная цитоплазма содержит многочисленные азурофильные гранулы (рисунок 10);

Мегакариоциты оксифильные – клетки диаметром 60-120 мкм, с резко пикнотичным многолопастным ядром, розовой цитоплазмой и обильной азурофильной зернистостью (рисунок 11);

Инволютивные формы мегакариоцитов – формы с разреженным, иногда полуразрушенным ядром и большой зоной бледно-розовой цитоплазмы (рисунок 12);

Голоядерные формы в препаратах представлены в виде отдельно лежащего многолопастного ядра, иногда имеют остатки цитоплазмы (рисунок 13).

Процесс тромбоцитообразования мегакариоцитов оценивали путем морфологического выделения пластинкообразующих и пластинкосодержащих форм мегакариоцитов.

- Пластинкосодержащие мегакариоциты содержат в цитоплазме крупную зернистость, которая располагается слоисто и по величине и структуре напоминает тромбоциты (рисунок 14);
- Пластинкообразующие мегакариоциты – клетки, у которых в цитоплазме и вне клетки лежат свободные тромбоциты (рисунок 15).

Дегенеративные формы могут наблюдаться во всех формах мегакариоцитов, среди них определяли различные виды изменений: формы с множеством мелких ядер – многолопастное ядро мегакариоцита в данной форме представлено в виде разобщенных мелких ядер, которые иногда соединены между собой в виде мелких перетяжек. Ядра могут быть разными по размеру и форме (рисунок 16); с вакуолизацией цитоплазмы (рисунок 17); микроформы (рисунок 18); гипогранулярные (рисунок 19).

Отдельно подсчитывали количество мегакариоцитов с явлением эмпериполеза (рисунок 20). Эмпериполез – биологический феномен, описывающий активное проникновение одной клетки в другую без повреждения последней.

Поскольку в мазках костного мозга было обнаружено мало мегакариобластов, и существует затруднение в морфологическом подсчете этих клеток, мы объединили мегакариобласты и промегакариоциты в незрелые мегакариоциты.

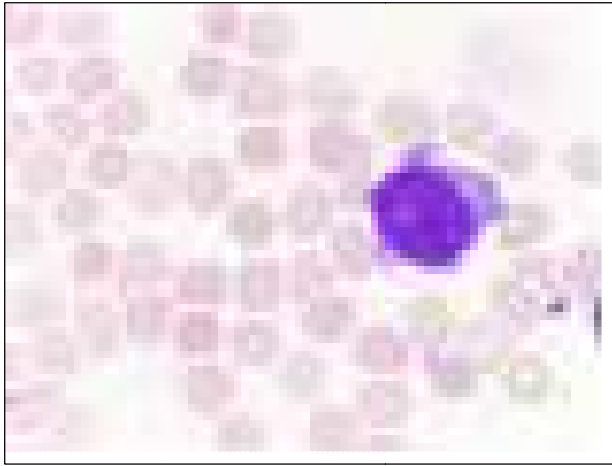


Рисунок 7 – Мегакариобласт
(ув. $\times 1000$)

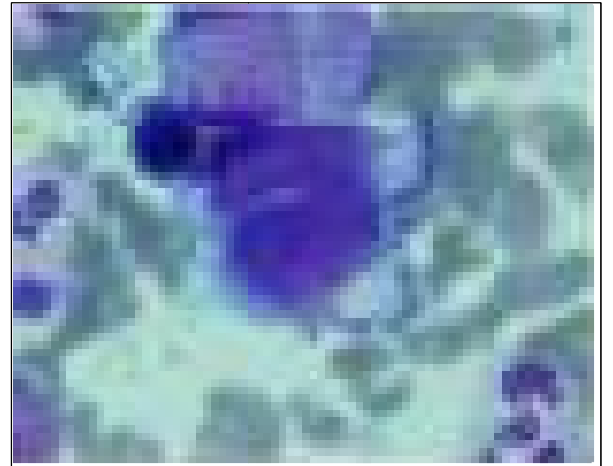


Рисунок 8 – Промегакариоцит
(ув. $\times 1000$)



Рисунок 9 – Базофильный
мегакариоцит (ув. $\times 1000$)

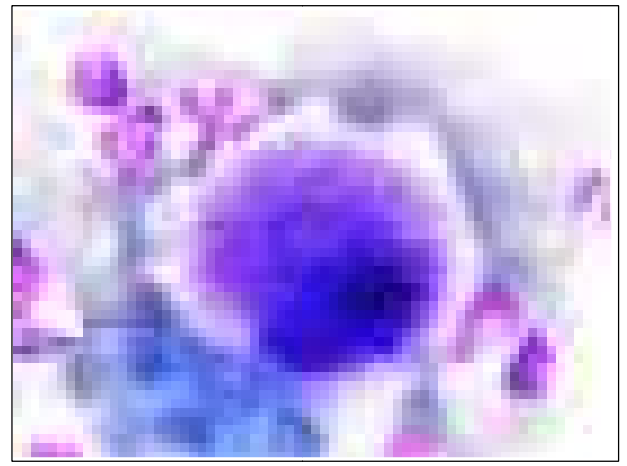


Рисунок 10 – Полихроматофильный
мегакариоцит (ув. $\times 1000$)

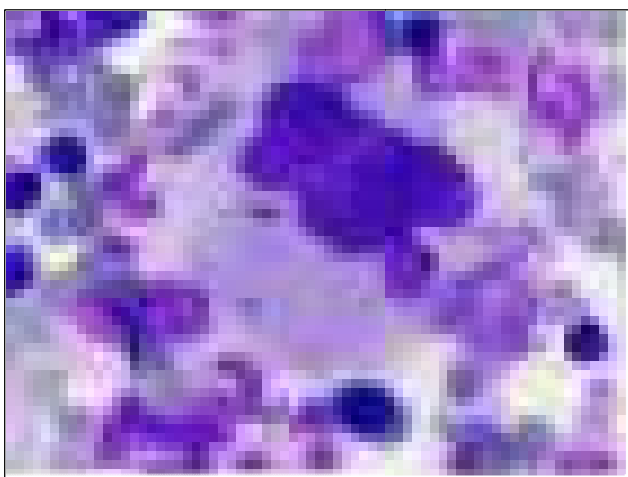


Рисунок 11 – Оксифильный
мегакариоцит (ув. $\times 1000$)

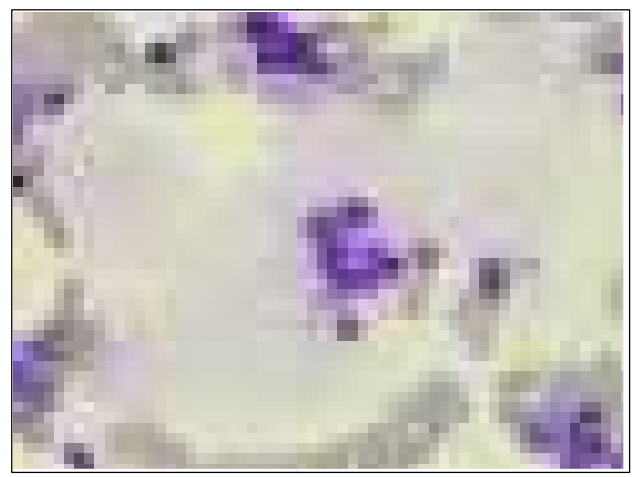


Рисунок 12 – Инволютивная форма
мегакариоцита (ув. $\times 400$)

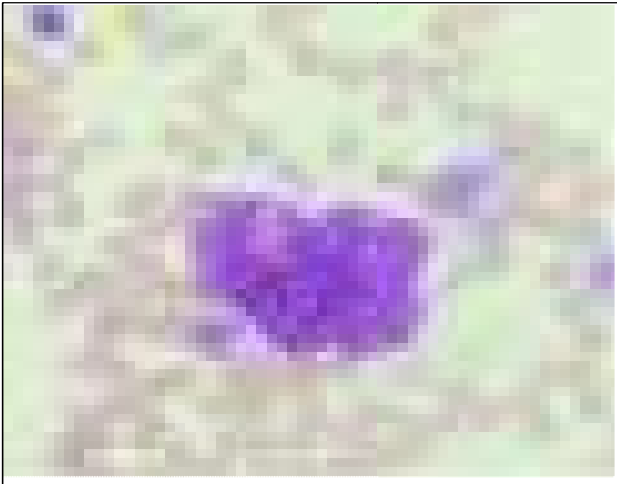


Рисунок 13 – Голоядерная форма
мегакариоцита (ув. $\times 1000$)

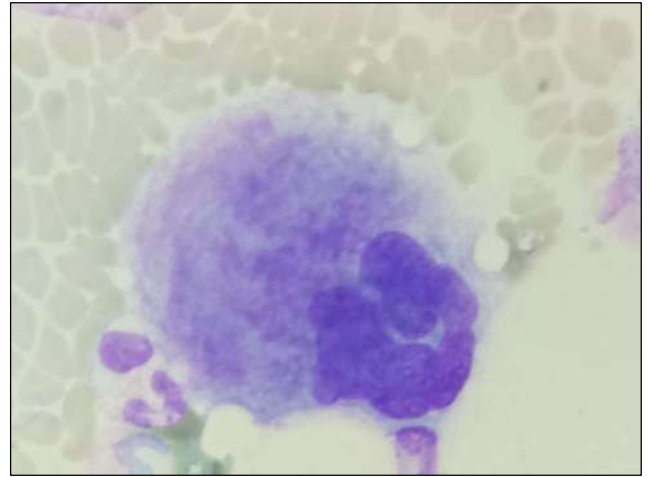


Рисунок 14 – Пластинкосодержащий
мегакариоцит (ув. $\times 1000$)

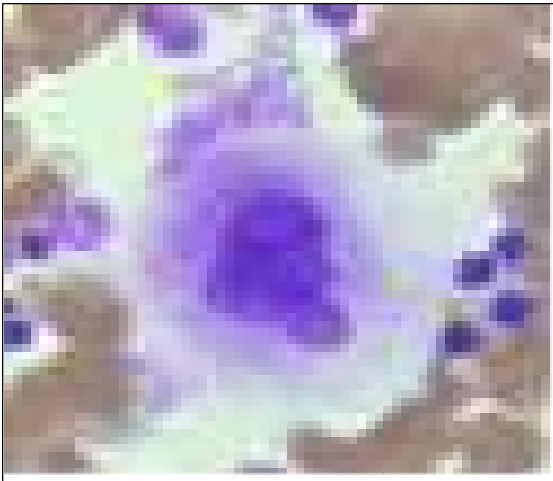


Рисунок 15 – Пластинкообразующий
оксифильный мегакариоцит (ув. $\times 1000$)

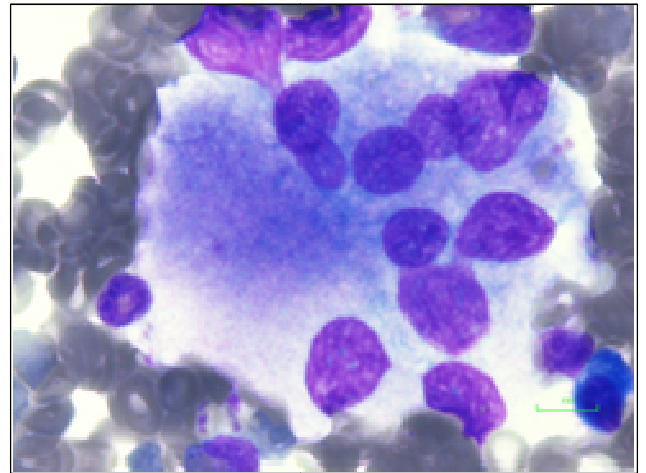


Рисунок 16 – Мегакариоцит с
множеством мелких ядер (ув. $\times 1000$)

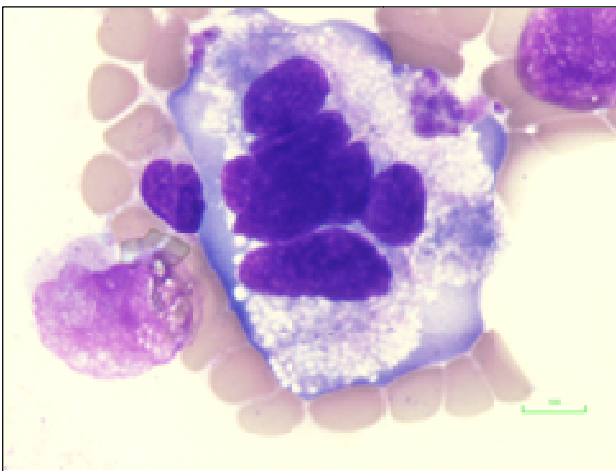


Рисунок 17 – Вакуолизированная
форма мегакариоцита (ув. $\times 1000$)

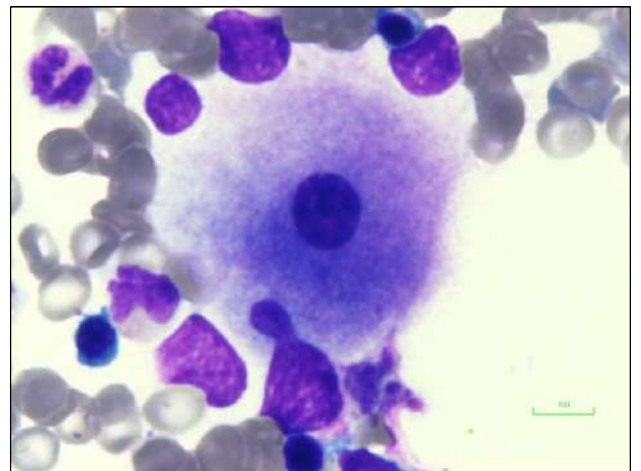


Рисунок 18 – Микроформа
мегакариоцита (ув. $\times 1000$)

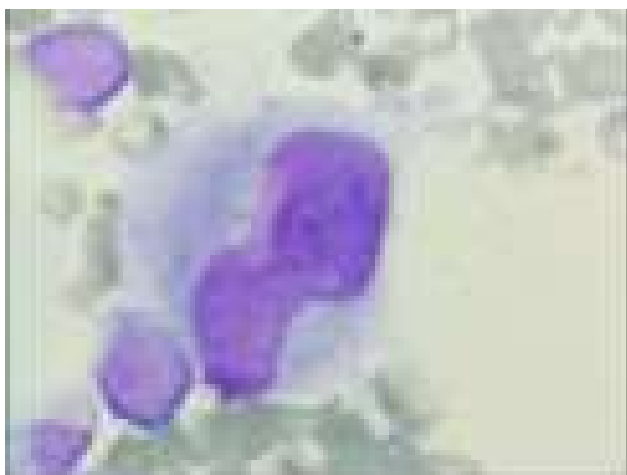


Рисунок 19 – Гипогранулярный
мегакариоцит (ув. $\times 1000$)

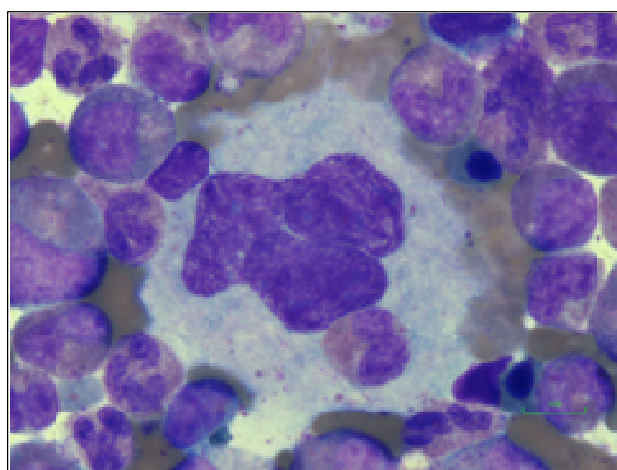


Рисунок 20 – Эмпериоплез
(ув. $\times 1000$)

2.2.3 Гематологические методы исследования

Оценка показателей общего анализа крови проводилась с помощью автоматического гематологического анализатора фирмы Sysmex XT-2000i.

Данный прибор является автоматическим гематологическим анализатором, который может анализировать и выводить результаты образца крови по 24 параметрам: количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина, показатель гематокрита, тромбокрита, средний объем эритроцитов и тромбоцитов, среднее содержание и средняя концентрация гемоглобина в одном эритроците, ширина распределения эритроцитов и тромбоцитов по объему, относительное и абсолютное содержание нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и лимфоцитов, показатель соотношения крупных тромбоцитов.

В анализаторе Sysmex XT-2000i используется метод прямого подсчета эритроцитов и тромбоцитов в проточном канале. Часть крови отделяется от аспирированной цельной крови и смешивается с разбавителем в заданной пропорции. Определенная часть данного раствора отправляется в камеру анализатора и проходит через небольшое отверстие, называемое апертурой, с каждой стороны которой имеются электроды, где проходит постоянный ток. При прохождении через апертуру кровяных телец, находящихся в растворе, сопротивление постоянного тока между электродами изменяется и приводит к

изменению электрического импульса пропорционально размеру клетки крови. По числу импульсов рассчитывается количество клеток крови, а гистограмма клеток крови выстраивается по величинам импульсов. Такие небольшие по размерам клетки, как тромбоциты, при прохождении измерительного канала генерируют электрические импульсы низкой амплитуды (высоты), а сравнительно большие клетки, например, эритроциты – импульсы высокой амплитуды. Устройством, позволяющим получить информацию о размерах клеток в виде гистограмм, где каждый канал соответствует определенному объему клеток, является многоканальный дискриминатор, разделяющий импульсы по величине амплитуды. Получить общее количество прошедших через датчик эритроцитов – RBC (Red Blood Cells) можно путем выделения на гистограмме зоны объемов клеток, соответствующих эритроцитам, и суммирования данных по всем каналам. Если при суммировании результатов подсчета эритроцитов значение каждого канала умножить на величину объема соответствующего канала, то можно получить величину суммарного объема, который занимают эритроциты, то есть гематокрит (HCT). Средний объем эритроцитов (MCV) можно получить при делении гематокритной величины на концентрацию эритроцитов. Разделив содержание гемоглобина на количество эритроцитов, получаем среднее содержание гемоглобина в одном эритроците (MCH), а разделяя среднее содержание гемоглобина в одном эритроците на средний объем эритроцитов, имеем в итоге среднюю концентрацию гемоглобина в одном эритроците (MCHC). Возможно получение таких же показателей для тромбоцитов: концентрация тромбоцитов – PLT, средний объем тромбоцитов – MPV, распределение тромбоцитов по размерам – PDW.

В основе анализа количества и параметров лейкоцитов и ретикулоцитов лежит метод проточной цитофлуориметрии с использованием флюоресцентного красителя полиметина и полупроводникового лазера. Регистрация флюоресценции и светорассеяния от конкретной клетки в клеточной суспензии лежит в основе метода проточной цитометрии. Клетки, находясь в ламинарном потоке жидкости, выстраиваются в цепочку друг за другом за счет разности

давлений между образцом и обтекающей жидкостью клетки после подачи под давлением в проточную ячейку (т.н. гидродинамическое фокусирование). Высокочувствительные детекторы, расположенные вокруг проточной ячейки, регистрируют флюоресценцию и рассеянное лазерное излучение каждой клетки, проходящей через лазерный луч, после чего полученный сигнал передается в компьютер и обрабатывается.

Концентрацию гемоглобина Sysmex XT-2000i определяет с помощью SLS-метода детекции гемоглобина, при котором используется не содержащий цианида лаурилсульфат натрия (SLS). Этот реагент вызывает гемолиз эритроцитов и лейкоцитов в пробе, который начинается с изменения глобина, затем происходит окисление группы гема. Гидрофильные группы SLS связываются с группой гема и образуется стабильное окрашенное комплексное соединение (SLS-HGB), которое подвергается анализу с применением фотометрического метода. Светодиод излучает монохроматический свет, который при прохождении через смесь поглощается комплексными соединениями SLS-HGB. Затухание измеряется с помощью фотодатчика. Значение затухания является обратно пропорциональным концентрации гемоглобина в пробе. Абсорбционные фотометрические методы обычно подвержены влиянию мутности самой пробы. Мутность проб крови может быть вызвана липемией либо лейкоцитозом. За счет использования метода SLS-HGB количество таких включений может быть минимизировано благодаря воздействию реагента.

Подсчет развернутой лейкоцитарной формулы производился в окрашенных препаратах периферической крови. Полученные препараты высушиваются на воздухе, маркируются, окрашиваются по методу Романовского, смываются дистиллированной водой, снова просушиваются на воздухе. С помощью светового микроскопа Nikon ECLIPSE E200 по унифицированной методике поводится морфологическое исследование форменных элементов крови.

2.2.4. Биохимические методы исследования

В плазме и миелоплазме определяли концентрацию общего белка,

альбумина, железа, ферритина, трансферрина, растворимых рецепторов трансферрина (sTfR), активность аланинаминотрансферазы. Исследования проводили на автоматическом биохимическом анализаторе «Cobas Integra 400+» фирмы «Roche-Diagnostics» (Швейцария) с помощью коммерческих наборов реактивов фирмы «Roche-Diagnostics» (Швейцария, Германия).

В основе определения указанных ферментов и метаболитов лежат следующие принципы:

- **Концентрация общего белка.** Колориметрический анализ. Образование биуретового комплекса фиолетового цвета происходит при взаимодействии двухвалентной меди с пептидными связями белка в щелочном растворе. Предотвращение самовосстановления меди происходит за счет йодида калия, а также стабилизация в растворе образовавшегося соединения происходит благодаря тартрату натрия или калия. Интенсивность цвета прямо пропорциональна концентрации белка, степень поглощения светового пучка максимальна при длине волны 552 нм.
- **Альбумин.** Колориметрический анализ, метод конечных точек. Происходит образование сине-зеленого комплекса при связывании альбумина с бромкрезоловым зеленым анионным красителем при pH среды 4.1. Концентрация определяется измерением увеличения оптической плотности при длине волны 583 нм.
- **Железо** определяли Феррозиновым методом. Высвобождение железа из трансферрина осуществляется в кислой среде. При использовании детергента очищаются липемические образцы. Аскорбат способствует уменьшению высвобожденных ионов Fe^{3+} до ионов Fe^{2+} , вступающих в реакцию с феррозином, формируя окрашенный комплекс. Интенсивность цвета напрямую зависит от содержания железа, степень повышения абсорбции определяется при длине волны 552 нм.
- Активность **аланинаминотрансферазы** исследовали методом нарастания концентрации конечного продукта реакции, соответствующим рекомендациям

Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины (IFCC). При катализации аланинаминотрансферазой реакции между L-аланином и 2-оксоглутаратом пируват восстанавливается до лактата и происходит окисление НАДН, под действием лактатдегидрогеназы (ЛДГ). В первой реакции обязательно участвует пиридоксальфосфат в качестве коэнзима, что обеспечивает полную активацию фермента. Измеряется снижение оптической плотности при длине волны 340 нм.

- **Ферритин** был определен иммунологическим латексным тестом, в котором в результате реакции антиген-антитело между ферритином и антителами к нему развивается реакция агглютинации. Степень агглютинации пропорциональна количеству ферритина и оценивается по величине оптической плотности реакционной смеси.
- **Трансферрин.** Антитела, содержащиеся в реагенте, взаимодействуют с трансферрином. Увеличение оптической плотности, вызванное образованием комплексов, измеряется турбидиметрическим методом.
- **Растворимые рецепторы** трансферрина (sTfR) взаимодействуют с антителами, содержащимися в реагенте. Увеличение оптической плотности, вызванное образованием комплексов, измеряется нефелометрическим методом.

2.2.5. Электрофоретическое разделение белков

С помощью капиллярного зонного электрофореза на приборе «Minicap» (Франция) определяли белковые фракции. Разделение компонентов исследуемой жидкости происходит под действием электрического поля в тонком кварцевом капилляре. Микрообъем анализируемого раствора вводят в капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером. После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30 кВ) компоненты смеси приводятся в движение с разной скоростью, которая зависит от заряда и массы (точнее – величины ионного радиуса). Таким образом, зона детекции достигается разными

компонентами смеси в разное время.

2.2.6. Серологические методы исследования

Определяли концентрацию интерлейкина-6, интерлейкина-8, эритропоэтина и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в миелоплазме и плазме методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Использовали наборы реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-6, интерлейкина-8, эритропоэтина и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) от «Вектор-Бест» (Россия).

В основе метода определения лежит трехстадийный «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моно- и поликлональных антител.

Инкубирование исследуемых, калибровочных и контрольных образцов в лунках с иммобилизованными моноклональными антителами к ИЛ-6, ИЛ-8, эритропоэтину и VEGF происходит на первой стадии анализа. Имеющийся в образцах ИЛ-6, ИЛ-8, эритропоэтин и VEGF связывается с иммобилизованными антителами. На второй стадии связавшийся ИЛ-6, ИЛ-8, эритропоэтин или VEGF взаимодействует при инкубации с конъюгатом № 1 (поликлональные антитела к перечисленным выше). На третьей стадии связавшийся конъюгат № 1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом № 2 (стрептавидин с пероксидазой хрена).

С использованием субстрата пероксидазы хрена можно определить количество связавшегося конъюгата № 2 цветной реакцией – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания напрямую зависит от содержащегося в образце ИЛ-6, ИЛ-8, эритропоэтина и VEGF соответственно.

Далее измеряли оптическую плотность раствора в лунках на фотоэлектроколориметре и на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию ИЛ-6, ИЛ-8, эритропоэтина и VEGF в анализируемых образцах.

2.2.7. Статистическая обработка результатов исследований

Статистический анализ данных проводили с помощью программы MedCalc версия 9,0 и программы SPSS 21. Для определения типа распределения данных использовали гистограммы, критерий Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка, показатели асимметрии и эксцесса. В большинстве случаев распределение отличалось от нормального. Статистические параметры представлены в виде среднего арифметического и его стандартного отклонения ($M \pm SD$) для данных с нормальным распределением, а также в виде медианы и интерквартильного размаха ($Me [25\%;75\%]$) с ненормальным распределением.

Различия между группами оценивали t -критерием Стьюдента и непараметрическим критерием Манна-Уитни соответственно распределению данных. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. При сравнении более трех групп использовали непараметрический статистический критерий Краскела-Уоллиса. Для оценки взаимосвязей между разными показателями применяли коэффициент корреляции Спирмена. Для переменных был проведен ROC-анализ с определением точки отсечения cut off и расчетом площади под кривой (AUC) при доверительной вероятности 95%.

Для выбора статистически значимых параметров для прогноза хронического течения ИТП был применен метод (алгоритм) «случайный лес», где из входного потока данных выбирается иерархия важности параметров и строятся аналитические зависимости на основе использования критерия χ^2 Пирсона.

2.3. Валидация биохимических методик исследования миелоплазмы

Исследование миелоплазмы имеет определенные ограничения, связанные с отсутствием разработки стандартизированного преаналитического этапа и валидации. Так как мы использовали для исследования миелоплазмы тест-системы, созданные для работы с другими биологическими материалами, возникла необходимость проведения валидации.

Главная цель валидирующих мероприятий – гарантировать, что выбранная аналитическая методика будет давать воспроизводимые и достоверные результаты, соответствующие поставленной цели. Проведение валидации происходило в соответствии с «ГОСТ Р ИСО 15189-2015 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности», с приказом Минздрава России от 07 февраля 2000 года № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» и протоколами Института Клинических Лабораторных Стандартов CLSI (США).

Согласно пункту 5.5.1.3 ISO 15189 стандартные методы, использованные вне области своего предназначенного применения, должны проходить процесс валидации с необходимостью установления линейности (рабочего диапазона) по протоколу CLSI EP6-A, прецизионности (CLSI EP5-A2), правильности (CLSI EP15-A2), аналитической специфичности (ГОСТ Р 51352–2013, CLSI EP7-A2).

При проведении валидирующих мероприятий важная аналитическая цель, к которой должна стремиться лаборатория, состоит в том, чтобы достигнуть различий и неточности метода для каждого аналита, которые должны быть равны или составлять менее половины средней внутрииндивидуальной биологической вариации.

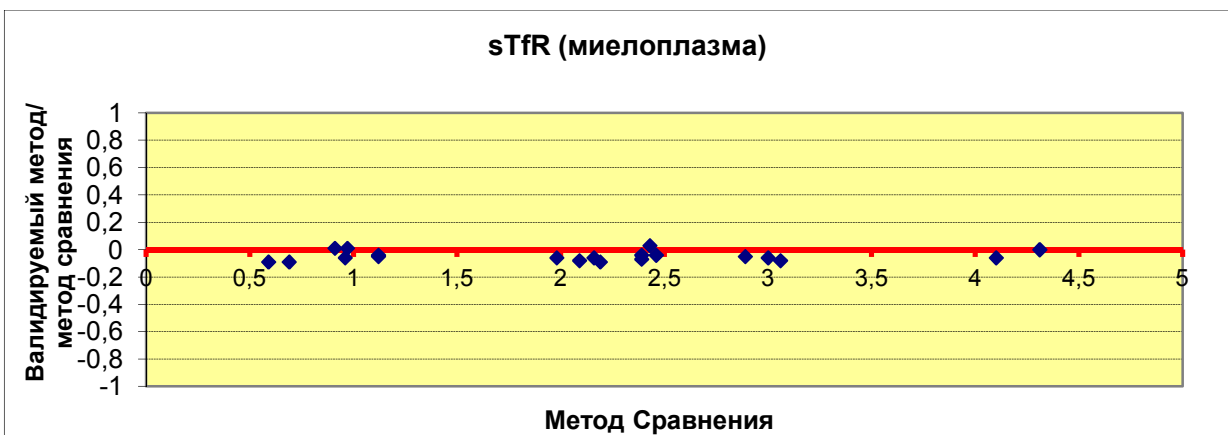
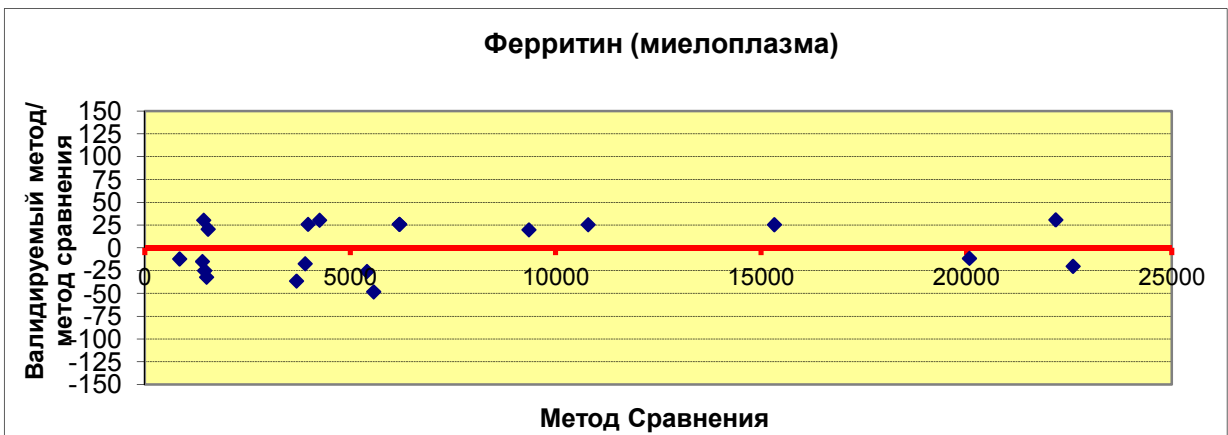
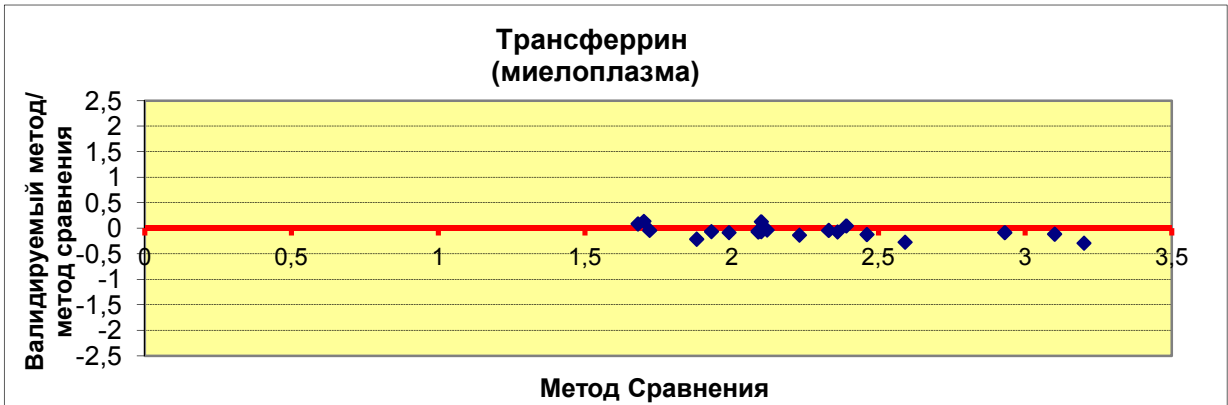
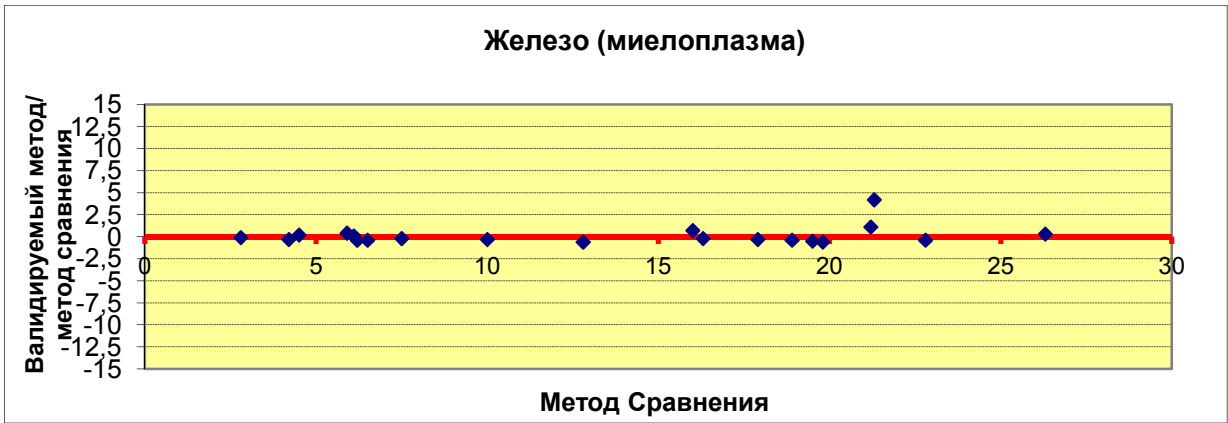
Внутрииндивидуальная биологическая вариация показывает количество аналита, которое колеблется внутри индивидуума с течением времени. Степень таких изменений практически одинакова независимо от продолжительности повторных измерений, инструментов или методов, используемых для измерения,

географического региона или возраста пациента. Из-за их постоянства данные о внутрииндивидуальной биологической вариации аналита могут использоваться любой лабораторией для оценки эффективности метода.

Поскольку есть трудность получения биоматериала, для определения биологической вариации мы воспользовались литературными данными исследования. CV_i для железа в интерстициальной жидкости костного мозга составил 26,5% (Wang W. et al., 2009), ферритина – 14,9% (Iversen P.O., Wiig H., 2005), трансферрина – 3,0% (Lin F.Y. et al., 2015), sTfR – 14% (Iversen P.O., Wiig H., 2005), АлАТ – 4,1% (Krashin E. et al., 2017).

2.3.1. Эксперимент на определение правильности аналитических методов исследования миелоплазмы. Расчет общей аналитической ошибки

Оценка правильности проводилась с использованием протокола CLSI EP15-A2 для трансферрина, ферритина и sTfR и по протоколу CLSI EP15-A3 для железа и АлАТ. Валидируемым методом было проведено определение в 20 пробах уровней аналитов. Одновременно, используя методы сравнения, в тех же пробах определяли концентрацию валидируемых параметров: железо определялось фотометрическим методом с использованием хромогена Nitro-PAPS (производитель «Ольвекс-диагностикум», Россия), ферритин – с помощью иммуноферментной тест-системы «Ферритин-ИФА-БЕСТ» (производитель АО «Вектор-Бест», Россия), трансферрин – с помощью иммуноферментной тест-системы «Transferrin Human ELISA Kit» (производитель Thermo Fisher Scientific, США), sTfR – с помощью набора ИФА «Human sTfR ELISA» (производитель Bio Vendor, США), аланинаминотрансфераза – фотометрическим методом на основе фенилгидразинового метода Райтмана-Френкеля (производитель «Ольвекс-диагностикум», Россия). По каждой пробе учитывалась разница между полученными результатами, которая отражена графически (рисунок 21).



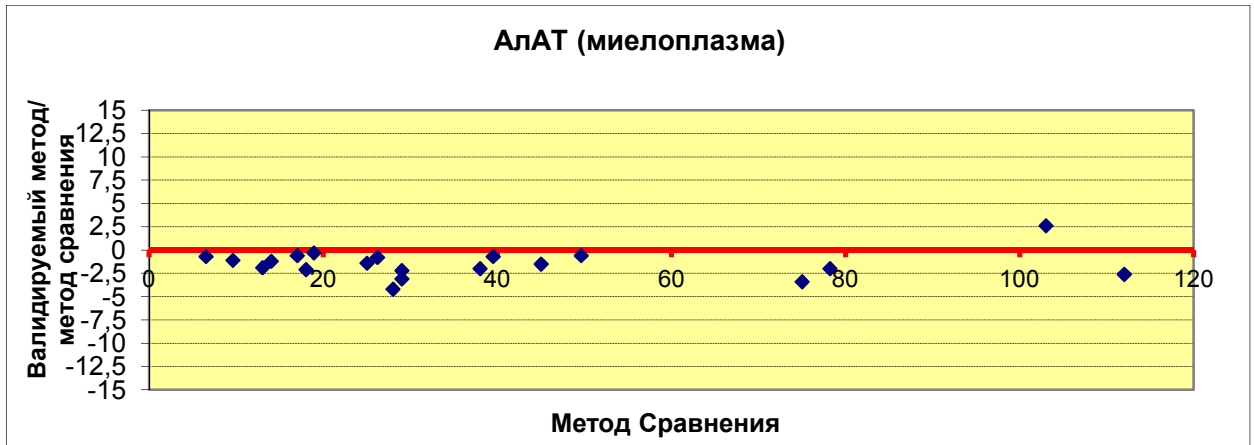


Рисунок 21 – Различия валидируемых аналитов в миелоплазме

Далее были рассчитаны разница между средними значениями каждого метода (аналитическое смещение), стандартное отклонение различий и доверительные границы (таблица 1).

Как видно из таблицы 1, показатель аналитического смещения находится в пределах допустимых значений доверительных границ. Таким образом, методики удовлетворяют критериям правильности.

Таблица 1.

Валидация правильности биохимических методик в миелоплазме

Аналит	Аналитическое смещение (B)	Стандартное отклонение различий (SD)	t- Критическое	Доверительные границы	
				Верхняя	Нижняя
Железо	0,115	1,06	2,861	0,79	-0,56
Ферритин	0,995	27,22	2,861	18,41	-16,42
Трансферрин	-0,068	0,11	2,861	0,01	-0,14
sTfR	-0,0485	0,04	2,861	-0,03	-0,07
АлАТ	-1,49	1,42	2,861	-0,58	-2,4

Далее производился расчет общей аналитической ошибки (total analytical error, TEa) по ГОСТу Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические, контроль качества клинических лабораторных исследований». Согласно ГОСТу, расчет произведен по формуле:

$$TEa = V\% + 1,96 * CVi$$

где $V\%$ – показатель аналитического смещения;

CVi – коэффициент внутрииндивидуальной вариации (в %);

1,96 – двусторонний квантиль стандартного нормального распределения для уровня значимости 0,05.

Итак, TEa составила: для железа – 51,07%, ферритина – 30,2%, трансферрина – 5,95%, sTfR – 27,5%, аланинаминотрансферазы – 9,53%.

2.3.2. Эксперимент на определение линейности и рабочего диапазона

В лабораторной практике линейность метода понимается как способность обеспечить результаты, которые прямо пропорциональны концентрации (количеству) аналита в тестируемой системе. Протокол эксперимента CLSI EP6-A описывает статистический метод оценки и верификации линейности, он основан на параметрической полиномиальной регрессии.

Согласно протоколу, изготовили два пула образцов: первый (L) – с низкой концентрацией исследуемого вещества, приближенной к нижнему пределу детекции метода; второй (H) – с приближением концентрации исследуемого вещества к верхнему пределу диапазона линейности метода. Далее готовили еще 3 пула образцов, полученных путем смешивания первого образца со вторым, с последовательным увеличением доли второго образца. В итоге в полученных 5 пулах определяли концентрацию аналита дважды.

При внесении экспериментальных данных в протокол в соответствующие ячейки рабочего инструмента в дальнейшем были рассчитаны статистические показатели полиномиальной регрессии с использованием коэффициентов первого, второго и третьего порядков и стандартной ошибки регрессии (S_{yx}). При получении значений коэффициентов нелинейности полинома второго и третьего порядков близким нулю, считается, что нелинейность в экспериментальных данных отсутствует. На рисунке 22 показан пример расчета данных показателей для аланинаминотрансферазы.

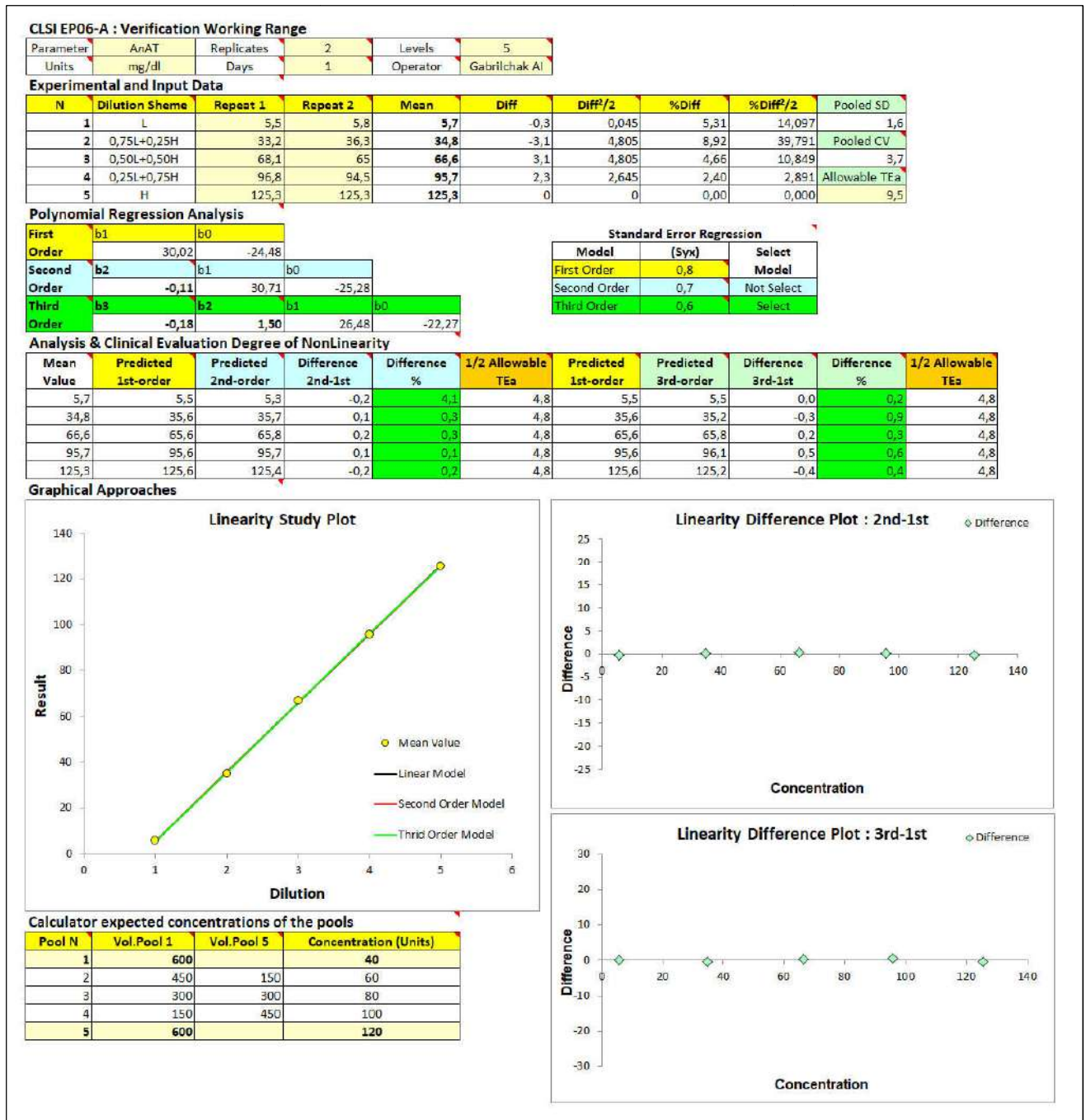


Рисунок 22 – Определение линейности АлАТ в миелоплазме

Мы определили следующие рабочие диапазоны методик для миелоплазмы: для железа – 3,0-25,6 мкмоль/л, ферритина – 91,0-450 мкг/л, трансферрина – 1,55-2,99 г/л, sTfR – 0,5-4,53 мг/л, аланинаминотрансферазы – 5,5-125,3 Е/л. Так как количество ферритина в миелоплазме значительно превышает предел линейности методики, было проведено предварительное разведение биоматериала 1:50 – 1:100.

В дальнейшем для определения клинической нелинейности диапазона измерения производили сравнение величины различий между полиномом первого порядка и «лучшим» нелинейным полиномом, с половиной величины допустимой общей ошибки определения аналита (TE_a). Поскольку различия для результатов составили меньше $\frac{1}{2} TE_a$, то диапазон измерения в сравниваемой точке оценивается как клинически линейный.

Таким образом, исследуемые методики для миелоплазмы показали приемлемые результаты линейности.

2.3.3. Эксперимент на определение аналитической специфичности методик в миелоплазме

Аналитическая специфичность характеризуется как способность метода определять только искомый компонент в присутствии других компонентов, которые находятся в образце, и оценивается по степени влияния различных примесей или матрицы биоматериала на результат анализа. Определяли с помощью ГОСТа Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики инвитро. Методы испытаний» и протокола CLSI EP7-A2.

Изготавливали два образца пулов с верифицируемым аналитом: в первом смешивали миелоплазму и раствор аналита с известной концентрацией, во втором – миелоплазму и дилуент. Далее определяли в серии исследований концентрацию аналитов, рассчитывали величину открытия и пропорциональную ошибку (таблица 2), сравнивали величину пропорциональной ошибки с TE_a .

Таким образом, полученные нами пропорциональные ошибки были меньше общей аналитической ошибки метода, процент открытия составлял 90-100, что соответствует стандартам ГОСТа.

Результаты эксперимента на открытие

Показатель	% открытия	Пропорциональная ошибка	TEa
Железо	93,2%	6,8%	51,07
Ферритин	94,1%	5,9%	30,3
Трансферрин	96,2%	3,8%	5,95
sTfR	91,2%	8,8%	27,5
АлАТ	90,8%	9,2%	9,53

2.3.4. Эксперимент на определение прецизионности биохимических методик в миелоплазме

Определение прецизионности проводилось согласно протоколу CLSI EP15-A3. Для этого было подготовлено по 5 аликвот миелоплазмы двух уровней, и в течение 5 дней выполняли 5 измерений каждого уровня.

Был рассчитан коэффициент вариации (CV), который для железа составил 8,49%, для ферритина – 3,6%, для трансферрина – 1,42%, для sTfR – 4,09%, для АлАТ – 1,9%. Далее проводили сигмаметрическую оценку по формуле:

$$\text{Sigma} = \frac{\text{TEa}\% - \text{B}\%}{\text{CV}\%}$$

где <2 Sigma – неприемлемый уровень;

2-3 Sigma – плохой уровень;

3-4 Sigma – пограничный уровень;

4-5 Sigma – хороший уровень;

5-6 Sigma – превосходный уровень;

>6 Sigma – мировой класс.

Таким образом, для ферритина и sTfR установлен мировой уровень приемлемости, для железа – превосходный уровень, а для трансферрина и АлАТ – хороший уровень приемлемости.

ГЛАВА 3

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ РОСТКОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ И РАЗЛИЧНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРОЙ

Для определения предикторов хронической формы идиопатической тромбоцитопенической пурпуры необходимо сначала выявить характерные изменения показателей костного мозга и периферической крови. Для этого всем пациентам было проведено комплексное обследование с исследованием миелограммы, мегакариоцитогаммы костного мозга, определение лабораторных показателей общего анализа крови, биохимические и гемостазиологические параметры периферической крови и миелоплазмы.

3.1. Результаты исследования миелограмм у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Пациенты взрослого населения с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой сопоставимы по полу и возрасту с группой сравнения, данные их миелограмм приведены в таблице 3. Анализируя данные, можно увидеть, что в целом морфологическая характеристика большинства ростков костномозгового кроветворения у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой и у группы сравнения отличается мало. Клеточность пунктатов сохраняется на достаточном уровне, гранулоцитарный росток сохранен, созревание нейтрофилов не изменено, отмечается небольшая тенденция к увеличению созревающих форм нейтрофилов, что также прослеживается у эозинофильных форм и нашло отражение в более высоком значении индекса созревания нейтрофилов, моноцитарный росток имеет направленность к расширению. Однако эти изменения находятся в пределах референсных величин (Соколов В.В., Грибова И.А., 1972), определенных для данной возрастной группы, и вероятность достоверности различий этих показателей слишком мала.

В то же время значимыми оказались изменения уровня лимфоцитов и оксифильных эритробластов. Так, у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой количество лимфоцитов выше ($p < 0,05$), что, вероятно, связано с самим механизмом развития этого заболевания. При ИТП часто происходит выработка аутоантител к разным рецепторам мембраны тромбоцитов и мегакариоцитов. Формирование иммунной реакции на собственные тромбоциты – процесс многоступенчатый, в котором принимают участие многие субпопуляции лимфоцитов. В результате развивается дисбаланс между ними, что, видимо, нашло отражение в увеличении количества лимфоцитов в костном мозге у пациентов с ИТП (Panitsas F.P., Mouzaki A., 2004; Wang T. et al., 2005; Hu Y. et al., 2012).

Таблица 3.

Показатели миелограмм у пациентов с ИТП

Показатель	ИТП (n=146) Me [25% - 75%]	Группа сравнения (n=22) Me [25%, 75%]	Отличие, <i>p</i>
Бласты, %	0,80 [0,40-1,60]	1,20 [0,40-1,60]	0,618
Промиелоциты, %	2,40 [1,60-3,60]	2,00 [1,60-2,40]	0,195
Миелоциты нейтрофильные, %	15,00 [10,75-21,6]	14,20 [10,80-18,00]	0,406
Метамиелоциты нейтрофильные, %	8,90 [6,75-11,65]	8,20 [4,40-10,80]	0,425
Палочкоядерные нейтрофилы, %	7,70 [5,95-9,70]	8,80 [5,20-11,60]	0,208
Сегментоядерные нейтрофилы, %	19,20 [16,2-25,25]	20,00 [14,40-23,20]	0,627
Миелоциты эозинофильные, %	1,20 [0,60-1,80]	0,80 [0,20-1,20]	0,069
Метамиелоциты эозинофильные, %	0,40 [0,20-0,60]	0,40 [0,20-1,00]	0,495
Эозинофилы зрелые, %	1,40 [0,80-2,00]	1,40 [1,00-2,00]	0,707
Базофилы, %	0,20 [0,00-0,40]	0,00 [0,00-0,40]	0,855
Лимфоциты, %	12,80 [9,20-16,90]	10,40 [6,00-13,60]	0,037
Моноциты, %	2,40 [1,60-3,60]	2,00 [1,40-2,80]	0,349
Плазмоциты, %	1,10 [0,40-1,60]	1,00 [0,40-1,80]	0,616
Проэритробласты, %	0,20 [0,00-0,40]	0,40 [0,00-0,40]	0,557
Эритробласты базофильные, %	3,40 [1,60-5,70]	4,00 [1,60-6,80]	0,729
Эритробласты полихроматофильные, %	9,50 [6,45-13,70]	11,40 [6,80-20,40]	0,271
Эритробласты оксифильные, %	3,60 [1,75-6,90]	5,60 [3,60-9,20]	0,028
Эритробластические элементы (сумм), %	18,50 [13,15-25,2]	20,20 [16,60-40,80]	0,085
Лейко-эритробластическое соотношение	4,31 [2,97-6,58]	3,9 [1,61-4,97]	0,115
Индекс созревания нейтрофилов	1,00 [0,78-1,29]	0,89 [0,66-1,30]	0,472
Индекс созревания эритрокариоцитов	0,81 [0,71-0,86]	0,82 [0,71-0,91]	0,680

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

Другие изменения касались эритроидного ростка кроветворения. Обращает на себя внимание более высокий уровень суммарного количества эритробластов в группе сравнения и, соответственно, более низкое лейко-эритробластическое соотношение. Достоверно увеличено количество оксифильных эритробластов ($p < 0,05$) в группе сравнения, при этом индекс созревания эритрокариоцитов практически не отличим в двух сравниваемых группах. Таким образом, в миелограммах группы сравнения выявляется расширение эритроидного ростка без задержки созревания и гемоглобинообразования, что указывает на гиперрегенераторный костный мозг. Все описанные изменения эритроидного ростка касаются группы сравнения, которую составили пациенты с железодефицитной анемией, соответственно, в исследуемой группе с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой показатели эритроидного ростка находятся в пределах референсных величин.

3.2. Изменения мегакариоцитарного ростка у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Классическое рутинное исследование миелограммы подробно описывает все ростки костномозгового кроветворения, давая им качественную и количественную характеристику. Описание мегакариоцитарного ростка ограничивается подсчетом общего количества мегакариоцитов и обзорным исследованием этого ростка на малом увеличении с описанием патологических и дегенеративных форм мегакариоцитов, однако возникают клинические ситуации, когда этих данных недостаточно. В целях продолжения более подробного исследования мегакариоцитарного ростка описание миелограммы было дополнено исследованием мегакариоцитограммы, или мегакариоцитарной формулы, результаты которого приведены в таблице 4. Анализ результатов комплексного исследования показателей мегакариоцитограммы позволил выявить статистически значимые отличия ($p < 0,05$) в отношении повышения абсолютного количества мегакариоцитов у больных с идиопатической тромбоцитопенической

пурпурой. Такие же данные были получены и у ряда других исследователей (de Alarcon P.A. et al., 1987). Их исследования касались определения количества колониобразующих единиц мегакариоцитов, количество которых было повышено.

Таблица 4.

Показатели мегакариоцитограмм у пациентов с идиопатической
тромбоцитопенической пурпурой

Показатель	ИТП (n=146) Ме [25%, 75%]	Группа сравнения (n=22) Ме [25%, 75%]	Отличие, <i>p</i>
Всего мегакариоцитов на 250 полей зрения	37,00 [17,00-61,00]	21,00 [10,0-33,0]	0,013
Незрелые мегакариоциты, %	2,00 [0,00-4,00]	1,00 [0,00-1,00]	0,066
Мегакариоциты базофильные, %	9,00 [5,00-18,50]	6,00 [2,00-8,00]	0,004
Мегакариоциты полихроматофильные, %	40,00 [32,50-48,00]	53,00 [42,0-61,0]	<0,001
Мегакариоциты оксифильные, %	15,00 [9,00-23,50]	28,00 [22,0-45,0]	<0,001
Инволютивные формы, %	2,00 [1,00-4,00]	1,00 [0,00-3,00]	0,027
Голоядерные, %	21,00 [11,50-28,50]	8,00 [6,00-11,00]	<0,001
Дегенеративные, %	1,00 [0,00-3,00]	1,00 [0,00-1,00]	0,255
Эмпериполез, %	3,00 [2,00-6,00]	2,00 [0,00-3,00]	0,003
Микромегакариоциты, %	4,00 [1,00-8,00]	0,00 [0,00-0,00]	<0,001
Мегакариоциты с множеством ядер, %	0,00 [0,00-0,00]	0,00 [0,00-0,00]	0,261
Гипогранулярные мегакариоциты, %	28,5 [20,00-37,00]	8,0 [7,00-13,75]	<0,0001
Пластинкообразующие формы, %	8,00 [3,00-17,00]	41,00 [32,0-63,0]	<0,001
Пластинкосодержущие формы, %	30,00 [22,00-38,00]	34,00 [21,0-44,0]	0,203
Индекс созревания мегакариоцитов	0,22 [0,10-0,43]	0,09 [0,02-0,14]	<0,001

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

В то же время нами было обнаружено, что изменены и качественные показатели мегакариоцитограммы: так, у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой отмечается увеличение количества базофильных мегакариоцитов ($p<0,01$); противоположную направленность имели показатели уровня полихроматофильных и оксифильных форм ($p<0,001$), что нашло отражение в индексе созревания мегакариоцитов, который достоверно выше у пациентов с ИТП ($p<0,001$). В целом эти показатели свидетельствуют о

задержке созревания мегакариоцитов в костном мозге при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре.

Обращает на себя внимание достоверное увеличение голаядерных ($p < 0,001$) и инволютивных форм мегакариоцитов ($p < 0,05$). Инволютивные формы образуются как следствие вызревания мегакариоцитов, в дальнейшем происходит постепенная эксклюзия цитоплазмы и ядра в процессе образования тромбоцитов. Голаядерные формы формируются двумя путями. Первый – из инволютивных форм в результате полной эксклюзии цитоплазмы клетки. Второй – в результате быстрого расхода цитоплазмы на образование тромбоцитов. Морфологически эти формы отличаются друг от друга тем, что во втором случае ядра мегакариоцитов имеют небольшие остатки цитоплазмы. При внимательном изучении голаядерных форм нами не было выявлено преобладания какой-либо из них, в равной степени встречались ядра мегакариоцитов как с остатками цитоплазмы, так и с полным ее отсутствием. Увеличение голаядерных форм мегакариоцитов указывает на напряженность процесса тромбоцитобразования при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре.

Нами было обнаружено, что при ИТП чаще встречаются мегакариоциты с явлением эмпериполеза ($p < 0,01$). Природа и значение эмпериполеза остаются до конца не изученными. Недавние данные демонстрируют, что эмпериполез представляет собой отдельную форму межклеточного взаимодействия. Нейтрофилы попадают в вакуоль, называемую эмперисомой, которая затем высвобождает их непосредственно в цитоплазму мегакариоцитов, далее они сливаются с системой демаркационных мембран, чтобы передать мембрану циркулирующим тромбоцитам, повышая эффективность тромбоцитогенеза (Cunin P. et al., 2019; Cunin P., Nigrovic P.A., 2020).

У пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой появляются признаки дисмегакариоцитопоза, что проявляется в увеличении количества микромегакариоцитов ($p < 0,001$), в группе сравнения эти формы мегакариоцитов полностью отсутствуют. В литературе встречаются данные о взаимосвязи увеличения патологических форм мегакариоцитов и плохим ответом

на терапию стероидами (Tripathi A.K. et al., 2014). На дисмегакариоцитопоз указывает нам увеличение гипогранулярных мегакариоцитов у пациентов с ИТП. Этот признак показал очень высокий уровень значимости ($p < 0,0001$): так, в группе сравнения межквартильный разброс количества гипогранулярных мегакариоцитов варьировал от 7 до 14%, тогда как в опытной группе – от 20 до 37%.

Уровни пластинкосодержащих мегакариоцитов не показали достоверных различий в двух сравниваемых группах, в то же время большие различия были выявлены по количеству пластинкообразующих форм, показатели которых значительно ниже у пациентов с ИТП ($p < 0,001$), что может свидетельствовать о снижении активности тромбоцитобразования.

В дальнейшем нами был проведен детальный анализ видов пластинкообразующих форм мегакариоцитов (таблица 5). Исследование показало, что отмечается увеличение базофильных форм ($p < 0,05$) и снижение оксифильных форм ($p < 0,001$) среди пластинкообразующих мегакариоцитов у пациентов с ИТП, что свидетельствует о более раннем начале процесса тромбоцитобразования.

Таблица 5.

Распределение пластинкообразующих форм мегакариоцитов у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Показатель	ИТП (n=146) Me [25%, 75%]	Группа сравнения (n=22) Me [25%, 75%]	Отличие, <i>p</i>
Мегакарициты базофильные пластинкообразующие, %	15,47 [0,00-33,30]	4,87 [0,67-7,10]	0,025
Мегакарициты полихроматофильные пластинкообразующие, %	60,00 [40,00-79,30]	64,86 [44,00-73,30]	0,962
Мегакарициты оксифильные пластинкообразующие, %	12,50 [0,00-33,00]	28,13 [22,16-50,91]	<0,001

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

Несмотря на то, что не было выявлено достоверных различий в количестве пластинкосодержащих форм мегакариоцитов, при более детальном анализе этих форм (таблица 6) были получены аналогичные данные, как и для пластинкообразующих форм. Уровень базофильных форм пластинкосодержащих мегакариоцитов ($p < 0,001$) у пациентов с ИТП достоверно выше при сопоставлении с группой сравнения, противоположную направленность имели показатели количества оксифильных форм ($p < 0,05$).

Таблица 6.

Распределение пластинкосодержащих форм мегакариоцитов у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Показатель	ИТП (n=146) Me [25%, 75%]	Группа сравнения (n=22) Me [25%, 75%]	Отличие, p
Мегакарициты базофильные пластинкосодержащие, %	9,62 [2,60-22,80]	0,00 [0,00-4,40]	<0,001
Мегакарициты полихроматофильные пластинкообразующие, %	53,30 [35,70-66,70]	48,70 [40,90-67,60]	0,951
Мегакарициты оксифильные пластинкообразующие, %	31,00 [17,20-50,00]	50,00 [29,10-59,10]	0,032

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

Анализируя показатели мегакариоцитограммы в целом, можно заметить, что иногда в одной сравниваемой группе среди пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой разброс одного показателя может быть значительным, поэтому, чтобы избежать обобщения статистических данных, мы выделили изменения мегакариоцитограмм в 2 типа. 1 тип мегакариоцитограммы отличается преобладанием незрелых форм мегакариоцитов (мегакариобластов, промегакариоцитов, базофильных мегакариоцитов), 2 тип характеризуется увеличением «голаядерных» и полихроматофильных форм с малым количеством или полным отсутствием пластинкообразующих мегакариоцитов. В то же время мегакариоцитограммы без значительных изменений составили приблизительно

пятую часть всех обследуемых пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой (таблица 7).

Таблица 7.

Распределение типов мегакариоцитогамм у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Тип мегакариоцитогаммы	Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура	Группа сравнения
1 тип	25,7%	0%
2 тип	54,1%	0%
Без изменений	20,2%	100%

3.3. Результаты исследования общего анализа крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой. Взаимосвязи с мегакариоцитогаммой

Результаты, полученные в нашем исследовании в отношении показателей периферической крови для пациентов с ИТП и в группе сравнения, приведены в таблице 8. Наибольшие изменения у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой выявлены в тромбоцитарных показателях: медиана количества тромбоцитов в исследуемой группе составила $24,5 \times 10^9/\text{л}$, значительно снижен уровень тромбокрита ($p < 0,001$), в то же время увеличен средний объем тромбоцитов и показатель анизоцитоза тромбоцитов ($p < 0,001$).

В группе сравнения, как мы видим, наибольшие изменения произошли в эритроцитарных показателях: уровни гемоглобина, количество эритроцитов, а также гематокрит снижены ($p < 0,001$). Эритроциты изменены и качественно: снижено среднее содержание гемоглобина в эритроците, уменьшен объем эритроцитов, видны признаки анизоцитоза (увеличено распределение эритроцитов RDW-CV и RDW-SD). Отмечается увеличение уровня ретикулоцитов в периферической крови в группе сравнения ($p < 0,01$). Для оценки взаимосвязи между показателями тромбоцитов и мегакариопоэзом использовалась ранговая корреляция Спирмена (таблица 9).

Лабораторные показатели общего анализа крови у пациентов с идиопатической
тромбоцитопенической пурпурой

Показатель	ИТП (n=146) Me [25%, 75%]	Группа сравнения (n=22) Me [25%, 75%]	Отличие, <i>p</i>
Лейкоциты (WBC), $\times 10^9$ /л	7,50 [5,52-10,28]	6,70 [4,70-9,10]	0,262
Эритроциты (RBC), $\times 10^{12}$ /л	4,79 [4,22-5,25]	3,82 [3,12-4,19]	<0,001
Гематокрит (HCT), %	41,30 [37,08-44,73]	26,40 [24,40-28,70]	<0,001
Гемоглобин (HGB), г/л	128,8 [120,0-146,0]	76,00 [61,90-87,00]	<0,001
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	27,90 [26,40-29,40]	22,50 [17,30-24,40]	<0,001
Средний объем эритроцитов (MCV), фл	88,00 [84,20-91,35]	73,40 [63,70-81,80]	<0,001
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), г/дл	29,95 [27,75-33,38]	27,50 [26,90-31,80]	0,143
Распределение эритроцитов по объему, коэффициент вариации (RDW-CV), %	14,30 [13,10-16,35]	18,05 [15,28-21,83]	<0,001
Распределение эритроцитов по объему, стандартное отклонение (RDW-SD), фл	43,20 [41,35-47,08]	62,90 [52,80-88,35]	0,002
Ретикулоциты (Ret), ‰	12,10 [8,70–19,00]	54,10 [20,50-221,85]	0,007
Ретикулоциты (Ret#), $\times 10^{12}$ /л	0,06 [0,04–0,08]	0,23 [0,05-0,41]	0,007
Гемоглобин ретикулоцитов (RET-He), пг	30,50 [28,23-32,00]	31,40 [18,33-33,23]	0,738
Тромбоциты (PLT), $\times 10^9$ /л	24,50 [12,00-62,25]	304,00 [198,00-442,00]	<0,001
Тромбокрит (PCT), %	0,07 [0,03-0,11]	0,27 [0,20-0,32]	<0,001
Средний объем тромбоцитов (MPV), фл	11,85 [8,94-13,98]	8,10 [6,78-9,50]	<0,001
Анизоцитоз тромбоцитов (PDW), %	22,30 [20,80-23,70]	18,40 [11,10-19,20]	<0,001

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

Опытная группа показала слабые положительные взаимосвязи между количеством тромбоцитов и MPV ($R=0,233$, $p<0,05$), а также с PDW ($R=0,328$, $p<0,001$). Наблюдались слабые отрицательные корреляции между количеством мегакариоцитов костного мозга и общим числом тромбоцитов в периферической крови ($R=-0,208$, $p<0,05$), тромбокритом ($R=-0,210$, $p<0,05$) и MPV ($R=-0,181$, $p<0,05$). Также определены положительные корреляции между пластинкообразующими формами мегакариоцитов и количеством тромбоцитов

периферической крови ($R=0,333$, $p<0,001$), PCT ($R=0,284$, $p<0,01$), MPV ($R=0,268$, $p<0,01$) и PDW ($R=0,266$, $p<0,01$).

Таблица 9.

Корреляции показателей тромбоцитов и параметров мегакариоцитов при
идиопатической тромбоцитопенической пурпуре

Показатели			PLT	Всего мегакариоцитов	Незрелые мегакариоциты	Мегакариоциты базофильные	Мегакариоциты полихроматофильные	Мегакариоциты оксифильные	Инволютивные мегакариоциты	Голоядерные мегакариоциты	Дегенеративные мегакариоциты	Эмбриоплез	Микро- мегакариоциты	Мегакариоциты с множеством ядер	Пластинкообразующие МКЦ	Пластинкосодержашие МКЦ	
ИТП	PLT	R	-	-0,208	-0,117	-0,050	-0,010	0,140	-0,039	0,065	-0,08	-0,02	-0,107	0,060	0,333	0,029	
		p	-	0,020	0,195	0,550	0,862	0,120	0,660	0,469	0,323	0,765	0,239	0,489	0,0002	0,745	
	PCT	R	0,351	-0,210	0,180	0,047	-0,157	0,042	-0,006	0,167	0,016	0,020	-0,063	0,094	0,284	-0,119	
		p	0,0004	0,036	0,075	0,638	0,121	0,679	0,949	0,098	0,869	0,833	0,531	0,369	0,004	0,239	
	MPV	R	0,233	-0,181	0,184	-0,040	-0,027	0,064	-0,07	0,123	0,021	0,106	-0,015	-0,025	0,268	-0,02	
		p	0,011	0,048	0,045	0,644	0,762	0,484	0,431	0,184	0,819	0,251	0,864	0,784	0,003	0,825	
	PDW	R	0,328	-0,114	0,145	-0,035	-0,031	0,043	-0,259	0,111	0,099	-0,07	-0,066	-0,067	0,266	0,003	
		p	0,0003	0,218	0,117	0,700	0,686	0,641	0,004	0,233	0,284	0,443	0,474	0,465	0,003	0,968	
	Группа сравне- ния	PLT	R	-	0,029	-0,207	0,008	0,202	-0,066	-0,021	-0,333	0,069	0,266	0	0,086	0,393	-0,247
			p	-	0,906	0,395	0,971	0,406	0,785	0,930	0,163	0,776	0,271	0	0,726	0,095	0,308
PCT		R	0,828	0,049	-0,069	0,207	0,274	-0,222	-0,111	-0,232	0,228	0,121	0	-0,051	0,202	0,025	
		p	0,000	0,851	0,790	0,424	0,287	0,391	0,672	0,369	0,379	0,644	0	0,848	0,435	0,921	
MPV		R	0,050	0,107	-0,290	-0,407	-0,352	0,395	0,111	-0,093	0,221	0,261	0	0,151	-0,064	0,162	
		p	0,838	0,663	0,228	0,083	0,139	0,094	0,655	0,703	0,362	0,279	0	0,538	0,794	0,508	
PDW		R	-0,321	0,049	-0,020	0,207	-0,138	-0,008	-0,103	0,278	-0,049	0,266	0	-0,129	0,134	-0,307	
		p	0,180	0,851	0,932	0,424	0,574	0,971	0,674	0,248	0,839	0,271	0	0,598	0,585	0,201	

Примечание. Жирным шрифтом отмечены значения $p<0,05$, указывающие на статистически значимую корреляционную взаимосвязь

При ИТП мегакариоциты продуцируют тромбоциты в ответ на повышенную деструкцию (Strauss G. et al., 2011). «Молодые» тромбоциты имеют увеличенный размер. Соответственно, была обнаружена положительная корреляция между повышением MPV и пластинкообразующими мегакариоцитами при ИТП. На основании этих данных можно сделать вывод, что MPV отражает мегакариопоз и значимо выше при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре при сопоставлении с группой сравнения (8,94-13,98 фл соответствуют 6,78-9,5 фл, $p<0,001$).

Показатель PDW положительно коррелировал с пластинкообразующими мегакариоцитами при ИТП, и показатель анизозитоза тромбоцитов значимо выше (20,80-23,70% соответствует 11,10-19,20%, $p<0,001$), что демонстрирует

диагностическую ценность PDW для идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что в группе ИТП MPV и PDW коррелируют с пластинкообразующими мегакариоцитами, что имеет важное значение для диагностики ИТП.

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что:

1. Большинство ростков костномозгового кроветворения у пациентов с ИТП изменены мало, за исключением лимфоцитарного и мегакариоцитарного. Количество лимфоцитов выше ($p < 0,05$), а в мегакариоцитарном ростке вместе с количественными обнаружены и качественные изменения.

2. Характеристика мегакариоцитарной формулы отличается повышением абсолютного количества мегакариоцитов у больных с ИТП.

Увеличены базофильные мегакариоциты ($p < 0,01$) и снижены уровни полихроматофильных и оксифильных форм ($p < 0,001$), что свидетельствует о задержке созревания мегакариоцитов в костном мозге.

Увеличение голоядерных форм мегакариоцитов указывает на интенсивность процесса тромбоцитообразования. Чаше встречаются мегакариоциты с явлением эмпериполеза, что, вероятно, повышает эффективность тромбоцитогенеза. Усилены признаки дисмегакариоцитопоза, что проявляется в увеличении количества гипогранулярных форм и микромегакариоцитов.

Исследование видов пластинкообразующих форм мегакариоцитов выявило признаки начала процесса тромбоцитообразования со стадии базофильного мегакариоцита.

3. Изменения мегакариоцитарной формулы у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой можно объединить в 2 типа. Первый тип характеризуется преобладанием незрелых и созревающих форм мегакариоцитов, второй – увеличением «голоядерных» и полихроматофильных мегакариоцитов.

Необходимо дальнейшее изучение взаимосвязи типа изменений мегакариоцитарной формулы с характером течения, возрастом и полом пациентов с ИТП.

4. MPV и PDW отражают мегакариопоз, так как положительно коррелируют с пластинкообразующими мегакариоцитами и значимо выше при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре при сопоставлении с группой сравнения.

ГЛАВА 4

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОСТНОГО МОЗГА И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И ПОЛА

Костный мозг является основным источником разнообразных видов клеток крови, и исследования миелограмм часто используются для диагностики различных заболеваний, в том числе для идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, поэтому знание нормальных изменений, которые происходят с детского возраста и со старением костного мозга, имеет важное значение для интерпретации показателей костного мозга. Показано, что пролиферативная активность костного мозга, измеренная по проценту Ki-67-позитивных клеток, самая высокая в среднем возрасте, а после 80 лет наблюдается ее снижение, что приводит и к снижению клеточности костного мозга в этом возрасте (Ogawa T. et al., 2000). Значительно изменяется количество лимфоцитов и соотношение субпопуляций в костном мозге: в первые 4 года жизни подгруппы В-лимфоцитов в основном (80%) проявляют незрелый фенотип CD 19+ CD100+, а с возрастом наблюдается прогрессирующее снижение процента В-клеток и увеличение количества Т-клеток (Rego E.M. et al., 1998). Процент апоптоза в костном мозге относительно низкий в молодом и среднем возрасте, а в пожилом – значительно возрастает (Ogawa T. et al., 2000). Макрофаги костного мозга играют незаменимую роль в регуляции кроветворения: показано, что количество макрофагов в костном мозге высокое в детском и подростковом возрасте, снижается у взрослых и пожилых людей. Уменьшение количества макрофагов оказывает влияние на снижение пролиферации кроветворных клеток и индукцию апоптоза в костном мозге пожилых людей, за счет снижения выработки факторов роста и цитокинов (Kelley et al., 1996). Все эти исследования доказывают, что с возрастом процесс кроветворения претерпевает значимые изменения, и

гематологические заболевания у детей и взрослых будут развиваться по-разному. Контингент обследуемых лиц, участвовавших в нашем исследовании, включает в себя пациентов от 0 до 90 лет, поэтому для выявления предикторов хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры сначала необходимо изучить влияние возрастного фактора на показатели костного мозга и периферической крови.

4.1. Характеристика показателей костного мозга и периферической крови детского и взрослого населения с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Так как группа исследуемых пациентов различна по возрастному признаку, дальнейшее исследование было произведено с разделением пациентов на детскую и взрослую группы (таблица 10). Анализируя данные, можно увидеть, что возрастным фактором даются частые значимые отличия в двух сравниваемых группах. В целом морфологическая характеристика большинства ростков костномозгового кроветворения у взрослых пациентов с первичной ИТП изменена мало. Клеточность пунктатов сохраняется на достаточном уровне, гранулоцитарный росток сохранен, созревание нейтрофилов не изменено, отмечается небольшая тенденция к увеличению созревающих форм нейтрофилов, что также прослеживается в эозинофильном ростке и находит отражение в более высоком значении индекса созревания нейтрофилов, моноцитарный росток имеет направленность к расширению. Однако эти изменения находятся в пределах референсных величин (Соколов В.В., Грибова И.А., 1972), определенных для данной возрастной группы, и вероятность достоверности различий этих показателей слишком мала.

Значимым оказывается изменение уровня лимфоцитов. Так, их количество у взрослых с первичной ИТП составляет $13,35 \pm 0,47$, что выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$), и, вероятно, связано с самим механизмом развития этого заболевания. При ИТП часто происходит выработка аутоантител к разным рецепторам мембраны тромбоцитов и мегакариоцитов. Формирование иммунной

реакции на собственные тромбоциты – процесс многоступенчатый, в котором принимают участие многие субпопуляции лимфоцитов. В результате развивается дисбаланс между ними, что, видимо, нашло отражение в увеличении количества лимфоцитов в костном мозге у пациентов с ИТП (Panitsas F.P., Mouzaki A., 2004; Wang T. et al., 2005; Hu Y. et al., 2012).

Таблица 10.

Показатели миелограмм пациентов с идиопатической
тромбоцитопенической пурпурой у взрослого и детского населения, $M \pm m$

Показатель	Дети ИТП (n=126)	Дети группа сравнения (n=17)	Взрослые ИТП (n=110)	Взрослые группа сравнения (n=20)
Бласты, %	1,01±0,07**	1,88±0,33	1,06±0,07	1,21±0,21
Промиелоциты, %	2,37±0,13	1,81±0,38	2,56±0,15	2,06±0,26
Миелоциты нейтрофильные, %	8,54±0,38*	11,36±1,89	16,16±0,64	14,54±1,28
Метамиелоциты нейтрофильные, %	8,19±0,32**	5,38±0,59	9,69±0,44	8,81±1,03
Палочкоядерные нейтрофилы, %	8,62±0,32***	3,6±0,39	7,91±0,31	9,0±0,95
Сегментоядерные нейтрофилы, %	18,97±0,57***	30,52±2,67	21,15±0,81	19,10±1,67
Сумма нейтрофильных элементов, %	46,70±0,95*	52,68±3,0	57,49±0,99	53,52±2,98
Миелоциты эозинофильные, %	0,88±0,08*	0,44±0,09	1,24±0,08	0,86±0,15
Метамиелоциты эозинофильные, %	0,42±0,04	0,54±0,13	0,44±0,04	0,58±0,13
Эозинофилы зрелые, %	1,90±0,15	2,20±0,42	1,44±0,09	1,49±0,20
Сумма эозинофильных элементов, %	3,21±0,18	3,19±0,59	3,13±0,15	2,94±0,38
Базофилы, %	0,09±0,02	0,02±0,02	0,21±0,03	0,21±0,07
Лимфоциты, %	23,65±0,82**	17,05±3,23	13,35±0,47*	9,93±1,43
Моноциты, %	3,57±0,15	2,95±0,44	2,72±0,18	2,38±0,32
Плазмоциты, %	0,13±0,03	0,03±0,25	1,19±0,08	1,08±0,19
Прозритробласты, %	0,33±0,05	0,12±0,08	0,29±0,04	0,28±0,06
Эритробласты базофильные, %	2,97±0,22*	4,47±0,96	4,59±0,40	5,68±1,34
Эритробласты полихроматофильные, %	15,38±0,55	15,39±2,32	10,92±0,60	13,77±2,04
Эритробласты оксифильные, %	2,73±0,23	1,88±0,35	4,56±0,32**	7,29±1,41
Эритробластические элементы (сумм), %	21,45±0,60	21,88±2,98	20,41±0,97*	27,46±3,69
Лейко-эритробластическое соотношение	4,42±0,31	8,45±3,94	5,34±0,37	3,81±0,55
Индекс созревания нейтрофилов	0,75±0,03	0,69±0,17	1,07±0,05	1,07±0,15
Индекс созревания эритрокариоцитов	0,84±0,01	0,77±0,04	0,77±0,01	0,79±0,03

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Другие изменения касаются эритроидного ростка. Обращает на себя внимание более высокий уровень суммарного количества эритробластов в группе сравнения и, соответственно, более низкое лейко-эритробластическое соотношение. Достоверно увеличено количество оксифильных эритробластов ($p < 0,05$) в группе сравнения, при этом индекс созревания эритрокариоцитов практически не отличим в двух сравниваемых группах. Таким образом, в миелограммах группы сравнения выявляется расширение эритроидного ростка без задержки созревания и гемоглобинообразования. Все описанные изменения эритроидного ростка касаются группы сравнения, которую составили пациенты с железодефицитной анемией, соответственно, в исследуемой группе с ИТП показатели эритроидного ростка находятся в пределах референсных величин.

У детей с первичной ИТП обнаружено увеличение количества лимфоцитов – $23,65 \pm 0,82$ ($p < 0,01$) и выявляются изменения в нейтрофильном ростке. Количество метамиелоцитов ($p < 0,01$) и палочкоядерных нейтрофилов ($p < 0,001$) выше, а уровни миелоцитов ($p < 0,05$) и сегментоядерных нейтрофилов ($p < 0,001$) – ниже. Суммарно количество нейтрофилов ниже ($p < 0,05$), чем в группе сравнения, но созревание нейтрофильного ростка остается без изменений. Безусловно, подобные сдвиги количества популяций нейтрофилов и лимфоцитов объясняются «перекрестом», который происходит к 5-6 годам (Nandakumar S.K. et al., 2016).

Характеристика мегакариоцитарного ростка взрослых и детей с первичной ИТП дана в таблице 11. Медианные уровни абсолютного количества мегакариоцитов увеличены относительно группы сравнения в 1,9 раза у взрослых ($Me\ 37,0$, $p < 0,05$) и в 3,6 раза у детей ($Me\ 71,0$, $p < 0,001$).

Субпопуляции мегакариоцитов у детей и взрослых с первичной ИТП распределились следующим образом: у детей преобладающей субпопуляцией стали базофильные мегакариоциты (медиана составила 41,0% у детей и 9,0% у взрослых соответственно, $p < 0,01$); у взрослых преобладают более зрелые формы мегакариоцитов – полихроматофильные, хотя относительно группы сравнения полихроматофильные и оксифильные формы снижены ($p < 0,001$).

Показатели мегакариоцитогрaмм пациентов с идиопатической
тромбоцитопенической пурпурой у взрослых и детей, Me[25%, 75%]

Показатель		Дети ИТП (n=126)	Дети группа сравнения (n=17)	Взрослые ИТП (n=110)	Взрослые группа сравнения (n=20)
Всего мегакариоцитов на 250 п/зр		71,00*** [45,5–120,0]	20,0 [8,0-29,5]	37,0* [17,0–61,0]	21,0 [10,0–33,0]
Незрелые мегакариоциты, %		1,0 [0,0–2,0]	0,0 [0,0-1,25]	2,0 [0,0–5,0]	1,0 [0,25–2,0]
Мегакариоциты базофильные, %		41,0*** [29,5–50,5]	13,0 [7,75-21,8]	9,0** [5,0–18,5]	6,0 [2,0–8,0]
Мегакариоциты полихроматофильные, %		37,0 [30,0–45,0]	39,0 [32,7-49,0]	40,0*** [32,5–48,0]	53,0 [42,0–61,0]
Мегакариоциты оксифильные, %		12,0*** [7,0–17,5]	32,0 [22,0-35,7]	15,0*** [9,0–23,5]	28,0 [22,0–45,0]
Инволютивные формы, %	Me [25%, 75%]	1,0*** [0,0–2,0]	3,0 [2,0-5,0]	2,0* [1,0–4,0]	1,0 [0,0-3,0]
	Частота встречаемости	56,0%**	94,0%	78,0%*	53,0%
Голоядерные, %		3,0** [1,0–6,0]	7,0 [3,5-10,5]	21,0*** [11,5–28,5]	8,0 [6,0-11,0]
Дегенеративные, %	Me [25%, 75%]	1,0 [0,0–2,0]	0,0 [0,0-1,5]	1,0 [0,0–3,0]	1,0 [0,0-1,0]
	Частота встречаемости	60,0%	70,0%	58,0%	58,0%
Эмпериоплез, %	Me [25%, 75%]	2,0 [1,0–4,0]	1,0 [0,0-3,5]	3,0** [2,0–6,0]	2,0 [0,0-3,0]
	Частота встречаемости	87,0%**	59,0%	90,0%*	68,0%
Микро-мегакариоциты, %	Me [25%, 75%]	2,0*** [1,0–5,0]	0,0 [0,0-1,0]	4,00*** [1,00–8,00]	0,0 [0,0-0,0]
	Частота встречаемости	78,0%***	54,0%	83,0%***	5,0%
Гипогранулярные мегакариоциты, %		62,0*** [53,75-70,0]	6,0 [4,0-9,5]	27,0*** [19,0-37,0]	8,0 [7,0-13,75]
Мегакариоциты с множеством ядер, %	Me [5%, 95%]	0,0** [0,0-1,0]	0,0 [0,0-5,9]	0,0 [0,0-4,0]	0,0 [0,0-1,1]
	Частота встречаемости	6,0%**	41,0%	15,0%	5,0%
Пластинкообразующие формы, %		4,0*** [2,0–8,0]	28,0 [21,2-37,2]	8,0*** [3,0–17,0]	41,0 [32,0-63,0]
Пластинкосодержающие формы, %		23,0*** [16,0–30,0]	42,0 [21,5-61,2]	30,0 [22,0–38,0]	34,0 [21,0-44,0]
Индекс созревания мегакариоцитов		0,88*** [0,5–1,2]	0,22 [0,09-0,26]	0,22*** [0,10–0,43]	0,09 [0,02-0,14]

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **достоверность различий по частоте встречаемости признака рассчитана с помощью χ^2 – критерия Пирсона с поправкой Йейтса

Таким образом, задержка созревания мегакариоцитов при первичной ИТП наблюдается в группах детей и взрослых, но у детей задержка созревания имеет более выраженный характер, что отражено и в индексе созревания мегакариоцитов (ИСМ). ИСМ имеет более высокое значение у детей (0,88), чем у взрослых (0,22) ($p < 0,001$).

По-разному распределилось и наличие измененных форм мегакариоцитов при первичной ИТП. Так, у взрослых чаще появляются инволютивные формы мегакариоцитов: частота встречаемости составила 78% у взрослых и, соответственно, 56% у детей. При этом по общему их содержанию (от всех 100% мегакариоцитов) различия небольшие: медиана количества инволютивных форм у детей – 1,0%, что ниже относительно группы сравнения ($p < 0,001$), а у взрослых – 2,0%, что выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$). Инволютивные формы образуются как следствие вызревания мегакариоцитов, в дальнейшем происходит постепенная эксклюзия цитоплазмы и ядра в процессе образования тромбоцитов. Чаще у взрослых встречаются голаядерные формы мегакариоцитов: медианное значение увеличено в 2,6 раза ($Me\ 21,0$, $p < 0,001$), а у детей снижено в 2,3 раза ($Me\ 3,0$, $p < 0,01$). Голаядерные формы формируются двумя путями. Первый путь связан с тем, что из инволютивных форм в результате полной эксклюзии цитоплазмы клетки происходит «оголение» ядра мегакариоцита. Вторым путем формирования «голаядерных» форм ассоциирован с быстрым расходом цитоплазмы на образование тромбоцитов. Морфологически эти формы отличаются друг от друга тем, что во втором случае ядра мегакариоцитов имеют небольшие остатки цитоплазмы. При внимательном изучении голаядерных форм мы не выявили преобладания какой-либо из них, в равной степени встречались ядра мегакариоцитов как с остатками цитоплазмы, так и с полным ее отсутствием. Таким образом, у большинства взрослых пациентов с первичной ИТП процесс тромбоцитобразования сохранен, тогда как у большинства детей, по всей видимости, угнетен.

Соотношения типов мегакариоцитограмм в зависимости от возраста распределились следующим образом (таблица 12).

Таблица 12.

Распределение типов мегакариоцитограмм у пациентов с ИТП взрослого и детского населения

Тип мегакариоцитограммы	Дети (n=126)	Взрослые (n=146)	Отличие, <i>p</i>
1 тип	111 (88,0%)	44 (30,3%)	<0,0001
2 тип	3 (2,4%)	71 (48,6%)	
Без изменений	12 (9,6%)	31 (21,1%)	

Мы видим, что у детей основным становится первый тип (в 88% случаев) с преобладанием незрелых форм мегакариоцитов, тогда как у взрослых в 48,6% случаев распространен 2 тип – с увеличением «голаядерных» и полихроматофильных форм мегакариоцитов ($p<0,0001$). Также среди взрослого контингента чаще встречаются мегакариоцитограммы без отклонений (в 21,1% случаев).

Проанализировав и выявив изменения в центральном звене кроветворения, мы продолжили исследование установленных тенденций в периферическом отделе. Данные показателей общего анализа крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой у детского и взрослого населения отражены в таблице 13. Наибольшим изменениям подверглись параметры эритроцитарного и тромбоцитарного ростков. У детей с ИТП уровень эритроцитов ($p<0,01$) и гемоглобина достоверно ниже, чем у взрослого населения ($p<0,001$). Качественные характеристики тоже имеют свои особенности: по объему эритроциты более маленькие ($p<0,001$), медиана среднего объема эритроцитов у детей составила 80,0 фл, тогда как у взрослых – 88,25 фл. Совокупность описанных показателей нашла отражение в более низком значении гематокрита у детей. Так, у детей медиана гематокрита расположилась в области 37,1%, у взрослых – 42,10% ($p<0,001$). Поскольку показатель среднего содержания

гемоглобина в эритроците зависит от клеточного объема и взаимосвязан с MCV, значения параметра MCH у детей имеют более низкое содержание, чем у взрослых ($p<0,001$). В то же время концентрация гемоглобина в эритроците не имеет взаимосвязи с объемом клетки, и мы видим, что MCHC у детей достоверно более высокий, чем у взрослых ($p<0,001$). Кроме того, установлено, что у взрослого населения с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой эритроциты имеют бóльшую гетерогенность по размеру, чем у детей, и оба показателя анизоцитоза по коэффициенту вариации и стандартному отклонению имеют более высокое значение ($p<0,001$).

Таблица 13.

Лабораторные показатели общего анализа крови у
пациентов с ИТП у детского и взрослого населения, Ме [25%, 75%]

Показатель	Дети (n=126)	Взрослые (n=146)	Отличие, <i>p</i>
Лейкоциты (WBC), $\times 10^9$ /л	8,10 [6,90–9,50]	7,50 [5,52–10,28]	0,190
Эритроциты (RBC), $\times 10^{12}$ /л	4,49 [4,10–4,86]	4,79 [4,22–5,25]	0,006
Гематокрит (HCT), %	37,10 [34,40–38,35]	42,10 [38,92–45,77]	<0,001
Гемоглобин (HGB), г/л	121,5 [117,0–132,5]	135,67 [125,0–147,0]	<0,001
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	26,50 [25,40–27,73]	27,90 [26,40–29,40]	<0,001
Средний объем эритроцитов (MCV), фл	80,00 [77,15–83,45]	88,25 [85,20–91,35]	<0,001
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), г/дл	32,90 [32,40–33,70]	29,95 [27,75–33,38]	<0,001
Распределение эритроцитов по объему, коэффициент вариации (RDW-CV), %	13,40 [12,90–14,10]	14,30 [13,10–16,35]	<0,001
Распределение эритроцитов по объему, стандартное отклонение (RDW-SD), фл	41,10 [39,00–42,30]	43,20 [41,35–47,08]	<0,001
Ретикулоциты (Ret), ‰	12,00 [5,25–12,25]	12,10 [8,70–19,00]	0,167
Ретикулоциты (Ret#), $\times 10^{12}$ /л	0,03 [0,03–0,03]	0,06 [0,04–0,08]	0,075
Гемоглобин ретикулоцитов (RET-He), пг	28,70 [27,80–28,70]	30,50 [28,23–32,00]	0,159
Тромбоциты (PLT), $\times 10^9$ /л	16,50 [10,00–33,25]	24,50 [12,00–62,25]	0,010
Тромбокрит (PCT), %	0,03 [0,01–0,05]	0,07 [0,03–0,11]	<0,001
Средний объем тромбоцитов (MPV), фл	10,20 [8,95–11,30]	11,85 [8,94–13,98]	<0,001
Анизоцитоз тромбоцитов (PDW), %	15,60 [15,00–16,30]	22,30 [20,80–23,70]	<0,001

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

Степень тромбоцитопении у детей и взрослых при ИТП разная. Мы видим более низкие значения количества тромбоцитов ($p=0,01$) и тромбокриты ($p<0,001$)

у детей. Индексы тромбоцитов включают средний объем тромбоцитов (MPV), ширину распределения тромбоцитов (PDW). Предлагаемое нормальное значение MPV составляет от 7,2 до 11,7 фл, в периферической крови присутствуют тромбоциты, находящиеся на разных стадиях жизненного цикла. Молодые и зрелые тромбоциты отличаются размерами, существует обратная связь между длительностью циркуляции тромбоцита и объемом клетки (Khan M. I., Ullah I., 2020). У взрослого населения средний объем тромбоцитов достоверно выше ($p < 0,001$), чем у детей, и превышает нормальное значение, составляя 11,85 фл.

PDW отражает степень неоднородности тромбоцитов в крови и в норме не превышает 16%. Мы обнаружили, что у взрослых показатель анизоцитоза тромбоцитов значительно повышен, медиана составила 22,3%, а у детского населения лежит в области референсных величин и составляет 15,6% ($p < 0,001$). Таким образом, у взрослых пациентов с ИТП в периферической крови тромбоциты с анизоцитозом и крупнее, чем у детей.

Таким образом, возрастной фактор имеет существенное значение, что объяснимо особенностями морфологических и функциональных свойств организма отдельной возрастной группы. Однако, простой градации на детский и взрослый возраст зачастую недостаточно для определения и характеристики процессов, происходящих в разных возрастных рамках, как в состоянии физиологической нормы, так и при развитии патологических процессов. Необходимо подробнее рассмотреть каждую группу детского и взрослого населения.

4.2. Характеристика групп детского населения с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Возрастная периодизация онтогенеза, принятая на VII Всесоюзной конференции по проблемам возрастной морфологии, физиологии и биохимии, отлично учитывает морфологические, функциональные и психологические особенности свойств организма каждой возрастной группы и предлагает

разделить детское население на 6 подгрупп (Крылов А.А., 2005). Первую подгруппу «грудной возраст» составили дети в возрасте от 10 дней до года, вторая подгруппа «раннее детство» включает в себя детей от 1 года до трех лет, третья группа «первое детство» – детей 4-7 лет, четвертая «второе детство» – мальчиков от 8 до 12 лет и девочек от 8 до 11 лет, пятая «подростковый возраст» – мальчиков от 13 до 16 лет и девочек от 12 до 16 лет, шестая «юношеский возраст» – юношей 17-21 лет, девушек 17-20 лет. Изменения показателей миелограмм отражены в таблице 14.

Так, мы видим, что достоверные различия между группами детского населения наблюдаются в нейтрофильном, лимфоцитарном, плазмоцитарном и эритроцитарном ростках кроветворения.

Нейтрофильный росток характеризуется динамичностью показателей. Как видно из рисунка 23, медиана количества нейтрофильных метамиелоцитов у детей грудного возраста начинается на уровне 5,8%, далее до 3-летнего возраста нарастает до 7,2%, после чего резко снижается к 7-летнему возрасту и занимает самое низкое значение – 5,2% ($p < 0,01$). После периода первого детства количество нейтрофильных метамиелоцитов возрастает с переходом от одной стадии возраста к другой, достигая максимальных значений в юношеском возрасте – 11,5% ($p < 0,05$).

Кривая изменений медианы палочкоядерных нейтрофилов имеет куполообразную форму. В грудном возрасте уровень этих клеток занимает самое низкое значение – 5,3% ($p < 0,01$), затем их количество начинает расти и к периоду первого детства достигает плато (9,2%), которое держится в период второго детства и подросткового возраста, после чего в юношеском возрасте вновь начинается снижение. Схожие изменения прослеживаются и у сегментоядерных нейтрофилов. В грудном возрасте медиана признака занимает самое низкое значение – 12,5% ($p < 0,01$), далее наблюдается рост количества сегментоядерных нейтрофилов и в период первого детства достигает максимального значения – 22,0% ($p < 0,05$). В дальнейшие возрастные периоды количество сегментоядерных нейтрофилов держится на уровне 20,0%.

Показатели миелограмм возрастных групп детского населения
с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой, Me [25%, 75%]

Показатель	Грудной возраст (n=14)	Раннее детство (n=46)	Первое детство (n=28)	Второе детство (n=20)	Подростко- вый возраст (n=9)	Юношеский возраст (n=9)	p k-w
Плазмоциты, %	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,40]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,40 [0,00–0,75]*	0,043
Миелобласты, %	0,80 [0,20–0,95]	1,00 [0,45–1,60]	0,80 [0,40–1,60]	0,50 [0,40–1,20]	0,40 [0,40–1,20]	0,40 [0,10–1,60]	0,331
Промиелоциты, %	1,50 [0,63–2,15]	2,00 [1,40–3,20]	2,80 [1,50–3,20]	3,00 [1,50–4,00]	1,60 [0,40–2,00]	1,80 [0,45–4,70]	0,299
Миелоциты нейтрофильные, %	6,40 [2,15–8,55]	7,50 [4,90–10,4]	7,00 [4,0–10,60]	8,80 [6,80–10,80]	7,60 [5,60–8,80]	8,60 [6,50–18,10]	0,649
Метамиелоциты нейтрофильные, %	5,80 [4,78–7,35]	7,20 [5,20–10,4]	5,20 [3,9–8,10]**	8,40 [5,60–12,40]	9,40 [8,40–11,60]	11,50 [9,85–14,20]*	<0,001
Палочкоядерные нейтрофилы, %	5,30 [4,25–6,20]**	8,00 [6,0–10,80]	9,60 [6,80–11,3]	9,20 [6,80–11,60]	9,20 [8,80–11,20]	7,30 [5,50–9,40]	0,046
Сегментоядерные нейтрофилы, %	12,50 [10,13–20,4]**	16,80 [13,30–22,0]	22,00 [17,9–25,1]*	20,40 [16,00–24,0]	20,80 [16,00– 28,0]	20,00 [16,8–24,15]	0,033
Сумма нейтрофиль- ных элементов, %	35,60 [30,0–48,20]**	44,00 [35,8–52,4]	49,20 [39,2–52,8]	52,0 [40,6–57,4]	50,0 [43,5–61,0]	52,6 [48,2–57,8]	0,007
Миелоциты эозинофильные, %	0,80 [0,58–1,70]	0,80 [0,40–1,35]	0,60 [0,00–2,00]	0,40 [0,00–0,80]	0,40 [0,00–2,00]	0,80 [0,45–1,55]	0,676
Метамиелоциты эозинофильные, %	0,45 [0,10–0,50]	0,40 [0,00–0,80]	0,40 [0,00–0,80]	0,40 [0,00–0,80]	0,20 [0,00–1,20]	0,00 [0,00–0,85]	0,981
Эозинофилы зрелые, %	0,90 [0,58–1,90]	1,20 [0,80–2,00]	1,80 [1,10–3,70]	1,20 [0,80–2,00]	0,80 [0,80–0,80]	1,20 [0,80–2,70]	0,182
Базофилы, %	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,40]	0,20 [0,00–0,60]	0,052
Лимфоциты, %	42,90 [28,6–48,88]*	25,00 [19,3–31,9]**	20,00 [15,9–26,58]	19,20 [15,2–24,40]	20,80 [12,8–23,20]	16,90 [15,6–19,30]	0,001
Моноциты, %	2,25 [0,98–4,50]	3,40 [2,00–4,80]	3,20 [1,50–5,70]	4,00 [2,40–5,20]	4,40 [3,20–5,20]	4,40 [1,40–4,95]	0,642
Проэритробласты, %	0,00 [0,00–0,90]	0,00 [0,00–0,80]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,40]	0,00 [0,00–0,40]	0,20 [0,00–0,55]	0,647
Эритробласты базофильные, %	1,25 [0,50–2,15]	2,00 [1,45–3,80]	2,45 [0,80–4,00]	2,00 [1,00–3,60]	1,80 [0,40–5,60]	3,40 [1,45–4,20]	0,637
Эритробласты полихроматофильные, %	15,60 [10,8–18,60]	15,50 [8,10–19,9]	18,80 [12,9–22,4]	16,00 [13,6–20,40]	10,40 [8,00–23,20]	11,50 [8,90–12,70]	0,056
Эритробласты оксифильные, %	0,90 [0,20–2,65]	1,90 [0,80–3,50]	2,00 [0,80–3,70]	1,20 [0,40–3,60]	3,60 [2,00–8,80]	5,00 [2,60–8,50]*	0,025
Эритробластические элементы (сумма), %	19,15 [13,2–21,15]	21,40 [15,85–25,1]	21,80 [19,7–30,1]	20,80 [16,8–28,00]	16,00 [14,0–28,00]	21,50 [15,7–24,60]	0,627
Цитоллиз на 500 клеток	44,00 [44,0–44,00]	41,00 [36,0–79,0]	46,00 [26,0–82,0]	65,00 [20,75–82,5]	98,00 [35,0–146,0]	92,00 [50,75–182,5]	0,348
Лейко- эритробластическое соотношение	4,1 [4,0–5,4]	3,58 [2,96–5,10]	3,59 [2,31–3,98]	3,81 [2,58–4,85]	4,26 [2,82–5,99]	3,68 [3,10–5,02]	0,243
Индекс созревания нейтрофилов	0,93 [0,53–1,07]	0,72 [0,54–1,03]	0,60 [0,38–0,69]**	0,67 [0,59–0,81]	0,69 [0,50–0,77]	0,99 [0,70–1,21]	0,005
Индекс созревания эритрокариоцитов	0,85 [0,67–0,95]	0,87 [0,71–0,93]	0,91 [0,82–0,95]	0,89 [0,83–0,94]	0,88 [0,77–0,93]	0,84 [0,79–0,86]	0,361

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий;

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

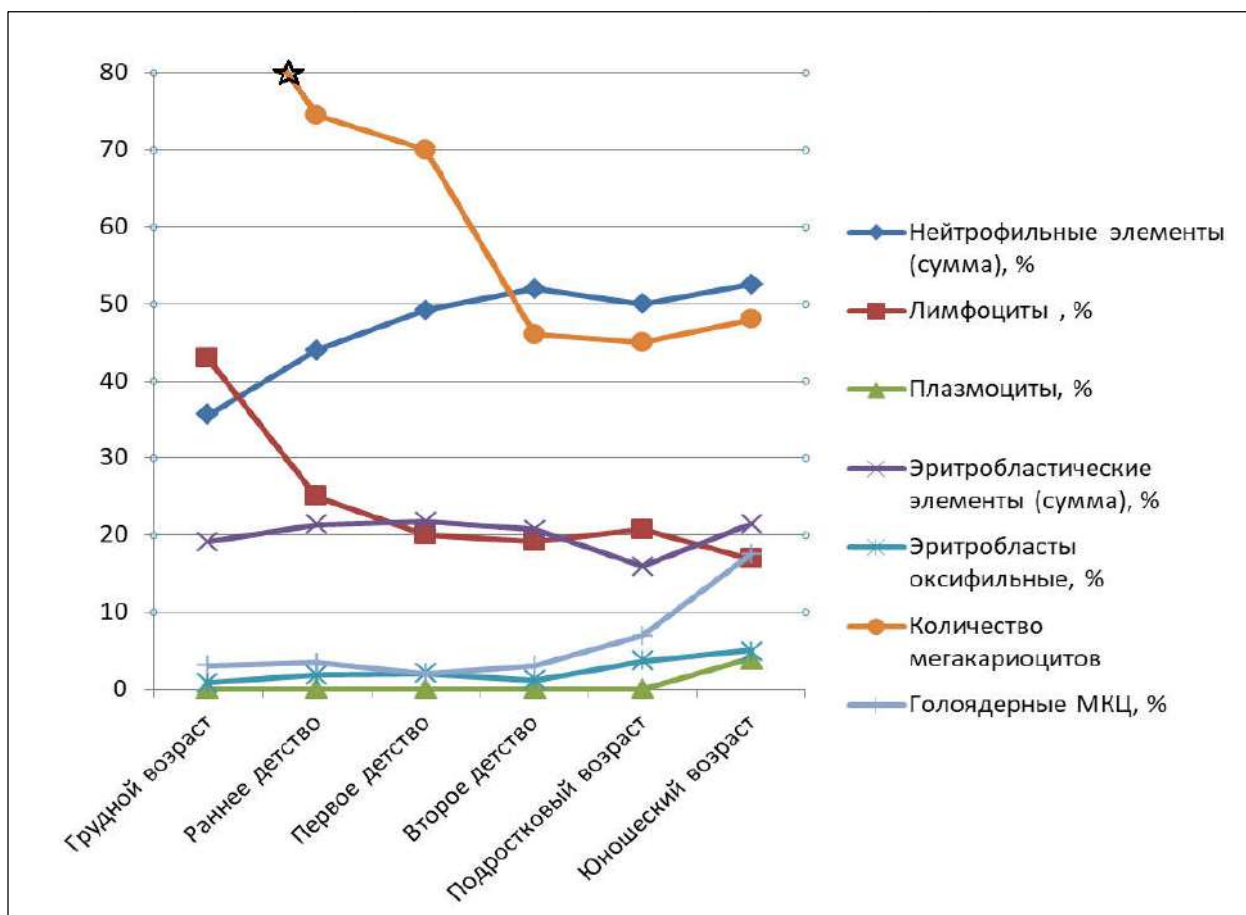


Рисунок 23 – Изменения показателей миелограммы и мегакариоцитарной формулы среди групп детского населения у пациентов с ИТП

Лимфоцитарный росток имеет другую тенденцию изменений. Так, максимальный уровень лимфоцитов приходится на грудной возраст и составляет 42,9% ($p < 0,05$), к трем годам количество лимфоцитов падает до 25,0% ($p < 0,01$). Такая тенденция снижения сохраняется вплоть до юношеского возраста, при котором количество лимфоцитов составляет самое низкое значение – 16,9%. Безусловно, подобные изменения количества популяций нейтрофилов и лимфоцитов объясняются «перекрестом», который происходит к 5-6 годам (Nandakumar S.K. et al., 2016).

Плазматические клетки у детей младших возрастов либо не обнаруживаются совсем, либо единичны. Небольшой постоянный их уровень появляется в подростковом возрасте и в юношеском возрасте достигает значения 0,4% ($p < 0,05$).

Следующие изменения показателей миелограмм, которые зависят от возрастного фактора, коснулись эритроидного ростка. Так, мы видим, как медиана количества оксифильных эритробластов в грудном возрасте занимает самое низкое значение – 0,9%, далее начинает постепенно расти, составляя в периоды раннего и первого детства близкие друг другу значения – 1,9% и 2,0% соответственно. К 8 годам мы наблюдаем новое снижение уровня оксифильных эритробластов до 1,2%, после чего их количество быстро нарастает и достигает максимального значения 5,0% ($p < 0,05$) в период юношества. Низкое значение оксифильных эритробластов в грудном возрасте может быть результатом усиления эритропоэза и, как следствие, осуществления энуклеации эритробластов преимущественно на полихроматофильной стадии. В дальнейшем к юношескому возрасту эритропоэз приобретает черты, характерные для взрослых, а процессы энуклеации эритробластов происходят и на полихроматофильной, и на оксифильной стадии, что приводит к повышению количества оксифильных эритробластов (Nandakumar S.K. et al., 2016).

Мегакариоцитарный росток также подвержен влиянию возрастного фактора (таблица 15). Так, при ИТП более всего раздражен мегакариоцитарный росток в грудном возрасте, здесь количество мегакариоцитов составило максимальное значение – медиана 225,5 на 250 полей зрения ($p < 0,05$). При этом в период взросления наблюдается снижение мегакариоцитов в костном мозге.

Изменяется и созревание мегакариоцитарного ростка. Так, мы видим, что количество незрелых базофильных мегакариоцитов с грудного возраста и до 12 лет находится на высоком уровне, составляя около 40% от всех форм мегакариоцитов. Далее их количество начинает снижаться и в период юношества достигает 12% ($p < 0,001$). Соответственно, такие колебания сопряжены с индексом созревания мегакариоцитов. В целом, можно сделать вывод, что с грудного возраста и до 12 лет у детей с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой наблюдается задержка созревания мегакариоцитов в костном мозге.

Таблица 15.

Показатели мегакариоцитогамм пациентов с ИТП у групп детского населения,
Me[25%, 75%]

Показатель	Грудной возраст (n=14)	Раннее детство (n=46)	Первое детство (n=28)	Второе детство (n=20)	Подростковый возраст (n=9)	Юношеский возраст (n=9)	p k-w
Всего мегакариоцитов на 250 полей зрения	225,50 [90,0–430,0]*	74,50 [50,75–121,5]	70,00 [50,75–91,5]	46,00 [28,0–94,75]	45,00 [26,25–100,5]	57,00 [14,5–75,25]	0,056
Мегакариобласты, %	0,50 [0,00–1,00]	0,00 [0,00–1,00]	0,50 [0,00–1,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,50 [0,00–1,00]	0,00 [0,00–1,75]	0,333
Промегакарициты, %	2,00 [0,25–3,00]	1,00 [0,00–2,00]	1,00 [0,00–2,00]	1,00 [0,00–2,75]	0,50 [0,00–1,25]	1,50 [0,25–2,00]	0,651
Мегакарициты базофильные, %	39,50 [26,25–56,5]	41,50 [37,0–51,75]	40,50 [30,75–49,5]	41,50 [27,0–49,25]	24,00 [18,00–39,0]*	12,00 [2,5–24,25]***	0,001
Мегакарициты полихроматофильные, %	41,00 [36,25–45,7]	36,00 [29,25–43,0]	37,50 [27,0–46,25]	39,00 [34,25–51,2]	43,50 [39,0–52,00]	44,50 [35,0–50,00]	0,135
Мегакарициты оксифильные, %	9,00 [4,25–15,25]	12,00 [7,25–17,75]	13,50 [6,75–19,5]	10,50 [5,5–19,75]	15,00 [5,50–21,50]	12,50 [7,00–26,75]	0,939
Инволютивные формы, %	2,00 [0,25–5,25]	1,00 [0,00–1,75]	0,00 [0,00–2,00]	0,00 [0,00–1,00]	2,50 [0,75–4,25]	2,50 [0,00–4,75]	0,084
Голоядерные, %	3,00 [0,25–6,50]	3,50 [2,00–5,00]	2,00 [1,00–5,25]	3,00 [1,00–5,00]	7,00 [0,75–12,00]	17,50 [14,75–32,0]**	0,006
Дегенеративные, %	0,50 [0,00–1,75]	1,00 [0,00–2,75]	1,00 [0,00–2,25]	0,00 [0,00–1,00]	1,00 [0,00–2,50]	1,00 [0,00–2,75]	0,216
Эмпериоплез, %	2,00 [1,25–2,75]	3,00 [1,00–4,00]	4,00 [2,00–6,00]	2,00 [1,00–4,00]	3,00 [0,75–4,25]	3,00 [0,25–3,75]	0,457
Микромегакарициты, %	8,00 [2,5–27,75]	3,00 [1,00–5,75]	1,00 [0,00–2,25]	2,50 [1,00–5,00]	2,50 [1,50–5,00]	1,50 [0,00–7,25]	0,101
Мегакарициты с множеством ядер, %	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,0–1,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,053
Индекс созревания мегакариоцитов	0,84 [0,50–1,45]	0,91 [0,66–1,20]	0,90 [0,48–1,22]	0,88 [0,39–1,15]	0,44 [0,30–0,77]	0,26 [0,07–0,5]**	0,004

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий;

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Достоверные различия выявлены и в количестве «голаядерных» форм мегакариоцитов. Отличается от всех групп резким увеличением уровня этих форм группа юношеского периода. Если во всех возрастных группах медиана количества варьировала от 2,0% до 7,0%, то к 20 годам она составила 17,5% (при $p < 0,01$), что свидетельствует об усилении интенсивности тромбоцитобразования в этой группе детского населения.

Данные периферического звена отражены в таблице 16. Мы обнаружили, что у детей с ИТП значимо подвержены влиянию возрастного фактора лейкоцитарные и эритроцитарные показатели, тогда как тромбоцитарное звено показало схожие значения. Количество лейкоцитов является максимальным в

группе грудного возраста (медиана – $9,90 \cdot 10^9/\text{л}$), которое постепенно снижается с возрастом, показывая минимальное значение в юношеском периоде (медиана – $6,0 \cdot 10^9/\text{л}$, $p < 0,0001$).

Таблица 16.

Показатели общего анализа крови пациентов с ИТП у групп
детского населения, Me[25%, 75%]

Показатель	Грудной возраст (n=14)	Раннее детство (n=46)	Первое детство (n=28)	Второе детство (n=20)	Подростковый возраст (n=9)	Юношеский возраст (n=9)	p k-w
Лейкоциты (WBC), $\times 10^9/\text{л}$	9,90 [8,2-12,7]**	8,40 [7,4-9,8]*	8,20 [6,95-9,40]*	7,00 [5,85-8,50]	6,80 [5,90-7,45]*	6,00 [4,52-7,22]**	<0,0001
Эритроциты (RBC), $\times 10^{12}/\text{л}$	4,35 [3,97-4,58]	4,42 [4,11-4,75]	4,43 [3,94-4,90]	4,80 [4,41-5,03]*	4,43 [3,35-4,79]	5,19 [4,88-5,58]**	0,002
Гематокрит (HCT), %	33,10 [31,4-34,6]**	34,00 [32,6-36,6]**	36,15 [33,7-39,3]**	38,6 [36,3-40,2]**	39,20 [28,8-40,8]	44,80 [39,0-48,8]**	<0,0001
Гемоглобин (HGB), г/л	108,0 [105-117]**	113,5 [106-122]	118,0 [111-127]**	130,0 [119-134]**	132,0 [93-136]	147,0 [131-153]**	<0,0001
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	25,5 [24,3-26,7]**	25,7 [25,2-26,8]**	26,85 [25,8-27,9]	26,85 [26,2-27,8]	27,60 [26,8-28,9]	28,05 [26,6-29,1]	0,0009
Средний объем эритроцитов (MCV), фл	76,50 [73,4-80,9]**	77,30 [75,0-80,0]**	80,9 [79,7-83,8]	80,9 [79,7-83,8]	85,20 [80,4-87,5]	85,5 [82,1-89,45]	<0,0001
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), г/дл	33,20 [32,7-33,7]	33,00 [32,4-33,9]	32,90 [32,2-33,6]	33,00 [32,7-33,7]	32,80 [31,4-33,5]	29,30 [27,9-31,3]	0,075
Распределение эритроцитов по объему, коэффициент вариации (RDW-CV), %	13,3 [13,0-13,8]	13,55 [13,0-14,2]	13,6 [12,9-14,0]	13,2 [12,5-13,7]	13,1 [12,8-13,6]	13,2 [12,7-14,1]	0,275
Распределение эритроцитов по объему, стандартное отклонение (RDW-SD), фл	39,20 [37,5-41,1]*	40,15 [38,8-42,4]	41,55 [40,5-43,6]	41,60 [39,1-42,3]	41,90 [40,7-45,2]	41,10 [38,2-41,7]	0,022
Тромбоциты (PLT), $\times 10^9/\text{л}$	13,0 [9,25-28,5]	14,0 [8,0-25,0]	25,5 [11,0-42,0]	20,0 [11,0-47,5]	26,0 [12,5-31,2]	31,0 [19,5-63,5]	0,230
Тромбокрит (PCT), %	0,018 [0,009-0,04]	0,034 [0,01-0,04]	0,035 [0,01-0,05]	0,013 [0,01-0,03]	0,035 [0,02-0,05]	0,046 [0,02-0,07]	0,298
Средний объем тромбоцитов (MPV), фл	9,20 [8,7-10,6]	9,70 [8,95-10,6]	10,10 [9,1-11,3]	10,35 [9,1-11,05]	10,90 [10,1-11,6]	11,75 [10,0-12,8]	0,142
Анизцитоз тромбоцитов (PDW), %	15,15 [14,8-15,9]	15,60 [14,9-15,9]	15,70 [15,2-16,2]	15,80 [14,8-16,4]	15,70 [14,9-16,0]	19,1 [15,9-22,5]	0,135

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий;
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Эритроциты и гематокрит показывают обратное распределение: так, медиана количества эритроцитов в грудном возрасте составила $4,35 \cdot 10^9/\text{л}$, а в

юношеском периоде – уже $5,19 \cdot 10^9/\text{л}$ ($p=0,002$). Объем эритроцитов (МСV), как и среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН), нарастают с возрастом.

Таким образом, мы выявили, что у детей с ИТП возрастной фактор оказывает существенное влияние на показатели миелограммы, мегакариоцитограммы и общего анализа крови, это указывает на то, что для выявления предикторов хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры у детского населения необходимо рассматривать каждую группу в отдельности от других.

4.3. Характеристика групп взрослого населения с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Возрастная периодизация онтогенеза, принятая на VII Всесоюзной конференции по проблемам возрастной морфологии, физиологии и биохимии, разделяет взрослое население на следующие подгруппы: первый период зрелости, в который входят мужчины от 22 до 35 лет и женщины от 21 года до 35 лет; во второй период зрелости входят мужчины 36-60 лет и женщины 36-55 лет; пожилой возраст включает в себя мужчин 61-74 лет и женщин 56-74 лет; старческий возраст рассматривается от 75 до 90 лет. Показатели миелограмм и мегакариоцитограмм и общего анализа крови у взрослого населения приведены в таблицах № 17,18 и 19 (см. приложение).

Полученные данные указывают, что группы взрослого населения с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой хорошо сопоставимы друг с другом, и достоверных различий между ними не выявлено. Это дает нам право рассматривать взрослое население единым блоком для определения предикторов хронического течения ИТП, в отличие от групп детского возраста, где выявлены четкие возрастные градации.

4.4. Гендерная вариабельность показателей костного мозга и периферической крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

При исследовании миелограммы у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой (таблица 20, см. приложение) обнаружилось влияние гендерного фактора на лейко-эритробластическое соотношение. Так, у мужчин содержание нейтрофильных метамиелоцитов и суммарное количество нейтрофилов значимо ниже (сумма нейтрофилов у мужчин 39,2-58,2%, у женщин – 45,4-61,6%, $p<0,01$), тогда как сумма эритрокариоцитов, наоборот, выше (эритробластические элементы у мужчин – 17,2%-26,8%, у женщин – 14,4-24,9%, $p<0,01$). Данные мегакариоцитограмм (таблица 21, см. приложение), напротив, не зависят от гендерных различий, тогда как в общем анализе крови большинство различий было выявлено в эритроцитарных показателях (таблица 22, см. приложение). Так, у мужчин в периферическом звене количество эритроцитов, гематокрит, концентрация гемоглобина и гемоглобина ретикулоцитов значимо выше ($p<0,01$). У женщин с ИТП показатель анизоцитоза тромбоцитов имеет более высокое значение (медиана PDW у женщин – 17,85%, у мужчин – 15,9%, $p<0,05$).

4.5. Результаты исследования миелограмм, мегакариоцитограмм и биохимических показателей периферической крови у пациентов взрослого населения с хронической формой ИТП

С целью выявления лабораторных предикторов развития хронической формы идиопатической тромбоцитопенической пурпуры было проведено сравнение показателей у пациентов с хроническим течением ИТП и группой «острые». Распределяли по характеру течения, руководствуясь критерием хронической формы ИТП – продолжительность тромбоцитопении ниже $100 \times 10^9/\text{л}$ в течение 12 месяцев и более. В группу «острые» вошли пациенты с впервые диагностированной формой ИТП и персистирующей формой. Группа «острые»

составила 33,7% (31 случай), с хроническим течением – 66,3% (61 случай).
Результаты приведены в таблице 23.

Таблица 23.

Показатели миелограмм у пациентов взрослого населения с хроническим
течением ИТП

Показатель	«Острые» (n=31) Me [25%, 75%]	Хронические(n=61) Me [25%, 75%]	Отличие, <i>p</i>
Бласты, %	1,20 [0,40–1,80]	0,80[0,40–1,40]	0,103
Промиелоциты, %	2,40 [1,20–4,00]	2,00 [1,20–3,20]	0,219
Миелоциты нейтроф., %	13,50 [8,00–20,00]	14,60 [9,60–20,20]	0,417
Метамиелоциты нейтрофильные, %	9,80 [6,40–13,60]	9,60 [7,20–13,40]	0,826
Палочкоядерные нейтрофилы, %	8,00 [6,00–9,60]	7,40 [5,50–8,80]	0,360
Сегментоядерные нейтрофилы, %	17,60 [16,00–22,20]	20,60 [17,4–26,40]	0,141
Сумма нейтрофильных элементов, %	57,0 [52,0-64,0]	59,1 [51,4-66,8]	0,499
Миелоциты эозинофильные, %	0,90 [0,40–2,00]	1,20 [0,50–1,40]	0,896
Метамиелоциты эозинофильные, %	0,40 [0,20–0,60]	0,40 [0,00–0,60]	0,683
Эозинофилы зрелые, %	1,10 [0,60–2,00]	1,40 [1,00–2,10]	0,249
Базофилы, %	0,20 [0,00–0,40]	0,10 [0,00–0,40]	0,990
Лимфоциты, %	13,60 [9,2-15,6]	13,90 [9,2-18,2]	0,381
Плазмоциты, %	0,90 [0,40–1,20]	1,0 [0,40–1,60]	0,624
Моноциты, %	2,60 [1,60–3,80]	2,80 [1,50–3,70]	0,414
Проэритробласты, %	0,20 [0,00–0,40]	0,00 [0,00–0,40]	0,129
Эритробласты базофильные, %	2,90 [1,20–6,60]	3,30[1,60–5,60]	0,905
Эритробласты полихроматофильные, %	9,60 [6,00–14,40]	9,20 [7,00–12,40]	0,883
Эритробласты оксифильные, %	4,30 [1,20–9,20]	4,00 [2,40–7,50]	0,905
Эритробластические элементы (сумм), %	20,00 [14,80–25,20]	17,50 [12,8–24,80]	0,263
Лейко-эритробластическое соотношение	4,16 [2,96-5,76]	4,81 [3,00-6,75]	0,476
Индекс созревания нейтрофилов	1,05 [0,71-1,36]	0,95 [0,79-1,25]	0,659
Индекс созревания эритрокариоцитов	0,83 [0,66-0,92]	0,82 [0,72-0,87]	0,667

Проведенное исследование показало, что в зависимости от характера течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры значимых различий параметров миелограмм не выявлено. В мегакариоцитарной формуле (таблица 24) обнаружено, что в группе «острые» выше количество промегакариоцитов (группа «острые» медиана – 2,0%, с хроническим течением – 0,0%, $p < 0,05$). Данные общего анализа крови (таблица 25) также мало отличались, выявленные значимые различия коснулись только показателя анизоцитоза эритроцитов по

коэффициенту вариации RDW-CV. При хроническом течении эритроциты имеют более высокое значение RDW-CV (13,1-15,7%), чем в группе «острые» (12,9-13,6%, $p < 0,01$).

Таблица 24.

Показатели мегакариоцитограмм у пациентов взрослого населения с хроническим течением ИТП

Показатель	«Острые» (n=31) Me [25%, 75%]	Хронические (n=61) Me [25%, 75%]	Отличие, <i>p</i>
Всего мегакариоцитов на 250 п/зр	20,00 [11,00–46,00]	35,00 [24,00–54,25]	0,075
Мегакариобласты, %	0,00 [0,00–1,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,203
Промегакариоциты, %	2,00 [0,00–4,25]	0,00 [0,00–3,00]	0,039
Мегакариоциты базофильные, %	10,50 [5,00–15,00]	8,00 [4,00–16,70]	0,507
Мегакариоциты полихроматофильные, %	43,00 [37,00–48,00]	45,00 [34,25–50,00]	0,665
Мегакариоциты оксифильные, %	14,00 [9,00–20,00]	16,00 [9,25–25,75]	0,268
Инволютивные формы, %	2,00 [1,00–3,00]	3,00 [1,00–4,00]	0,141
Голоядерные, %	21,00 [14,00–33,00]	19,00 [11,25–28,00]	0,464
Дегенеративные, %	0,00 [0,00–2,00]	0,00 [0,00–1,00]	0,880
Эмпериоплез, %	3,00 [2,00–5,00]	4,00 [3,00–6,75]	0,112
Микромегакариоциты, %	3,00 [0,00–8,00]	3,00 [1,00–5,75]	0,953
Мегакариоциты с множеством ядер, %	0,00 [0,00–1,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,953
Гипогранулярные мегакариоциты, %	27,5 [22,0–37,0]	29,5 [19,0–39,0]	0,649
Пластинкообразующие формы, %	6,00 [3,00–19,00]	10,00 [5,25–19,00]	0,350
Пластинкосодержащие формы, %	29,50 [23,00–38,00]	29,00 [15,25–36,75]	0,568
Индекс созревания мегакариоцитов	0,21 [0,12–0,38]	0,18 [0,07–0,31]	0,321

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

Таким образом, стандартные исследования костного мозга и периферической крови представили нам мало данных для поиска предикторов хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, что направляет наше исследование на поиски новых подходов в изучении костного мозга и нового биоматериала.

Показатели общего анализа крови у пациентов взрослого населения с
хроническим течением ИТП

Показатель	«Острые» (n=31) Me [25%, 75%]	Хронические (n=61) Me [25%, 75%]	Отличие, p
Лейкоциты [WBC], $\times 10^9$ /л	7,06 [5,59-8,74]	6,60 [5,2-10,2]	0,773
Эритроциты [RBC], $\times 10^{12}$ /л	4,81 [4,2-5,27]	4,8 [4,27-5,25]	0,807
Гематокрит [HCT], %	41,8 [38,1-46,4]	41,3 [37,0-44,3]	0,629
Гемоглобин [HGB], г/л	136,5 [120-147]	128 [121-148]	0,7093
Среднее содержание гемоглобина в эритроците [MCH], пг	28,3 [27,4-29,4]	27,9 [26,1-29,1]	0,105
Средний объем эритроцитов [MCV], фл	88,45 [86,1-91,1]	86,95 [83,4-90,7]	0,164
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците [MCHC], г/дл	30,4 [28,12-31,9]	29,3 [27,7-33,1]	0,400
Распределение эритроцитов по объему, коэффициент вариации [RDW-CV], %	13,1 [12,9-13,6]	14,25 [13,1-15,7]	0,005
Распределение эритроцитов по объему, стандартное отклонение [RDW-SD], фл	41,75 [40,4-44,1]	42,7 [41,22-46,97]	0,325
Ретикулоциты [Ret], ‰	12,25 [8,3-19,85]	9,4 [7,0-14,97]	0,426
Ретикулоциты [Ret#], $\times 10^{12}$ /л	0,064 [0,039-0,082]	0,044 [0,037-0,070]	0,5069
Гемоглобин ретикулоцитов [RET-He], пг	30,1 [28,9-31,62]	29,6 [27,9-30,77]	0,6333
Тромбоциты [PLT], $\times 10^9$ /л	27,0 [12,2-57,0]	29,5 [10,0-62,0]	0,7354
Тромбокрит [PCT], %	0,082 [0,036-0,127]	0,077 [0,051-0,102]	0,749
Средний объем тромбоцитов [MPV], фл	12,25 [11,1-13,1]	11,7 [9,73-14,2]	0,809
Анизоцитоз тромбоцитов [PDW], %	22,1 [20,3-23,4]	21,85 [18,4-23,75]	0,847

**серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий*

ГЛАВА 5

ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ КОСТНОГО МОЗГА (МИЕЛОПЛАЗМЫ) ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРЕ

Интерстициальная жидкость костного мозга, которую мы предлагаем называть *миелоплазмой*, включает в себя все внеклеточные цитокины между клетками костного мозга и составляет внешнее микроокружение стромальных и гемопоэтических клеток костного мозга. Предположительно, химический состав миелоплазмы отличается от плазмы периферической крови. Хотя в многочисленных исследованиях изучался клеточный состав костного мозга и его роль в нормальном кроветворении и заболеваниях, до сих пор не было проведено достаточно исследований состава миелоплазмы. Анализ уровня цитокинов и биохимических показателей миелоплазмы может улучшить наше понимание взаимодействия между ГСК и нишей кроветворения – механизма, с помощью которого регулируется кроветворение в костном мозге, изменений состава при различных гематологических заболеваниях, в частности, – идиопатической тромбоцитопенической пурпуре.

5.1. Биохимический и цитокиновый профиль миелоплазмы у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Белки миелоплазмы осуществляют множество важных функций, обеспечивая нормальное функционирование и созревание стромальных и гемопоэтических клеток костного мозга. Так, например, Wang W. et al. (2010) смогли идентифицировать 31 экспрессируемый белок миелоплазмы, участвующий в различных биологических функциях стареющих крыс.

Количество общего белка – ключевой индикатор для всех энзиматических и регуляторных процессов, а также аминокислотный резерв организма. Уровень общего белка в миелоплазме при ИТП значительно ниже по сравнению с плазмой тех

же пациентов ($p < 0,05$), такая же тенденция выявлена и в группе сравнения (рисунок 24).

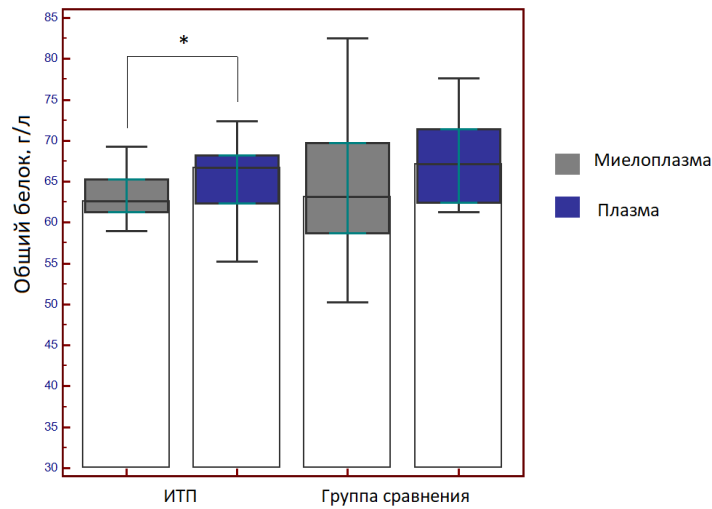


Рисунок 24 – Уровень общего белка в миелоплазме и в периферической крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

*Примечание. Здесь и далее в 5 главе значения представлены в виде медианы и межквартильных разбросов, * - при $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$, ***- при $p < 0,001$*

Медиана количества общего белка в миелоплазме у пациентов с ИТП составила 62,6 г/л, соответственно, в плазме – 66,7 г/л, в то время как в группе сравнения в миелоплазме общий белок составил 63,1 г/л и в плазме – 67,1 г/л.

Аналогичные различия выявлены и в уровне альбумина (рисунок 25).

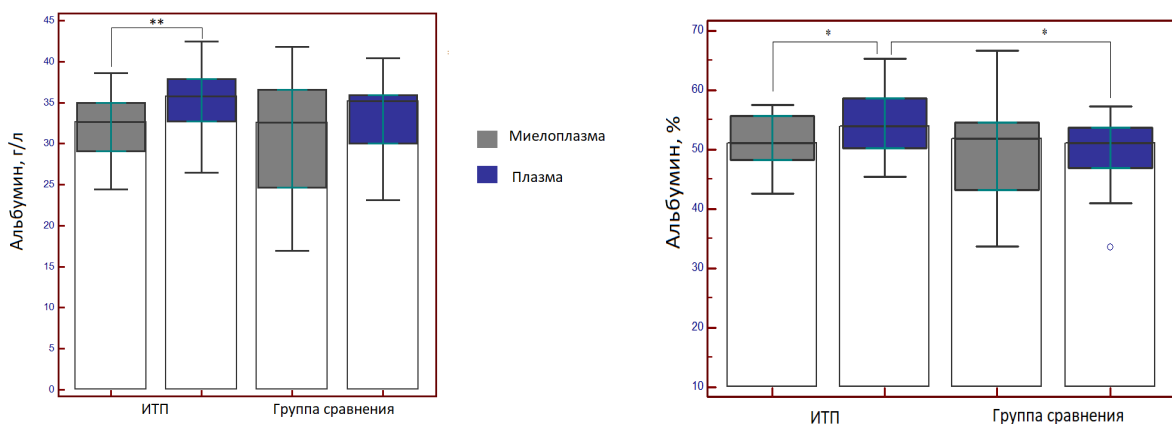


Рисунок 25 – Уровень альбумина в миелоплазме и в периферической крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Так, медиана количества альбумина в миелоплазме при ИТП составила 32,66 г/л, в плазме – 35,80 г/л, а в группе сравнения – 32,53 г/л и 35,20 г/л соответственно. Таким образом, мы обнаружили более низкий уровень общего белка и альбумина в миелоплазме в целом. Полученные данные указывают на более низкое онкотическое давление миелоплазмы, что является общим признаком для всех интерстициальных жидкостей. Так, например, более низкий уровень белка в интерстициальном пространстве по сравнению с плазмой ранее был продемонстрирован в подкожной клетчатке на животных моделях (Aukland K. et al., 1984). В то же время наши данные демонстрируют, что при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре уровни общего белка и альбумина значимо ниже по сравнению с плазмой этих пациентов ($p<0,05$ и $p<0,01$ соответственно), и при сопоставлении с группой контроля данная тенденция сохраняется.

В глобулиновых фракциях также обнаружены изменения в миелоплазме.

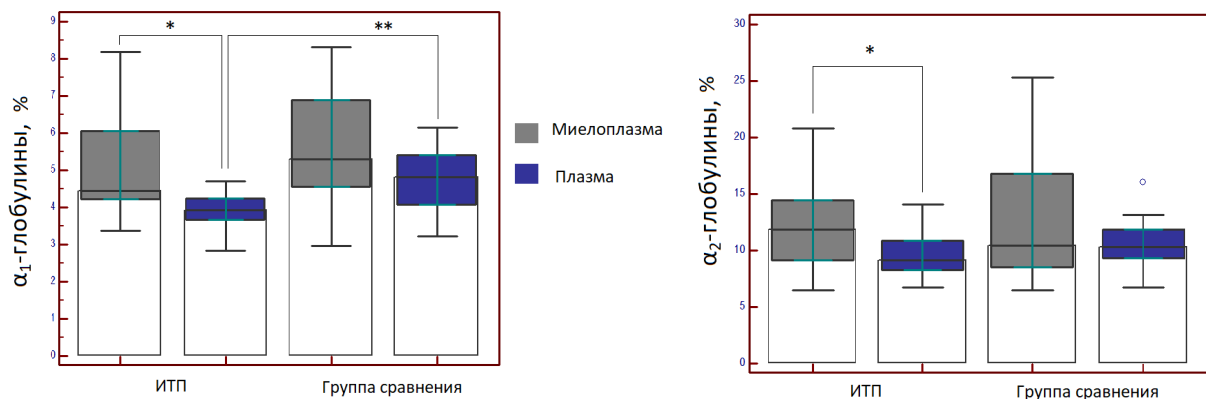


Рисунок 26 – Количество α_1 - и α_2 -глобулинов в миелоплазме и в периферической крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Как показано на рисунке 26, уровень α_1 - и α_2 -глобулинов в миелоплазме выше по сравнению с плазмой. Для группы пациентов с ИТП эти различия оказались значимыми ($p<0,05$) как для миелоплазмы, так и для периферической крови. Выявлено достоверное снижение α_1 -глобулиновой фракции в плазме пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой ($p<0,01$).

Наибольший интерес для α_1 -глобулиновой фракции представляют протеины α_1 -антитрипсин, α_1 -антихимотрипсин и α_1 -липопротеин (ЛПВП). Первые два протеина – это главные ингибиторы протеиназ, основным источником которых являются лейкоциты. Как известно, α_1 -антитрипсин легко выходит в интерстиций, ингибируя гранулоцитарную эластазу, которая, в свою очередь, активирует тромбоциты (Chignard M. et al., 1994). α_1 -антихимотрипсин, кроме антипротеазной активности, супрессирует ответ лимфоцитов на некоторые виды мутагенов, антительный ответ и клеточно-опосредованную цитотоксичность, подавляет агрегацию тромбоцитов. Конечно, α_1 -антитрипсин и α_1 -антихимотрипсин – острофазные белки, но при проведении нашего исследования все пациенты с высоким уровнем С-реактивного белка были исключены, поэтому высокий уровень этих белков, вероятно, не связан с воспалением. Он может быть обусловлен либо изначально более высоким уровнем этих белков в миелоплазме, либо необходим для обеспечения реализации регуляторных функций этих белков. Что касается α_1 -липопротеина, пунктат костного мозга всегда содержит примесь жировой ткани и нейтрального жира, которые хорошо визуализируются при микроскопическом исследовании пунктата костного мозга, вследствие чего можно ожидать более высокие уровни α_1 -липопротеина в миелоплазме.

Группа α_2 -глобулинов более разнообразна. К доминантным белкам α_2 -глобулиновой фракции относятся α_2 -макроглобулин, гаптоглобин и церулоплазмин (Горбачева Д.В., 2020). α_2 -макроглобулин выполняет множество разнообразных и сложных функций, но прежде всего известен своей способностью ингибировать широкий спектр протеаз без прямой блокады активного сайта протеазы. Также известно, что α_2 -макроглобулин участвует в регуляции, транспорте и множестве других функций. Например, помимо ингибирования протеиназ, он регулирует связывание трансферрина с его поверхностным рецептором, связывает несколько важных цитокинов, включая основной фактор роста фибробластов, фактор роста тромбоцитов, интерлейкин-1 β и интерлейкин-6 и изменяет их биологическую активность (Rehman A.A. et al., 2013). Наши исследования действительно выявили сильную взаимосвязь между

уровнем α_2 -глобулинов и количеством интерлейкина-6 (рисунок 27) при проведении корреляционного анализа миелоплазмы ($R=0,803$, $p<0,001$).

Существенный вклад в α_2 -глобулиновую фракцию вносит гаптоглобин. Он принадлежит к белкам острой фазы, который связывает и стабилизирует гемоглобин плазмы, а затем выводится из циркуляции специфичным для макрофагов рецептором CD163. Известны и антиоксидантные свойства гаптоглобина, а также его способность стимулировать клетки макрофагально-моноцитарной линии и модулировать баланс хелперных Т-клеток 1 и 2 типа (Di Masi A. et al., 2020).

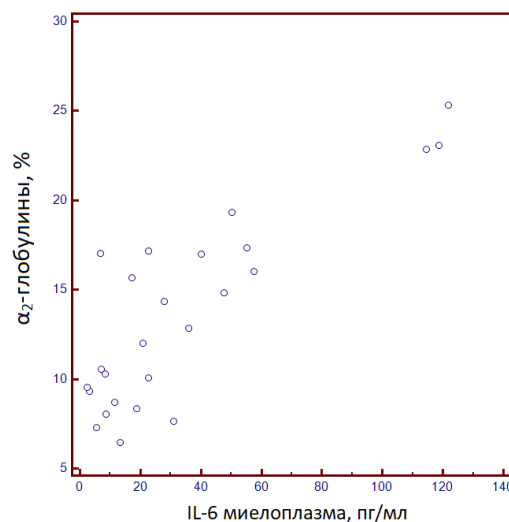


Рисунок 27 – Взаимосвязь α_2 -глобулинов и интерлейкина-6 в миелоплазме

Церулоплазмин, следующий доминантный белок α_2 -глобулиновой фракции, обладает значительной ферроксидазной активностью, способен мобилизовать железо с последующим окислением двухвалентного железа и включением в апотрансферрин, является ключевым элементом взаимодействия между метаболизмом меди и железа.

Количество β -глобулиновой фракции (рисунок 28) значимо ниже в плазме пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой ($p<0,001$), тогда как в группе сравнения в миелоплазме занимает значимо более низкий уровень, медиана составила 15,69% в интерстициальной жидкости костного мозга и 19,76% – в плазме ($p=0,001$). Поскольку для исследования была использована плазма, у некоторых образцов в зоне β -глобулинов присутствовала дополнительная

фракция, которая соответствует фибриногену. Таким образом, к доминантным белкам этой фракции относятся фибриноген, трансферрин, С3-комплемент, β -липопротеин (ЛПНП) (Горбачева Д.В., 2020).

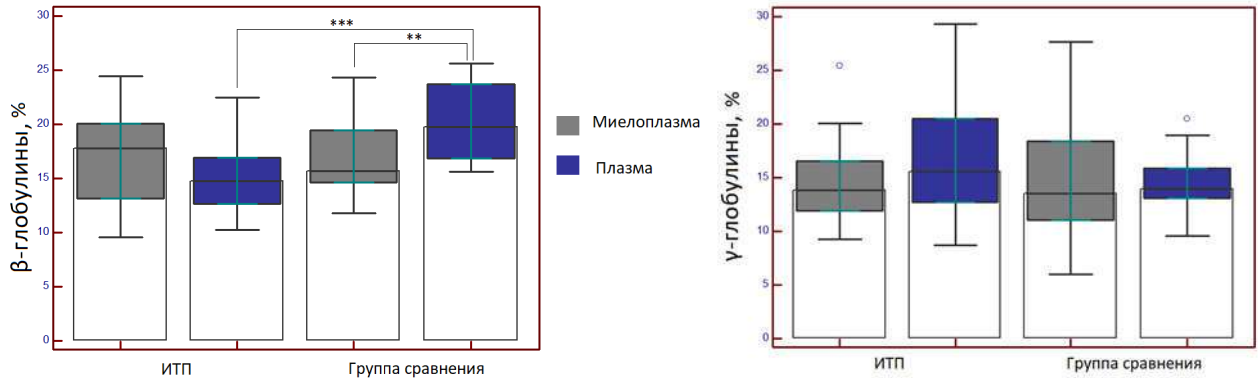


Рисунок 28 – Количество β - и γ -глобулинов в миелоплазме и в периферической крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Трансферрин играет важную роль в транспортировке железа. Большинство клеток организма получает железо из трансферрина. Значимая часть железа, связанного с трансферрином, используется для синтеза гемоглобина развивающимися эритроидными клетками костного мозга (Ponka P. et al., 1998). Корреляционный анализ (рисунок 29) выявил слабую взаимосвязь между уровнем β -глобулиновой фракции и количеством трансферрина в плазме ($R=0,303$, $p<0,05$), тогда как в миелоплазме взаимосвязь отсутствовала ($R=0,06$, $p=0,696$).

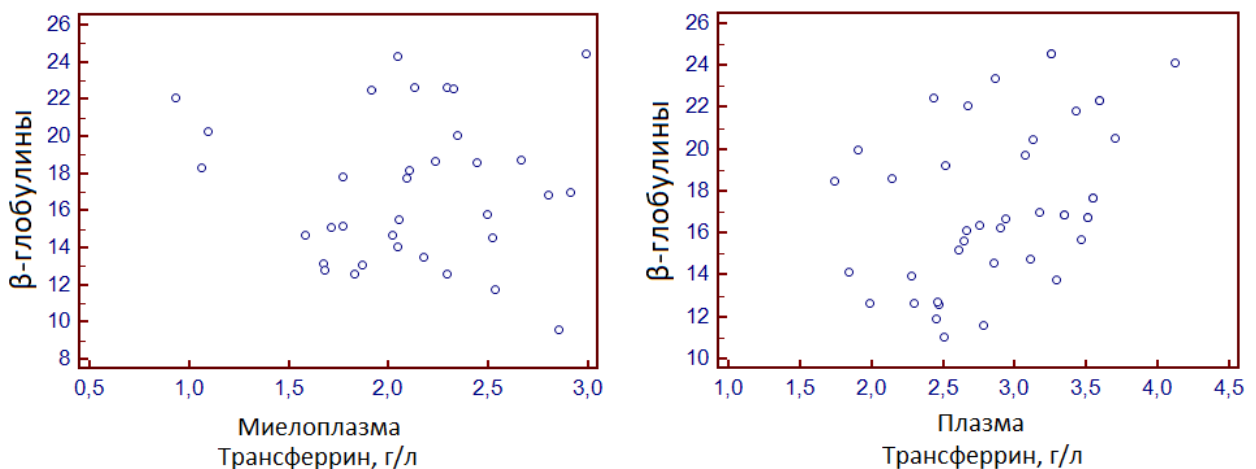


Рисунок 29 – Взаимосвязь β -глобулинов и трансферрина в миелоплазме и плазме крови

Компонент комплемента C3 играет ключевую роль во врожденном иммунитете. Выявлено, что активация комплемента C3 и C9 *in vivo* происходит у большинства пациентов с хронической ИТП, с последующим связыванием с поверхностью тромбоцитов. Это способствует более эффективному фагоцитозу и лизису тромбоцитов. Кроме того, уровень комплемента C3 и C4 снижен у пациентов с ИТП (Wang T. et al., 2021). Таким образом, повышение β -глобулиновой фракции миелоплазмы, вероятно, не связано с уровнем комплемента C3.

Рассчитанные γ -глобулины в миелоплазме и плазме сравниваемых групп показали схожие между собой уровни. Вероятно, состав γ -глобулиновой фракции интерстициальной жидкости костного мозга соответствует периферической крови и отражает весь иммуноглобулиновый спектр перенесенных инфекций.

Таким образом, при проведении электрофореза белков миелоплазмы мы видим существенные отличия от плазмы крови. Уровень общего белка и альбумина значимо ниже в миелоплазме у пациентов с ИТП, α_1 - и α_2 -глобулины показали более высокий уровень, β -глобулины имеют тенденцию к завышению у пациентов с ИТП и значимо ниже в группе сравнения. Поэтому в дальнейшем мы решили изучить, как изменяется уровень некоторых отдельных белков в миелоплазме при ИТП.

5.1.1. Показатели обмена железа в миелоплазме и плазме у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Железо необходимо почти для всех организмов: оно выполняет различные биологические функции, такие как транспортировка, хранение и активация транспорта кислорода; производство энергии; пролиферация клеток и ряд каталитических процессов. Оно играет центральную роль в репликации ДНК, так как является кофактором для одного из ключевых ферментов – рибонуклеотидредуктазы и участвует в биосинтезе гема (Li H., Qian Z.M., 2002).

Таким образом, роль железа в кроветворении определена не только для эритроидного ростка, но и необходима для пролиферации всех ростков.

Уровень железа распределился следующим образом (рисунок 30). У пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой количество железа в миелоплазме значительно ниже, чем в плазме крови ($p<0,05$), медиана составила 7,8 мкмоль/л и 16,1 мкмоль/л соответственно.

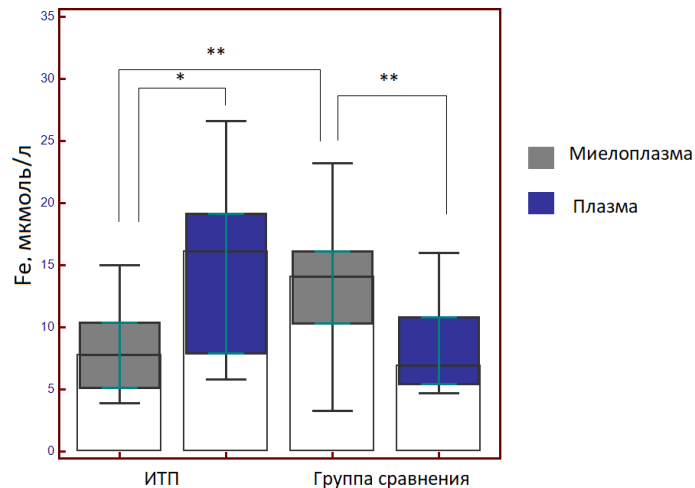


Рисунок 30 – Распределение железа в миелоплазме и плазме крови пациентов с ИТП

В группе сравнения ситуация обратная: в миелоплазме медиана составила 14,1 мкмоль/л, тогда как в плазме крови – 6,9 мкмоль/л ($p=0,004$). В группу сравнения вошли пациенты с железодефицитной анемией, этим объясняется низкий уровень железа в плазме. Обращает на себя внимание, что количество железа в миелоплазме у пациентов с ЖДА выше, чем в плазме этих пациентов. Вероятно, компенсаторно в условиях дефицита железа для осуществления усиленного эритропоза повышается уровень этого металла в миелоплазме. В то же время выявлены значимые различия количества железа в миелоплазме между группами пациентов с ИТП и группой сравнения ($p<0,01$). Было показано, что дефицит железа в интерстициальной жидкости костного мозга вызывает низкое фосфорилирование киназы ERK (extracellular signal-regulated kinase), что приводит к замедлению клеточного цикла в мегакариоцитарно-эритроидных предшественниках и смещению дифференцировки в сторону мегакариоцитарной

линии (Xavier-Ferrucio J. et al., 2019). Таким образом, регулируя уровень железа в миелоплазме, осуществляется дополнительное влияние на созревание и дифференцировку клеточных линий в костном мозге.

Однако железо потенциально токсично – если оно вступает в реакцию с кислородом, образуются свободные радикалы, которые повреждают клеточные мембраны, белки и ДНК, поэтому концентрация железа строго регулируется во внутренних жидкостях организма (Van Campenhout A. et al., 2003).

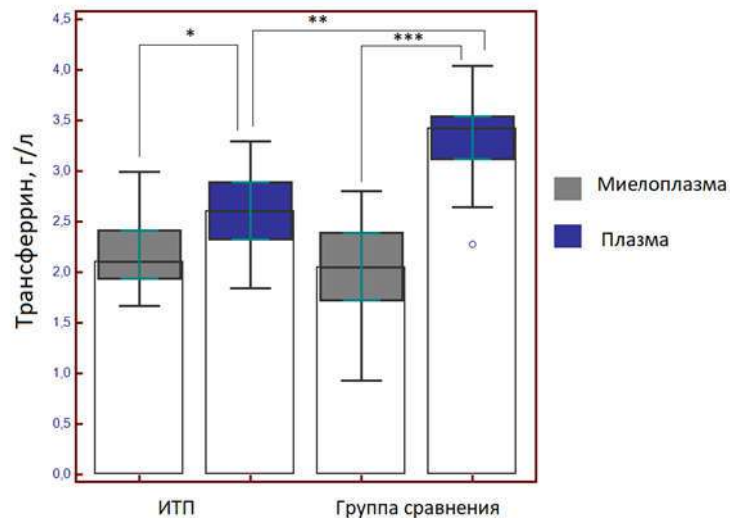


Рисунок 31 – Распределение трансферрина в миелоплазме и плазме крови пациентов с ИТП

Трансферрин безопасно транспортирует железо и снабжает им созревающие клетки. Мы обнаружили, что количество трансферрина в миелоплазме значимо ниже (рисунок 31) и у пациентов с ИТП, и в группе сравнения ($p < 0,05$ и $p < 0,001$). Так, медиана содержания трансферрина в интерстициальной жидкости костного мозга у пациентов с ИТП составила 2,1 г/л, а в плазме – 2,6 г/л (соотношение концентраций миелоплазма/плазма – 0,81) и, соответственно, в группе сравнения 2,05 г/л – в миелоплазме и 3,42 г/л – в плазме (соотношение концентраций миелоплазма/плазма – 0,60). Как видно из соотношения концентраций в миелоплазме и плазме, снижение трансферрина у пациентов с ЖДА в интерстициальной жидкости костного мозга более выражено ($p = 0,011$). При этом

все описанные изменения уровня трансферрина в миелоплазме и плазме сравниваемых групп находятся в пределах референсных величин.

Полученные результаты показывают, что уровни трансферрина в миелоплазме в двух сравниваемых группах практически схожи, в то время как в плазме этих групп имеются значимые различия ($p < 0,01$). Это позволяет сделать предположение, что концентрация трансферрина в миелоплазме стабильна и мало зависима от плазменных уровней.

Рецепторы к трансферрину (TfR) способствуют усвоению железа клетками позвоночных посредством цикла эндо- и экзоцитоза трансферрина. Их экспрессия осуществляется всеми ядродержащими клетками организма. TfR были обнаружены в эритроцитах, тромбоцитах, гепатоцитах, клетках кишечника, моноцитах, головном мозге, гематоэнцефалическом барьере, а также у некоторых насекомых и некоторых бактерий. Клеточный метаболизм железа саморегулируется посредством железозависимых изменений в количестве растворимых рецепторов трансферрина (sTfR), которые контролируют поглощение железа клеткой, и в дальнейшем связывании с ферритином (Li H., Qian Z. M., 2002). Миелоплазменные уровни sTfR значимо ниже (таблица 25), чем в плазме двух сравниваемых групп. При этом у пациентов с ИТП количество sTfR в миелоплазме в 1,5 раза ниже (медиана количества sTfR в миелоплазме – 2,23 мг/л, в плазме – 3,35 мг/л, $p < 0,05$), а в группе сравнения разница более выражена и составила 2,8 раза (медиана количества sTfR в миелоплазме – 2,80 мг/л, в плазме – 7,96 мг/л, $p < 0,0001$).

Рассчитанный коэффициент насыщения трансферрина железом (КНТЖ) представлен в таблице 25. У здоровых людей КНТЖ обычно колеблется от 20% до 45% (Elsayed M.E., Sharif M.U., Stack A.G., 2016). У пациентов с ИТП медиана КНТЖ составила 13,8% в миелоплазме, а в плазме – 16,30%, что указывает на снижение насыщения трансферрина железом. Критериями исключения для опытной группы были концентрация гемоглобина ниже 110 г/л, а также уровень С-реактивного белка выше 3 мг/л. Таким образом, снижение насыщения трансферрина при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре не связано с

дефицитом железа или воспалением. Известно, что трансферрин имеет 2 участка связывания с железом (Elsayed M.E., Sharif M.U., Stack A.G., 2016). Было показано, что параметры активации и агрегации тромбоцитов обратно коррелировали с коэффициентом насыщения трансферрина. Насыщенный трансферрин дозозависимо подавляет функцию тромбоцитов. Этот эффект реализуется за счет снижения экспрессии на мембране тромбоцита маркера активации CD62P и количества фосфорилированной формы сигнальной фосфоинозитид-3-киназы/Akt и митоген-активированной протеинкиназы Erk1/2 пути. Таким образом, насыщенный трансферрин начинает проявлять свойства дезагрегантов (Barale C. et al., 2019). Вероятно, выявленное снижение насыщения трансферрина при ИТП носит компенсаторный механизм для сохранения функциональной активности тромбоцитов в условиях тромбоцитопении.

Таблица 25.

Концентрация показателей обмена железа в миелоплазме и плазме крови пациентов с ИТП, Me[25%, 75%]

Наименование	Миелоплазма ИТП (n=92)	Плазма ИТП (n=92)	<i>p</i> ИТП	Миелоплазма группа сравнения (n=22)	Плазма группа сравнения (n=22)	<i>p</i> группа сравнения
sTfR, мг/л	2,23 [1,05–2,87]	3,35 [2,31–5,09]	0,016	2,80 [1,52–4,56]	7,96 [7,28–17,39]	<0,0001
КНТЖ, %	13,80 [9,83–24,25]	16,30 [7,30–25,70]	0,500	23,70 [19,30–42,00]	7,80 [7,20–17,80]	<0,0001
Ферритин, мкг/л	3938,35 [1460,9–6223,1]	71,50 [40,80–165,60]	<0,0001	17041,0 [6186,77–41245,1]	18,20 [12,80–144,50]	<0,0001

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

В группе сравнения, в которую вошли пациенты с ЖДА, насыщение трансферрина в плазме ожидаемо снижено (медиана составила 7,8%), а в миелоплазме значимо выше плазменного уровня ($p < 0,0001$): медиана – 23,7%, что, как и концентрация железа в миелоплазме, вероятно, связано с регулируемым накоплением и депонированием железа в костном мозге даже в

условиях дефицита для осуществления адекватного кроветворения. Для этого необходимо исследовать распределение ферритина.

Мы обнаружили значительное количество ферритина в миелоплазме: у пациентов с ИТП медиана составила 3938,35 мкг/л, тогда как в группе сравнения – 17041,0 мкг/л; в плазме, соответственно, 71,50 мкг/л и 18,20 мкг/л. Количество ферритина в миелоплазме у пациентов с ИТП превышает плазменные уровни в 55 раз, тогда как в группе сравнения – в 936 раз ($p < 0,001$). Одна молекула ферритина может инкапсулировать до 4500 атомов железа, что делает ее потенциально очень эффективной системой хранения и доставки железа (Chakraborti S., Chakrabarti P., 2019). Высокие уровни ферритина в миелоплазме объясняют полученные более высокие миелоплазменные значения железа и насыщение трансферрина у пациентов с ЖДА.

5.1.2. Активность аланинаминотрансферазы в миелоплазме пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Аланинаминотрансфераза – главная трансаминаза, осуществляющая необходимый уровень адаптации при стрессе и поддержание глюкозы за счет траты собственных белков. Этот фермент обеспечивает работу глюкозо-аланинового шунта, который выполняет переход пирувата в аланин и наоборот, что влияет на уровень глюкозы и белка. Стало известно, что повышение уровня АлАТ отражает не только степень цитолиза клеток, богатых ферментом, но и выраженность апоптоза, а также интенсивность работы митохондрий (Kolahdoozan S. et al., 2020). Образование протромбоцитов связано непосредственно с апоптозом путем внутренней активации каспаз мегакариоцитов (Clarke M.C. et al., 2003).

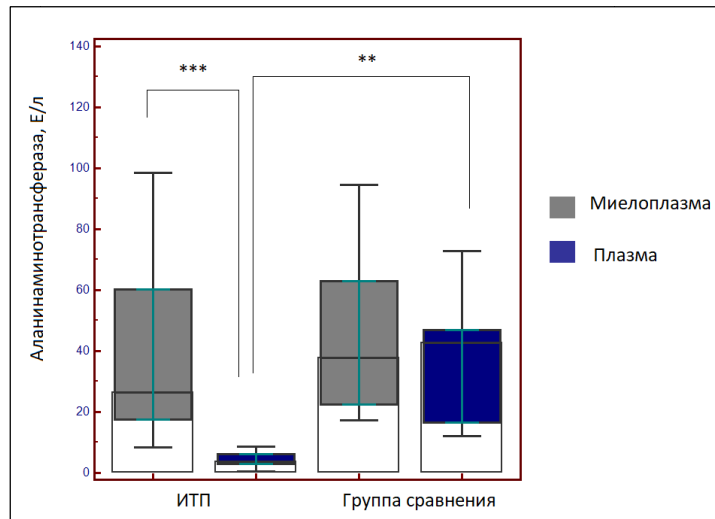


Рисунок 32 – Активность аланинаминотрансферазы в миелоплазме и плазме крови пациентов с ИТП

Как видно из рисунка 32, выявлены значимые отличия активности АЛАТ в миелоплазме и плазме пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой. Медиана активности АЛАТ в миелоплазме составила 26,35 Е/л, а в плазме – 3,7 Е/л ($p < 0,001$). В группе сравнения активность АЛАТ в миелоплазме также была выше плазменных показателей, и медиана составила в миелоплазме – 55,1 Е/л, а в плазме – 42,6 Е/л, но эти различия не были значимы.

Корреляционный анализ показал среднюю взаимосвязь между количеством мегакариоцитов и активностью аланинаминотрансферазы в миелоплазме ($R=0,531$, $p=0,016$) у пациентов с ИТП, в группе сравнения взаимосвязь отсутствовала (таблица 26).

Эта взаимосвязь может быть обусловлена, с одной стороны, усилением апоптоза для улучшения тромбоцитообразования, с другой – более выраженным диспозом мегакариоцитарного ростка. Проведя детальный корреляционный анализ между активностью АЛАТ в миелоплазме и показателями мегакариоцитогаммы, мы обнаружили слабую отрицательную взаимосвязь с инволютивными формами мегакариоцитов ($R=-0,484$, $p=0,035$). Таким образом, активность АЛАТ в миелоплазме у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой может служить индикатором выраженности

тромбоцитобразования (патент РФ № 2672471 «Способ оценки метаболической активности мегакариоцитарного ростка костного мозга»).

Таблица 26.

Корреляционные взаимосвязи между активностью АлАТ в миелоплазме и видами мегакариоцитов при ИТП

Показатели			PLT	Всего мегакариоцитов	Незрелые мегакариоциты	Мегакариоциты базофильные	Мегакариоциты полихроматофильные	Мегакариоциты оксифильные	Инволютивные мегакариоциты	Голоядерные мегакариоциты
ИТП	АлАТ	<i>R</i>	0,205	0,531	0,047	0,176	-0,088	-0,391	-0,488	0,342
		<i>p</i>	0,384	0,016	0,842	0,458	0,709	0,088	0,028	0,139
Группа сравнения	АлАТ	<i>R</i>	-0,036	0,332	0,212	0,377	0,138	-0,194	-0,269	-0,258
		<i>p</i>	0,881	0,165	0,382	0,112	0,573	0,425	0,266	0,286
Показатели			Дегенеративные мегакариоциты	Эмбриоплез	Микро-мегакариоциты	Мегакариоциты с множеством ядер	Гипогранулярные мегакариоциты	Пластинкообразующие мегакариоциты	Пластинкосодержающие мегакариоциты	
ИТП	АлАТ	<i>R</i>	0,189	0,030	-0,147	0,215	-0,259	-0,002	0,114	
		<i>p</i>	0,424	0,899	0,535	0,362	0,270	0,992	0,631	
Группа сравнения	АлАТ	<i>R</i>	0,203	0,141	0,00	-0,172	0,294	0,336	-0,403	
		<i>p</i>	0,403	0,564	1,00	0,481	0,221	0,159	0,086	

Примечание. Жирным шрифтом отмечены значения $p < 0,05$, указывающие на статистически значимую корреляционную взаимосвязь

5.1.3. Цитокиновый профиль миелоплазмы пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Многочисленные факторы роста кроветворных клеток регулируют различные аспекты биологии мегакариоцитов. Поздние стадии мегакариоцитопоэза, состоящие из терминальных процессов созревания цитоплазмы и выделения тромбоцитов, остаются малоизученными. Такие цитокины, как интерлейкин (ИЛ)-3, -6, -11 и фактор стволовых клеток, способствуют выработке тромбоцитов *in vitro* и индуцируют образование протромбоцитов культивируемыми мегакариоцитами (Norol F. et al., 1998).

ИЛ-6 оказывает прямое действие на предшественников мегакариоцитов, но только в синергии с низкими дозами ИЛ-3, увеличивая количество незрелых мегакариоцитов и усиливая процессы развития в зрелые мегакариоциты. Он стимулирует увеличение размера клеток и содержания ДНК (Williams N. et al., 1992). ИЛ-6 проявляет свою биологическую активность через рецептор ИЛ-6 (IL-6R) и связанный с мембраной β -рецептор гликопротеина 130 (gp130) (Mihara M. et al., 2012; Scheller J. et al., 2011). Покоящиеся тромбоциты также экспрессируют gp130 на своих мембранах, и в присутствии ИЛ-6 происходит транс-сигнализация, что увеличивает тромбогенность тромбоцитов (Tedgui A., Mallat Z., 2006).

ИЛ-8 – также известный циркулирующий воспалительный цитокин (Rabinovich A. et al., 2015; Ueland T. et al., 2015). Макрофаги и другие типы клеток, такие как эпителиальные клетки, клетки гладких мышц дыхательных путей и эндотелиальные клетки, продуцируют ИЛ-8. На поверхностной мембране тромбоцитов имеется множество рецепторов, способных связывать ИЛ-8, их представителями являются рецепторы, сопряженные с G-белком, CXCR1 и CXCR2. ИЛ-8 способствует прокоагулянтной активности, вызывая активацию тромбоцитов (Regnault V. et al., 2003). Таким образом, ИЛ-6 и -8 изменяют профили свертывания и вызывают гиперактивацию тромбоцитов.

Поскольку разрушение тромбоцитов при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре ускоряется, предполагается, что уровни тромбопоэтических факторов в сыворотке крови у таких пациентов повышены. В литературных данных показано, что у пациентов с ИТП наблюдаются повышенные эндогенные уровни ИЛ-6 и -11 (Hou M. et al., 1998; Cremer M. et al., 1999). Все исследования были проведены в сыворотке крови, и нет данных о количестве цитокинов в миелоплазме.

Как видно из таблицы 27, мы обнаружили значимо более высокий уровень ИЛ-6 в миелоплазме ($p < 0,05$), при этом количество ИЛ-6 в плазме не превышало референсных величин. В то же время значимых различий миелоплазменных и плазменных показателей ИЛ-6 между ИТП и группой сравнения не обнаружено.

Миелоплазменные и плазменные уровни ИЛ-8 у пациентов с ИТП имеют высокие значения, медиана составила 59,1 пг/мл и 48,57 пг/мл соответственно. В группе сравнения показано, что в плазме ИЛ-8 находится в пределах референсных величин (медиана составила 5,78 пг/мл), тогда как в миелоплазме – в разы выше (медиана – 118,72 пг/мл, $p < 0,001$).

Таблица 27.

Цитокиновый профиль миелоплазмы пациентов с ИТП, Ме [25%, 75%]

Наименование	Миелоплазма ИТП (n=92)	Плазма ИТП (n=92)	<i>p</i> ИТП	Миелоплазма группа сравнения (n=22)	Плазма группа сравнения (n=22)	<i>p</i> Группа сравнения
Интерлейкин-6, пг/мл	8,96 [4,44-25,80]	2,11 [1,85-4,88]	0,012	8,64 [6,76-18,43]	3,65 [2,09-10,02]	0,035
Интерлейкин-8, пг/мл	59,10 [34,09-234,35]	48,57 [6,54-217,94]	0,650	118,72 [48,42-271,08]	5,78 [3,26-12,44]	0,0004
Эритропоэтин, пг/мл	80,24 [44,88-123,36]	136,33 [72,63-244,14]	0,069	81,32 [58,12-127,24]	604,56 [111,06-1642,68]	0,009
Фактор роста эндотелия сосудов, пг/мл	168,54 [75,23-240,67]	137,28 [48,63-199,96]	0,211	208,62 [102,87-430,75]	47,40 [32,47-141,91]	0,008

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

Как известно, эритропоэтин (ЭПО) – физиологический стимулятор эритропоэза, но также доказано, что ЭПО действует далеко за пределы эритропоэза: подавляет провоспалительные цитокины, защищает клетки от апоптоза и способствует заживлению ран (Peng W. et al., 2020). В том числе действие эритропоэтина доказано и на мегакариопоэз. Так, ЭПО увеличивает синтез ДНК и активирует ацетилхолинэстеразу в мегакариоцитах, что приводит к активации цитоплазматических процессов и образованию протромбоцитов (An E. et al., 1994; Giandomenico S.D. et al., 2020).

Наши данные показывают сходные уровни эритропоэтина в миелоплазме у пациентов с ИТП и в группе сравнения, медиана составила 80,24 пг/мл и 81,32 пг/мл соответственно для сопоставляемых групп. В периферической крови выявлены значимые отличия ($p=0,005$) по уровню ЭПО: так, у пациентов с ИТП медиана составила 136,33 пг/мл, что соответствует референсным величинам, тогда как в группе сравнения, в которую вошли пациенты с железодефицитной анемией, эритропоэтин был повышен и составил 604,56 пг/мл. Таким образом, мы

снова видим, как и с количеством трансферрина в миелоплазме, что уровень ЭПО в интерстициальной жидкости костного мозга в двух сравниваемых группах практически одинаков, тогда как в плазме этих пациентов имеются значимые различия.

Фактор роста эндотелия сосудов VEGF (теперь обозначаемый как VEGF-A) является членом семейства белков, включая VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (Ferrara N. and Adamis A.P., 2016). Передача сигналов VEGF осуществляется через 2 вида тирозинкиназных рецепторов – VEGF-R1 и VEGF-R2. VEGF регулирует активность нескольких киназ и в конечном итоге определяет пролиферацию, миграцию, выживание и проницаемость сосудов во время васкулогенеза и ангиогенеза (De Vock K. et al., 2013; Potente M. et al., 2011).

Образование мегакариоцитов из гемопоэтических стволовых клеток осуществляется в эндостальной нише костного мозга, тогда как мегакариопоэз и тромбоцитообразование – в сосудистой нише (Machlus K.R., Italiano J.E.Jr., 2013), следовательно, мегакариоцитам необходимо мигрировать в сосудистую нишу для тромбоцитообразования (Dhanjal T.S. et al., 2007). Показано, что VEGF через VEGF-R1 усиливает экспрессию CXCR4 в мегакариоцитах и способствует миграции их в сосудистую нишу (Wang M. et al., 2019). Количество VEGF в миелоплазме у пациентов с ИТП несколько ниже, чем в группе сравнения (168,54 пг/мл и 208,62 пг/мл), что, вероятно, объясняет снижение количества мегакариоцитов в сосудистой нише костного мозга при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре.

5.2. Особенности состава миелоплазмы при хронической форме идиопатической тромбоцитопенической пурпуры

При сравнении группы «острые» с хроническим течением идиопатической тромбоцитопенической пурпуры выявлены следующие особенности состава миелоплазмы. Количество железа в миелоплазме у пациентов с хроническим течением ИТП имеет более высокое значение, чем в группе «острые». Так, медиана уровня железа в миелоплазме при хронической форме течения ИТП

составила 9,0 мкмоль/л, а в группе «острые» – 7,2 мкмоль/л. В периферической крови тенденция приобретает обратный характер: хроническое течение – медиана 6,8 мкмоль/л, в группе «острые» – 18,05 мкмоль/л ($p=0,057$).

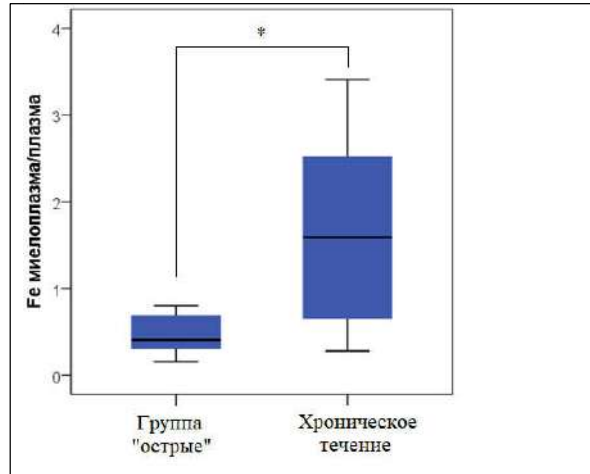


Рисунок 33 – Соотношение железа в миелоплазме и плазме пациентов с разным течением ИТП

Как видно из рисунка 33, соотношение миелоплазменного и плазменного уровня железа у пациентов с хроническим течением ИТП значительно выше ($p<0,05$).

Значимые различия выявлены и в уровне ферритина в периферической крови (рисунок 34). При хронической форме ИТП межквартильный разброс значений составил 27,15-85,80 мкг/л, а в группе «острые» – 62,0-262,0 мкг/л ($p<0,05$).

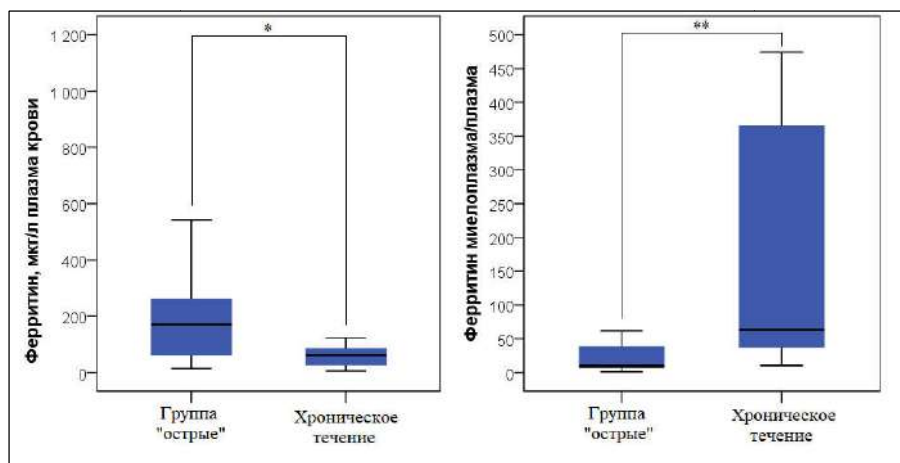


Рисунок 34 – Распределение ферритина в плазме крови и соотношение ферритина в миелоплазме к плазме крови пациентов с разным течением ИТП

Таким образом, в периферической крови при хроническом течении ИТП количество ферритина значительно ниже, тогда как в миелоплазме имеется противоположная тенденция. При хронической форме чаще встречаются более высокие уровни ферритина в интерстициальной жидкости костного мозга. Это нашло отражение в значимых различиях соотношений количества ферритина в миелоплазме и плазме при разном типе течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (рисунок 35). Разброс значений составил в группе «острые» – 7,1-38,29, при хроническом течении – 31,59-373,03 ($p=0,009$).

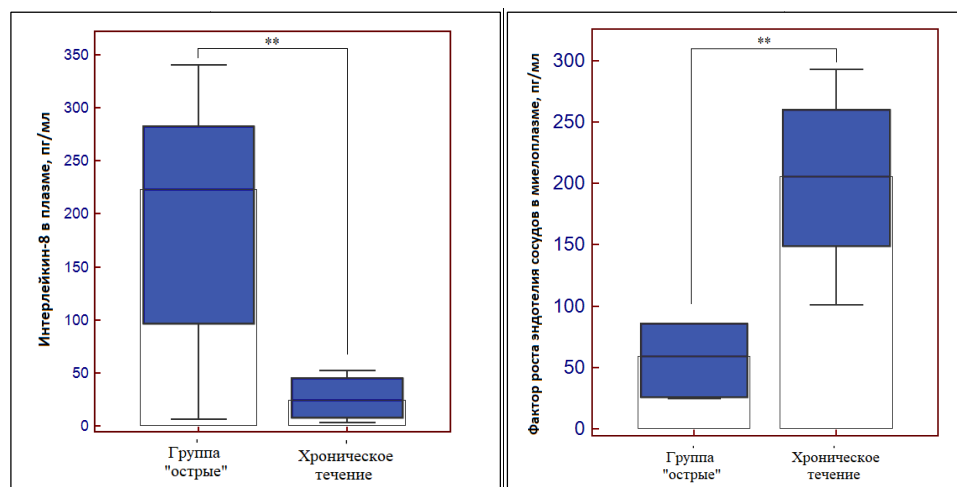


Рисунок 35 – Распределение интерлейкина-8 в плазме крови и VEGF в миелоплазме пациентов с разным течением ИТП

Цитокиновый профиль также показал различия при разном типе течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Значимыми оказались уровни интерлейкина-8 в плазме и фактора роста эндотелия сосудов в миелоплазме (рисунок 33). При хронической форме ИТП уровень интерлейкина-8 в плазме составил 6,32-48,56 пг/мл, тогда как в группе «острые» значительно выше – 96,61-282,55 пг/мл ($p<0,01$). Распределение VEGF в миелоплазме было обратным. При хронической форме уровень фактора роста эндотелия сосудов значительно выше по сравнению с группой «острые». Так, межквартильный разброс значений при хроническом течении ИТП составил 148,97-259,95 пг/мл и, соответственно, в группе «острые» – 25,48-70,4 пг/мл ($p<0,01$).

Таким образом, изучение состава миелоплазмы открывает нам перспективы поиска диагностических маркеров основного заболевания и предикторов его течения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Течение и клинические особенности идиопатической тромбоцитопенической пурпуры отличаются у детей и взрослых. Например, у детей заболевание чаще всего начинается остро и провоцирующим фактором неоднократно выступает перенесенная инфекция или иммунизация. В то же время для взрослых характерно преимущественно скрытое начало ИТП и частое развитие хронического течения. Клиническая картина ИТП детей отличается выраженными проявлениями (кожными геморрагиями, кровотечениями), тогда как у взрослых наблюдается разнообразие симптоматики от полностью бессимптомного течения до тяжелого (Петров В.Ю., Плахута Т.Г., 2006). Часто при лечении ИТП у детей с симптомами средней тяжести назначают выжидательную тактику лечения. В некоторых случаях это может привести к хронизации идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (Петров В.Ю. и др., 2009), а развитие хронической формы идиопатической тромбоцитопенической пурпуры значительно ухудшает качество жизни пациента. Таким пациентам показано резкое ограничение двигательного режима, прекращение занятий спортом. На сегодняшний день данная форма считается неизлечимой, частота рецидивов может варьировать от редких эпизодов до непрерывного тяжелого течения. В начале терапии является важным оценивать риски хронизации ИТП, что дает клиницистам обоснование к более раннему переходу на препараты второй линии терапии, а также позволит снизить длительность приема глюкокортикостероидов и, соответственно, развитие побочных явлений терапии. Таким образом, необходимо ввести оценку прогноза риска развития хронической формы ИТП для детей и взрослых.

На первом этапе было проведено подробное изучение показателей миелограмм и мегакариоцитограмм костного мозга, биохимический и гемостазиологический анализ сыворотки и плазмы, а также общий анализ крови пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой.

Выявленные изменения миелограммы при ИТП касаются увеличения количества лимфоцитов (9,2-16,9%, $p<0,05$) и мегакариоцитов в костном мозге (17-61 шт на 250 полей зрения, $p<0,05$). При ИТП низкое количество тромбоцитов индуцирует компенсаторное увеличение количества мегакариоцитов в костном мозге, что проявляется обнаруженной гиперплазией мегакариопоэза. Больше данных показало исследование мегакариоцитарной формулы (рисунок 36). Так, при ИТП увеличено количество базофильных мегакариоцитов (5,0-18,5%, $p<0,01$), тогда как уровни полихроматофильных (32,5-48,0%, $p<0,001$) и оксифильных форм (9,0-23,5%, $p<0,001$) ниже. Таким образом, наблюдается задержка созревания мегакариоцитарного ростка. С одной стороны, выявлены изменения в мегакариоцитарном ростке, указывающие на усиление процесса тромбоцитопоэза: часто встречаются «голаядерные» мегакариоциты (11,5-28,5%, $p<0,001$), явление эмпериполеза (2,0-6,0%, $p<0,01$), пластинкообразование начинается более рано – с созревающих базофильных форм.

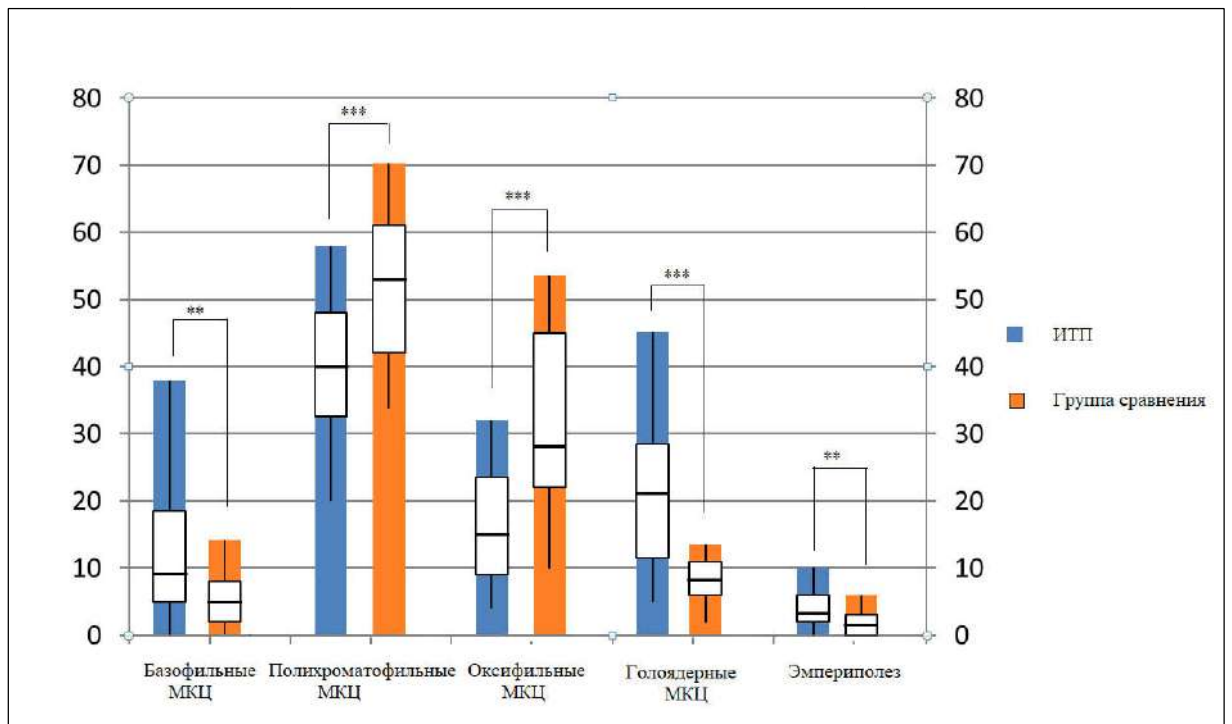


Рисунок 36 – Изменения популяций созревающих мегакариоцитов при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре

Здесь и далее в заключении значения представлены в виде медианы и межквартильных разбросов, * - при $p<0,05$, ** - при $p<0,01$, ***- при $p<0,001$

С другой стороны, нарастают морфологические изменения мегакариоцитов вплоть до появления признаков диспоэза (рисунок 37): увеличены инволютивные формы (1,0-4,0%, $p<0,05$), обнаружены микроформы (1,0-8,0%, $p<0,001$), большую часть составляют мегакариоциты с гипогранулированной цитоплазмой (20,0-37,0%, $p<0,0001$), значительно снижено количество пластинкообразующих мегакариоцитов (3,0-17,0%, $p<0,001$). Фактически, сочетание всех выявленных признаков указывает на неэффективный тромбоцитопоз.

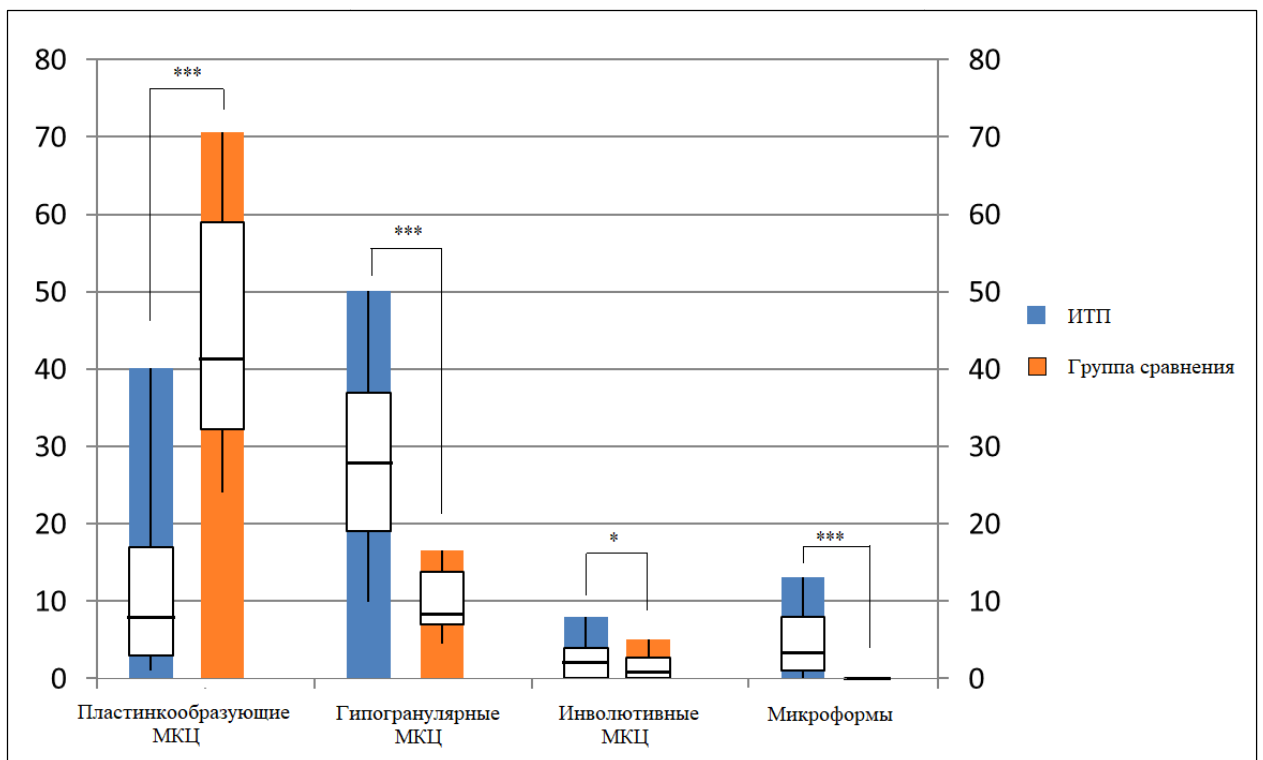


Рисунок 37 – Изменения количества пластинкообразующих мегакариоцитов и форм диспоэза при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре

В периферической крови при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре изменения в основном касались тромбоцитарных параметров. Так, количество тромбоцитов и тромбоциты были значительно снижены (медиана PLT – $24,5 \cdot 10^9/\text{л}$, PCT – 0,07%, $p<0,001$), а средний объем тромбоцитов и показатель анизоцитоза тромбоцитов увеличены (медиана MPV – 11,5 фл, PDW – 22,3%, $p<0,001$). Проведенный корреляционный анализ между параметрами мегакариоцитов костного мозга и тромбоцитов периферической крови показал,

что MPV и PDW отражают мегакариопоз и имеют диагностическое значение при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре.

Известно, что костномозговое кроветворение претерпевает изменения с детского возраста и до старения организма. В онтогенезе постепенно снижается пролиферативная активность костного мозга, количество макрофагов, изменяются соотношения субпопуляций лимфоцитов (Rego E.M. et al., 1998; Ogawa T. et al., 2000). Возраст обследуемых пациентов в нашем исследовании варьировал от 0 до 90 лет, поэтому на втором этапе работы была изучена вариабельность показателей костного мозга и периферической крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой в отдельных возрастных группах.

Мы установили, что возрастной фактор дает значимые различия показателей миелограммы при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре (рисунок 38).

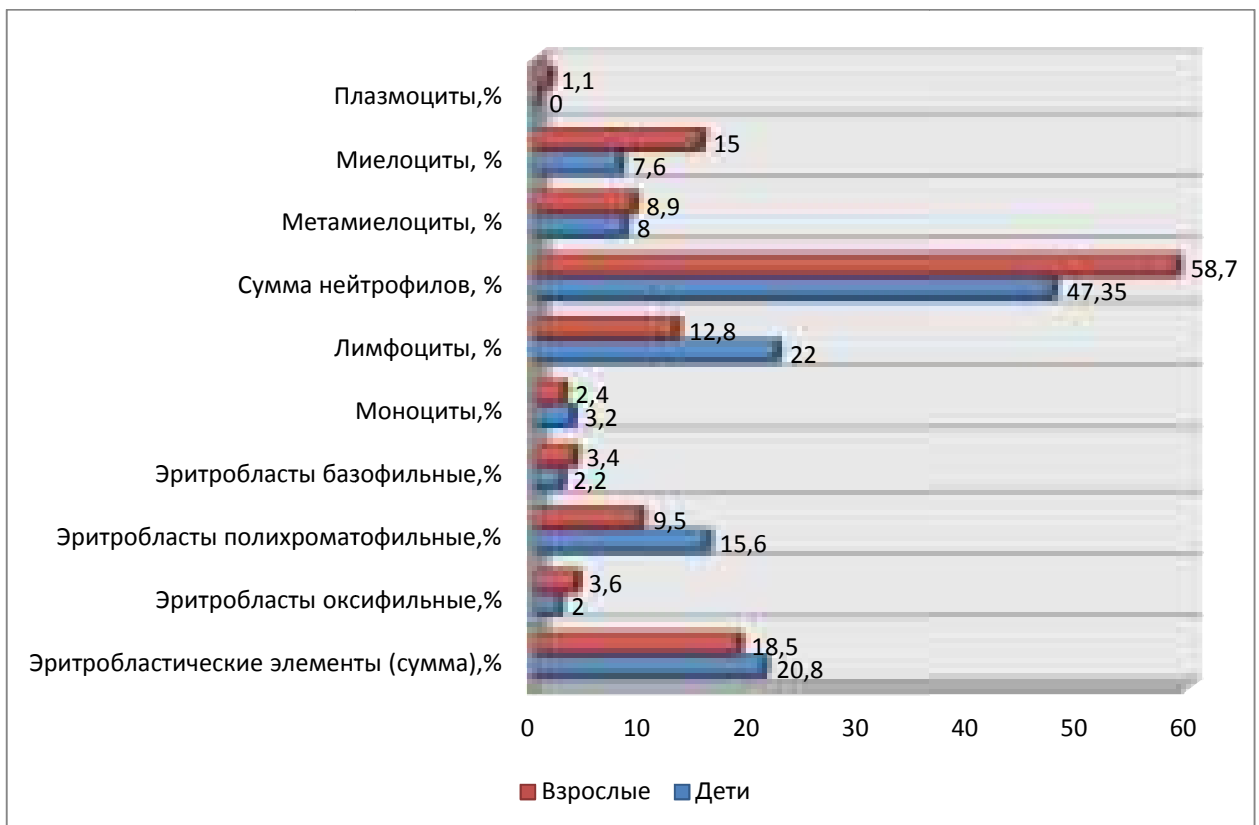


Рисунок 38 – Возрастные отличия показателей миелограммы у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

У детей клеточность пунктата выше, и чаще встречаются клетки стромы. Наиболее многочисленную группу в костном мозге составляют нейтрофильные элементы, но у взрослых суммарно количество нейтрофилов значимо выше (51,6-64,8%), чем у детей (38,0-54,6%, $p<0,001$). У взрослых более развитым и представленным оказывается пролиферирующий пул гранулоцитов. Так, количество нейтрофильных и эозинофильных миелоцитов значимо выше (миелоциты нейтрофильные у детей – 5,6-10,4%, у взрослых – 10,75-21,6%, $p<0,001$). Еще одной особенностью миелограммы у детей при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре является то, что базофилы и плазматические клетки встречаются единично, и их медианы равны нулю. Тогда как у взрослых количество этих клеток небольшое, но постоянное (медиана плазмоцитов – 1,1%, базофилов – 0,2%, $p<0,001$). Количество лимфоцитов в костном мозге значимо выше у детей (16,65-27,9%), у взрослых колебания лимфоцитов были в пределах 9,2-16,9% ($p<0,001$). Моноцитарный росток расширен в детской группе. Наиболее близко распределились данные, касающиеся эритроидного ростка. Суммарное количество эритробластических элементов не показало значимых различий. Выявленные изменения касались различных субпопуляций эритробластов, но все они находились в пределах референсных значений. Таким образом, обнаруженные различия в показателях миелограммы у детей и взрослых при ИТП коснулись всех ростков кроветворения, кроме эритроидного.

Так, мегакариоцитарный росток показал максимальные различия при описании мегакариоцитограмм (рисунок 39). Количество мегакариоцитов на 250 полей зрения значимо выше у детей (медиана у детей составила 71,0 и у взрослых – 37,0, $p<0,001$), в мегакариоцитарной формуле у них преобладают базофильные мегакариоциты (41,0% – у детей и 9,0% – у взрослых, $p<0,001$), а у взрослых – полихроматофильные (37,0% – у детей и 40,0% – у взрослых, $p=0,03$). Таким образом, задержка созревания мегакариоцитов присутствует в двух сравниваемых группах, но у детей имеет более выраженный характер. Наличие «голоядерных» мегакариоцитов у взрослых является постоянным признаком, у детей эти формы единичны (медиана у детей – 3%, у взрослых – 21,0%, $p<0,001$). У взрослых чаще

встречаются инволютивные мегакариоциты (в 78% случаев – у взрослых, в 56% – у детей, $p<0,001$) и признаки диспоза мегакариоцитарного роста. Так, у взрослых количество микроформ выше, и чаще встречаются мегакариоциты с множеством ядер. В то же время обнаружено значительно высокое количество гипогранулярных форм мегакариоцитов в детской группе (у детей медиана составила 62,0%, у взрослых – 27,0%, $p<0,001$). Количество пластинкообразующих и пластинкосодержащих форм у детей значимо ниже (пластинкообразующие у детей – 2,0-8,0%, у взрослых – 3,0-17,0%; пластинкосодержащие у детей – 16,0-30,0%, у взрослых – 22,0-38,0%, $p<0,001$). Таким образом, выявлено нарушение тромбоцитобразования в костном мозге при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре в двух сравниваемых группах, но у детей оно имеет более выраженный характер.

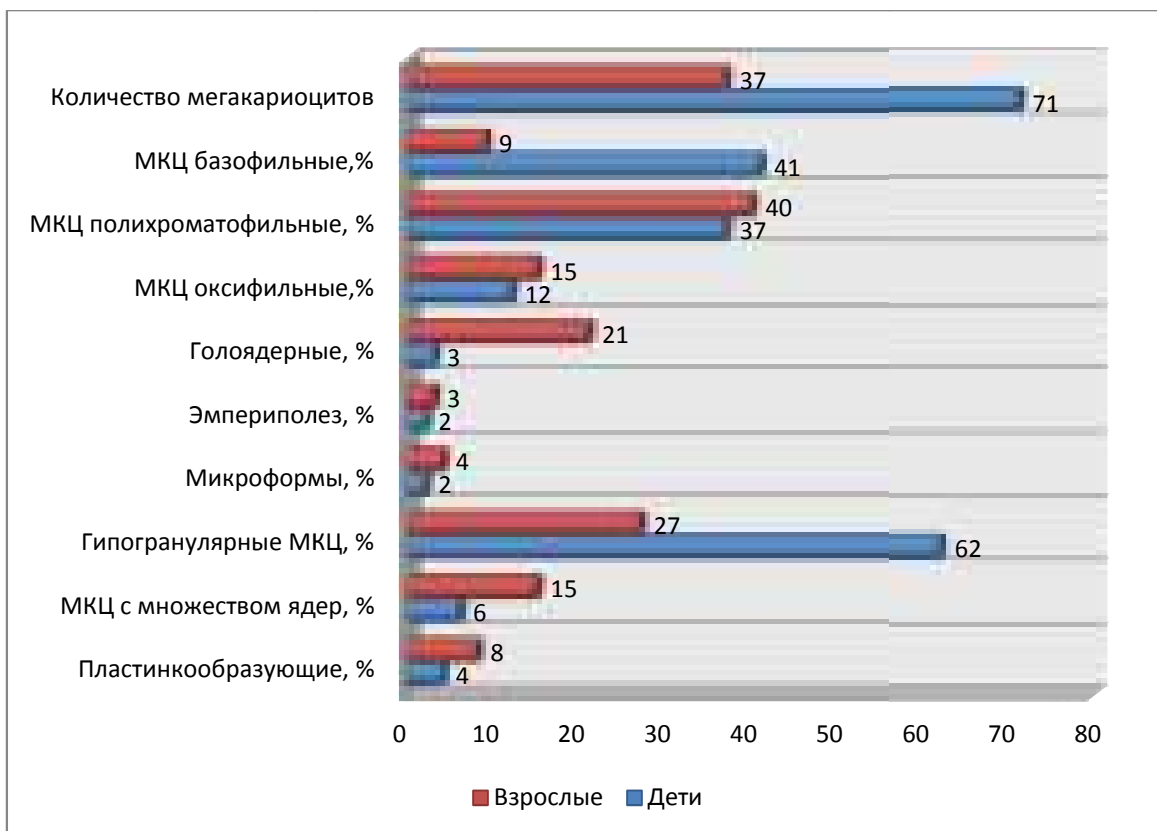


Рисунок 39 – Возрастные отличия показателей мегакариоцитарной формулы у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Анализируя показатели мегакариоцитарной формулы в целом, мы выделили изменения мегакариоцитограмм в два типичных варианта. 1 тип мегакариоцитограммы отличается преобладанием незрелых и созревающих форм мегакариоцитов, 2 тип характеризуется увеличением «голаядерных» и полихроматофильных форм с малым количеством или полным отсутствием пластинкообразующих мегакариоцитов. Среди пациентов с ИТП 1 тип изменений мегакариоцитограммы встречался у 25,7% (рисунок 40), 2 тип – у 54,1%, в то же время мегакариоцитограммы без значительных изменений составили приблизительно пятую часть всех обследуемых пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой ($p < 0,0001$).



Рисунок 40 – Распределение типов мегакариоцитограмм у пациентов с ИТП

Мы провели изучение влияния нескольких факторов на распределение типов мегакариоцитограмм, такие как характер течения, выраженность клинических проявлений, пол и возраст, при этом значимые различия опять продемонстрировал возрастной фактор (рисунок 41).

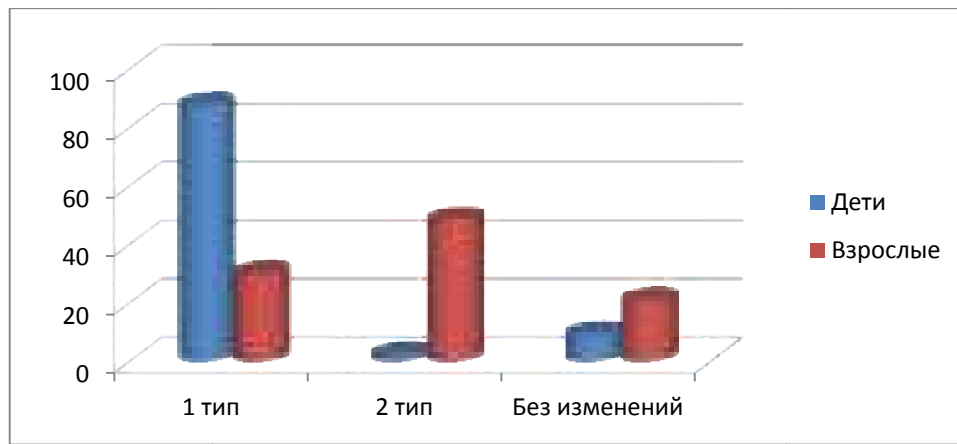


Рисунок 41 – Распределение типов мегакариоцитогамм у пациентов с ИТП взрослого и детского населения

У детей основным становится первый тип мегакариоцитогаммы (в 88% случаев), у взрослых самым распространенным становится 2 тип (48,6% случаев, $p < 0,0001$). Также среди взрослого контингента чаще встречаются мегакариоцитарные формулы без отклонений (21,1% случаев у взрослых, 9,6% – у детей). Таким образом, 1 тип мегакариоцитогаммы можно охарактеризовать как «детский тип», а 2 тип – как «взрослый тип».

В периферическом отделе при ИТП обнаружены различия в эритроцитарном и тромбоцитарном звене в зависимости от возрастного фактора. У детей количество эритроцитов и гемоглобина ниже ($p < 0,01$), объем эритроцитов, гематокрита и МСН более низкий, а МСНС – более высокий ($p < 0,001$). У взрослых эритроциты имеют более высокий показатель анизоцитоза ($p < 0,001$). Степень тромбоцитопении у детей с ИТП более выражена ($p = 0,01$) и значение тромбокрита более низкое ($p < 0,001$). У взрослых средний объем тромбоцитов и показатель анизоцитоза тромбоцитов выше референсного значения, тогда как у детей они соответствуют возрастным нормам ($p < 0,001$).

Таким образом, выявлены существенные различия у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой в зависимости от возрастного фактора, что делает невозможным дальнейшее рассмотрение групп детского и взрослого населения вместе для выявления предикторов хронического течения

ИТП. Однако простого разделения на группы детского и взрослого возраста недостаточно, чтобы отследить те физиологические процессы, которые приводят к изменениям кроветворения как в организме ребенка в процессе взросления, так и у взрослых при достижении зрелости и дальнейшем старении организма. Мы разделили детскую группу на 6 подгрупп (Крылов А.А., 2005), взяв за основу возрастную периодизацию онтогенеза, а взрослое население – на 4 подгруппы.

Между группами детского населения были выявлены значимые отличия в нескольких ростках кроветворения (рисунок 42). Так, нейтрофильный росток постепенно нарастает к юношескому возрасту за счет созревающего пула, показывая минимальное значение в грудном возрасте (медиана – 35,6%) и максимальное в юношеском (медиана – 52,6%, $p < 0,01$).

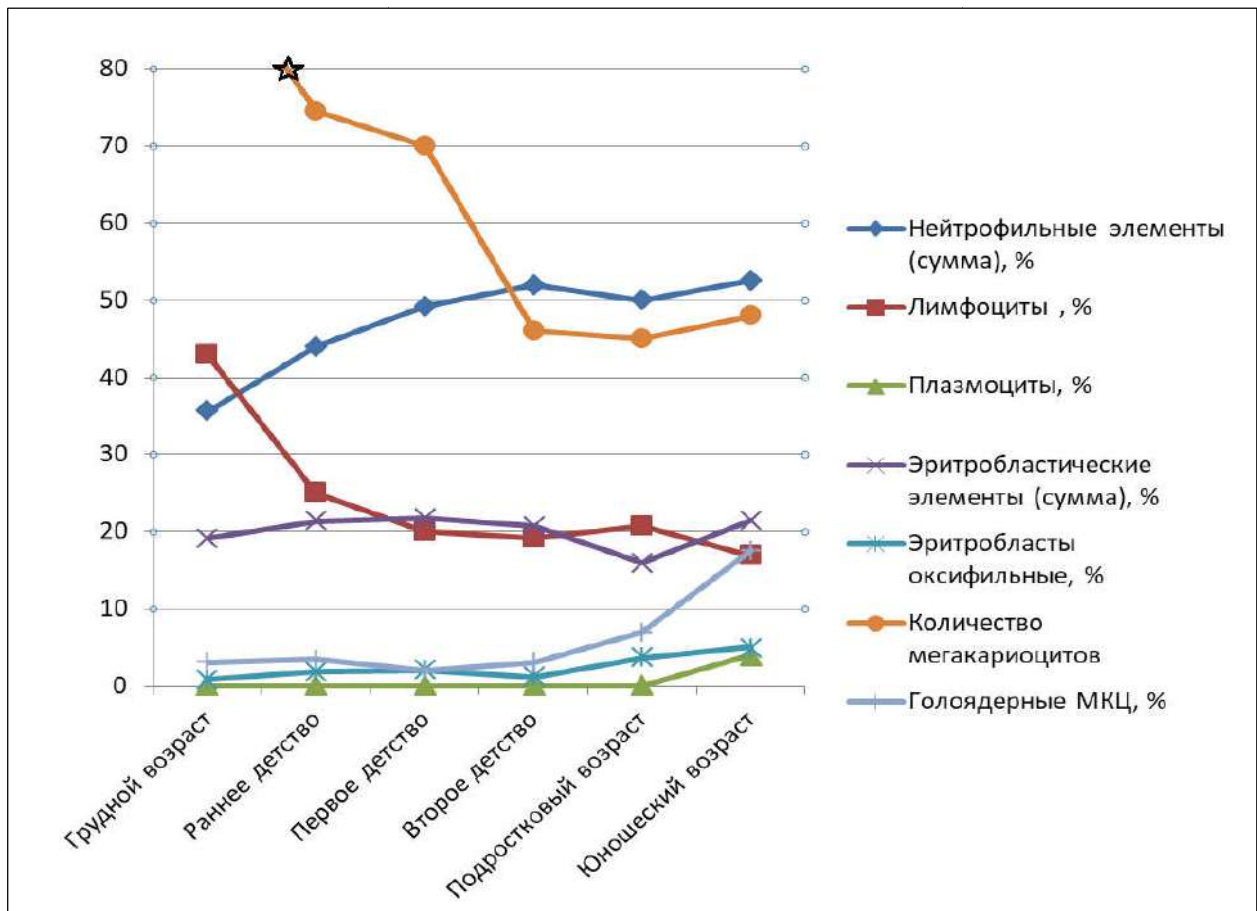


Рисунок 42 – Изменения показателей миелограммы и мегакариоцитарной формулы среди групп детского населения у пациентов с ИТП

Лимфоцитарный росток имеет обратную тенденцию: сначала максимальное значение в грудном возрасте (медиана – 49,2%) и минимальное в юношеском (медиана – 16,9%, $p=0,001$). Плазматические клетки у детей младших возрастов либо не обнаруживаются совсем, либо единичны. В юношеском периоде количество плазмоцитов достигает постоянных значений, которые приближены к показателям взрослого населения. Суммарное количество эритробластических элементов показало стабильные результаты в разные периоды детского возраста, отличия выявлены в процессах созревания этого ростка. Осуществление энуклеации эритробластов у детей происходит преимущественно на полихроматофильной стадии (Nandakumar S.K. et al., 2016), что приводит к низкому содержанию оксифильных форм в костном мозге. В период юности их количество достигает максимального значения, приближая созревание эритроидного ростка в этом периоде к взрослому типу. Количество мегакариоцитов в костном мозге у детей с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой максимально увеличено в грудном возрасте (медиана – 225,5, $p<0,05$), их количество постепенно снижается к юношескому периоду (медиана – 57,0). Такая же тенденция сохранена и с базофильными формами мегакариоцитов. Таким образом, с увеличением возраста ребенка наблюдается снижение степени задержки созревания мегакариоцитов. Также в юношеском периоде наблюдается самое высокое количество «голаядерных» форм мегакариоцитов, как мы наблюдали и во взрослой группе.

В периферическом звене у детей с ИТП возрастной фактор оказывает влияние на лейкоцитарное и эритроцитарное звено. Количество лейкоцитов максимально в грудном возрасте и постепенно снижается к юношескому периоду. Количество эритроцитов и гематокрит, наоборот, с возрастом нарастают, также как MCV и MCH.

Тромбоцитарные параметры у детей с ИТП показали стабильные значения, мы провели сравнительный анализ в группе «острые» и при хронической форме идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (таблица 28).

Тромбоцитарные параметры периферической крови детей с хроническим течением ИТП, Ме [25%, 75%]

Показатель	«Острые» (n=102)	Хронические (n=23)	Отличие, <i>p</i>
Тромбоциты (PLT), $\times 10^9/\text{л}$	14,5 [9,0-33,0]	28,0 [13,5-40,0]	0,04
Тромбокрит (PCT), %	0,029 [0,01-0,04]	0,03 [0,01-0,04]	0,72
Средний объем тромбоцитов (MPV), фл	10,25 [9,0-11,4]	10,05 [8,8-10,5]	0,46
Анизоцитоз тромбоцитов (PDW), %	15,65 [15,0-16,3]	15,60 [15,0-16,0]	0,59

Количество тромбоцитов значимо выше при хроническом течении ИТП у детей: так, в группе «острые» диапазон составил $9,0-33,0 \times 10^9/\text{л}$, а при хроническом течении – $13,5-40,0 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$). Мы использовали ROC-анализ, чтобы оценить прогноз диагностической эффективности выявленного предиктора (рисунок 43).

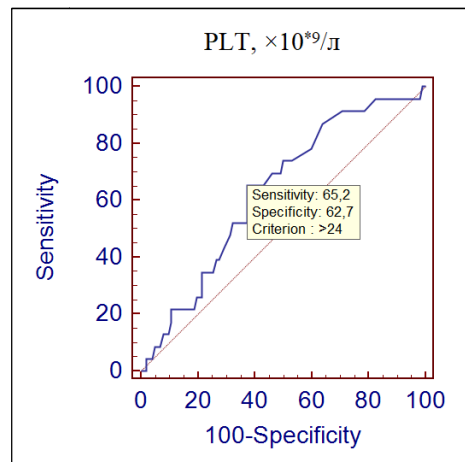


Рисунок 43 – ROC-кривая для прогноза диагностической эффективности показателя PLT между группой «острые» и хронической формы ИТП у детей

Площадь под ROC-кривой (AUC) в точке отсечения (Cutoff point) $>24,0 \times 10^9/\text{л}$ составила 0,632 ($p=0,50$), сам график имеет небольшое отклонение влево, что указывает на низкую прогностическую значимость параметра PLT в качестве предиктора хронической формы ИТП у детей.

Таким образом, возрастной фактор в детских группах значим при описании миелограммы, мегакариоцитограммы и ОАК, и для вычисления предикторов хронического течения ИТП необходимо проводить расчеты для каждого периода детского возраста, что затруднительно ввиду малочисленности этих групп. В группах взрослого населения, наоборот, не было выявлено значимых различий, что позволяет эту группу не разбивать при дальнейших расчетах. Также мы установили, что юношеский период детской группы показывает сходные значения с взрослым населением, поэтому может быть отнесен к последнему.

Гендерный фактор показал гораздо меньшее влияние на показатели миелограммы и периферической крови у пациентов с ИТП. В костном мозге значимыми были различия в лейко-эритробластическом соотношении. Так, у мужчин количество эритробластических элементов выше ($p<0,01$), что привело к увеличению количества эритроцитов, гемоглобина, гематокрита и в периферическом звене ($p<0,01$).

На следующем этапе нашего исследования мы распределили данные миелограммы, мегакариоцитограммы и общего анализа крови в зависимости от характера течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры с учетом всех изученных ранее факторов. Таким образом, юношеская и взрослые группы были распределены по характеру течения ИТП на группу «острые» и хроническую форму.

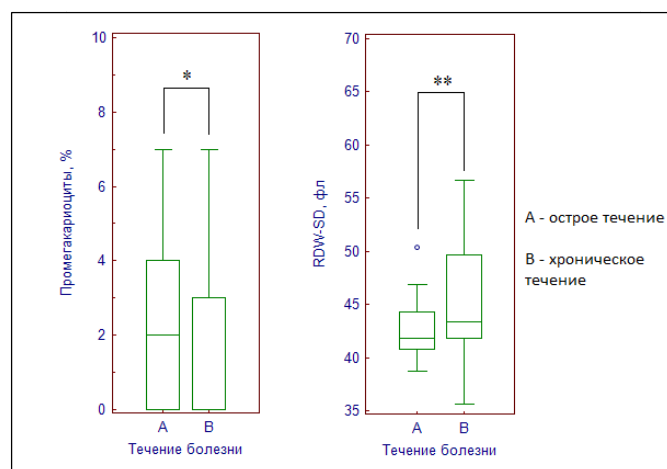


Рисунок 44 – Показатели мегакариоцитограммы и периферической крови с достоверными различиями у пациентов с хронической формой течения ИТП

В мегакариоцитарной формуле (рисунок 44) обнаружено, что в группе «острые» выше количество промегакариоцитов (в группе «острые» медиана – 2,0%, при хроническом течении – 0,0%, $p < 0,05$).

Данные общего анализа крови также мало отличались, выявленные значимые различия коснулись только показателя анизоцитоза эритроцитов по коэффициенту вариации RDW-CV. При хроническом течении эритроциты имеют более высокое значение RDW-CV (13,1-15,7%), чем при остром (12,9-13,6%, $p < 0,01$).

Таким образом, стандартные исследования костного мозга и периферической крови представили нам мало данных для поиска предикторов хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, что направляет наше исследование на поиски новых подходов в изучении костного мозга и нового биоматериала.

Дальнейший этап нашего исследования состоял в изучении состава интерстициальной жидкости костного мозга (миелоплазмы). Сначала была проведена валидация, так как нами были использованы тест-системы, созданные для работы с другими биологическими материалами. Проведя исследование белковых фракций (рисунок 45), мы обнаружили значимо более низкий уровень общего белка и альбумина с миелоплазме пациентов с ИТП ($p < 0,05$), в группе сравнения такая тенденция сохранилась, что может указывать на более низкое онкотическое давление в интерстициальной жидкости костного мозга. Количество $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -глобулинов в миелоплазме значимо выше в группе с ИТП ($p < 0,05$), при этом обнаружено снижение $\alpha 1$ -глобулиновой фракции в плазме периферической крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой ($p < 0,01$).

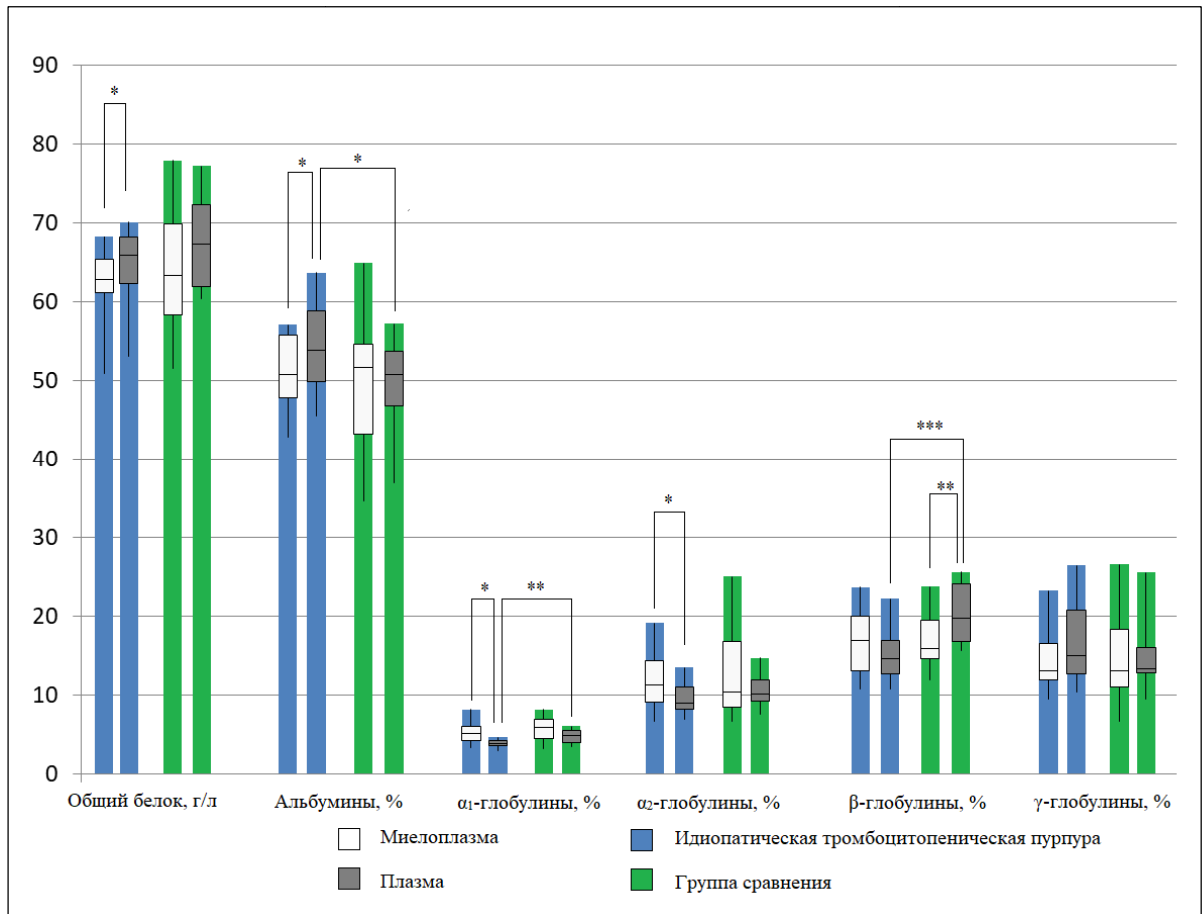


Рисунок 45 – Распределение белковых фракций в миелоплазме и плазме крови у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Выявлено более низкое количество β-глобулиновой фракции в плазме пациентов с ИТП ($p < 0,001$) при сопоставлении с группой сравнения, а также в миелоплазме сравниваемой группы по отношению к периферической крови ($p < 0,01$). Таким образом, большинство белковых фракций миелоплазмы существенно отличаются от периферической крови, поэтому мы включили в исследование определение некоторых отдельных белков в интерстициальной жидкости костного мозга.

Содержание железа в миелоплазме в сравниваемых группах имеет значимые различия (рисунок 46). У пациентов с ИТП значения составили 5,1-11,15 мкмоль/л, тогда как в группе сравнения уровни железа были более высокими (10,30-16,20 мкмоль/л, $p < 0,01$).

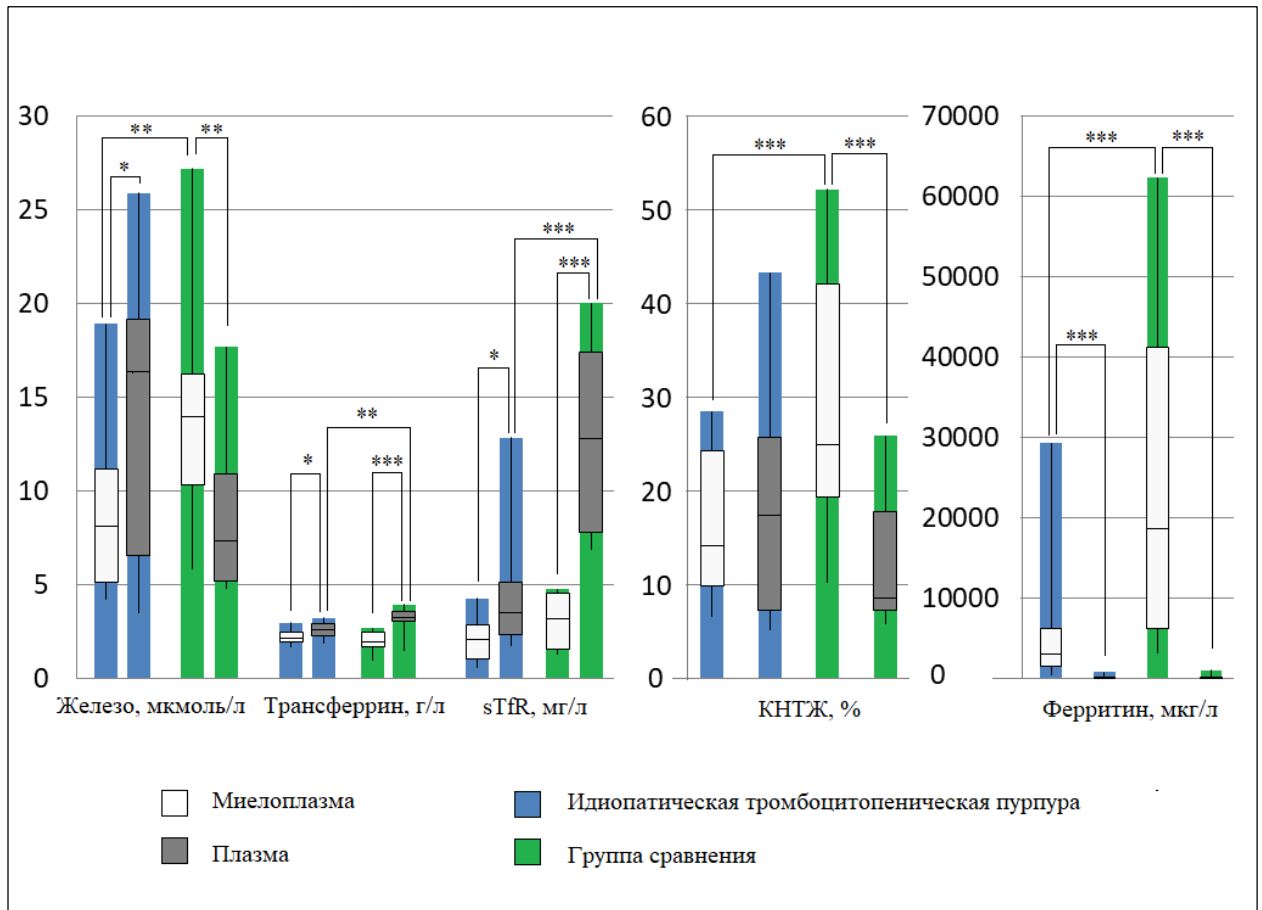


Рисунок 46 – Показатели обмена железа в миелоплазме и плазме крови пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

У пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой миелоплазменное значение содержания железа существенно ниже, чем в периферической крови ($p < 0,05$), тогда как в группе сравнения ситуация обратная ($p < 0,01$). Количество трансферрина в миелоплазме имеет стабильное содержание (1,71-2,44 г/л) и не зависит от плазменных значений, уровень sTfR в интерстициальной жидкости костного мозга достоверно ниже, чем в периферической крови, в то же время при ИТП снижение выявлено в 1,5 раза ($p < 0,05$), а в группе сравнения – в 2,8 раза ($p < 0,0001$). Выявлено снижение КНТЖ как в миелоплазме, так и в плазме у пациентов с ИТП. В группе сравнения, в которую отобраны пациенты с железодефицитной анемией, КНТЖ в интерстициальной жидкости костного мозга значительно отличается от плазменных значений ($p < 0,0001$). В периферической крови показатель снижен

(медиана – 7,8%), тогда как в миелоплазме составляет 23,7%. Содержание ферритина значительно выше в миелоплазме, у пациентов с ИТП оно превышает плазменные значения в 55 раз, а в группе сравнения – в 936 раз ($p<0,001$).

Таким образом, в миелоплазме создается своя особая микросреда, показатели обмена железа значительно отличаются от плазменных уровней. Так, у пациентов с ИТП уровень железа, трансферрина, sTfR и КНТЖ в интерстициальной жидкости костного мозга достоверно ниже, чем в периферической крови. В группе сравнения (у пациентов с железодефицитной анемией) уровень железа и КНТЖ в миелоплазме выше плазменных значений, тогда как трансферрин и sTfR – ниже. Количество ферритина в десятки и сотни раз выше.

Для оценки взаимосвязи между показателями обмена железа в миелоплазме и показателями мегакариопоэза использовалась ранговая корреляция Спирмена (таблица 29). В группе ИТП выявлена корреляция между количеством железа и выраженностью явления эмпериполеза мегакариоцитов ($R=0,490$, $p<0,05$), КНТЖ и голаядерными МКЦ ($R=0,538$, $p<0,05$), количеством ферритина и пластинкосодержащими формами МКЦ ($R=0,458$, $p<0,05$), а также отрицательная взаимосвязь уровня sTfR и количества пластинкообразующих форм МКЦ ($R=-0,541$, $p<0,05$).

В недавнем исследовании было показано, что дефицит железа в костном мозге приводит к замедлению клеточного цикла в мегакариоцитарно-эритроидных предшественниках и смещению дифференцировки в сторону мегакариоцитарной линии (Xavier-Ferrucio J. et al., 2019). Наше исследование не выявило взаимосвязи между количеством железа в миелоплазме и количеством мегакариоцитов в костном мозге, но было определено четкое влияние уровня железа на выраженность эмпериполеза при ИТП, приводящее к увеличению эффективности тромбоцитогенеза (Cunin P. et al., 2019; Cunin P., Nigrovic P.A., 2020).

Корреляционные взаимосвязи между показателями обмена железа в
миелоплазме и видами мегакариоцитов

Показатели			PLT	Всего мегакариоцитов	Незрелые мегакариоциты	Мегакариоциты базофильные	Мегакариоциты полихроматофиль- ные	Мегакариоциты оксифильные	Инволютивные мегакариоциты	Голоядерные мегакариоциты	
ИТП	Fe	R	0,200	-0,06	-0,399	-0,312	-0,007	-0,078	-0,152	0,433	
		p	0,426	0,788	0,101	0,206	0,977	0,755	0,546	0,073	
	Трансферрин	R	-0,061	0,055	-0,265	0,020	0,108	0,143	0,153	-0,272	
		p	0,803	0,821	0,272	0,934	0,659	0,560	0,532	0,259	
	sTfR	R	-0,121	-0,445	-0,082	0,108	-0,204	-0,352	-0,159	0,207	
		p	0,680	0,111	0,779	0,713	0,483	0,216	0,587	0,477	
	КНТЖ	R	0,128	-0,103	-0,185	-0,461	-0,094	-0,083	-0,038	0,538	
		p	0,625	0,693	0,477	0,062	0,718	0,749	0,883	0,026	
	Ферритин	R	0,117	0,000	-0,056	0,178	-0,016	-0,443	-0,353	0,424	
		p	0,622	0,997	0,813	0,452	0,944	0,050	0,126	0,062	
	Группа сравнения	Fe	R	-0,147	-0,275	0,188	0,094	-0,206	0,153	-0,103	0,084
			p	0,547	0,255	0,4418	0,702	0,396	0,533	0,674	0,732
Трансферрин		R	0,165	-0,142	-0,316	-0,307	-0,052	0,174	-0,226	0,402	
		p	0,499	0,562	0,186	0,201	0,831	0,477	0,352	0,087	
sTfR		R	0,244	0,340	-0,368	0,057	0,265	-0,046	0,089	-0,671	
		p	0,381	0,215	0,176	0,838	0,338	0,868	0,751	0,006	
КНТЖ		R	-0,309	-0,012	0,476	0,266	-0,019	-0,107	0,198	-0,191	
		p	0,212	0,961	0,045	0,286	0,938	0,674	0,432	0,446	
Ферритин		R	-0,119	0,076	0,285	-0,103	-0,076	0,090	0,005	-0,103	
		p	0,626	0,755	0,237	0,674	0,755	0,712	0,981	0,674	
Показатели			Дегенеративные мегакариоциты	Эмбриоплез	Микро- мегакариоциты	Мегакариоциты с множеством ядер	Типогранулярные мегакариоциты	Пластинкообра- зующие мегакариоциты	Пластинкосоде- ржащие мегакариоциты		
ИТП		Fe	R	-0,267	0,490	-0,244	-0,108	-0,250	-0,152	0,223	
	p		0,283	0,039	0,329	0,669	0,317	0,546	0,373		
	Трансферрин	R	0,443	-0,046	0,129	-0,128	0,105	-0,017	0,055		
		p	0,057	0,848	0,599	0,601	0,667	0,944	0,820		
	sTfR	R	0,206	0,178	0,055	0,449	0,305	-0,541	0,006		
		p	0,478	0,542	0,849	0,107	0,289	0,045	0,982		
	КНТЖ	R	-0,426	0,349	-0,275	-0,032	-0,353	-0,055	0,078		
		p	0,088	0,170	0,284	0,903	0,164	0,833	0,764		
	Ферритин	R	-0,013	0,012	0,077	0,334	-0,367	-0,188	0,458		
		p	0,956	0,959	0,744	0,150	0,111	0,426	0,042		
	Группа сравнения	Fe	R	0,329	-0,108	0,00	0,258	0,360	-0,344	0,277	
			p	0,169	0,659	1,00	0,285	0,130	0,149	0,251	
Трансферрин		R	-0,438	-0,167	0,00	-0,04	-0,349	-0,427	0,492		
		p	0,060	0,493	1,00	0,861	0,142	0,068	0,032		
sTfR		R	0,570	-0,013	0,00	0,248	0,086	0,420	-0,244		
		p	0,026	0,963	1,00	0,372	0,759	0,119	0,380		
КНТЖ		R	0,519	0,110	0,00	0,117	0,536	0,016	-0,164		
		p	0,027	0,663	1,00	0,644	0,021	0,948	0,514		
Ферритин		R	0,334	0,318	0,00	0,215	0,528	0,023	-0,242		
		p	0,162	0,184	1,00	0,376	0,020	0,923	0,318		

Примечание. Жирным шрифтом отмечены значения $p < 0,05$, указывающие на статистически значимые различия групп

Для диагностики идиопатической тромбоцитопенической пурпуры важным признаком является увеличение количества голоядерных форм, снижение пластинкообразующих и пластинкосодержащих форм мегакариоцитов. Выявленные корреляции между этими видами мегакариоцитов и белками обмена железа указывают на то, что железо играет непосредственную роль в тромбоцитобразовании, а также вероятны новые функции таких белков, как ферритин и трансферрин, в тромбоцитопозе.

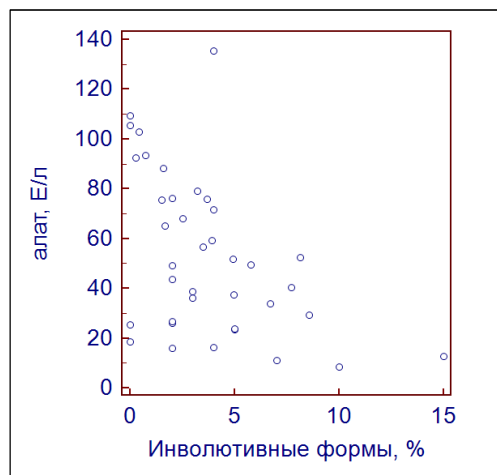


Рисунок 47 – Взаимосвязь активности АЛТ в миелоплазме и инволютивными формами мегакариоцитов у пациентов с ИТП

Активность АЛТ в миелоплазме пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой выше, чем в периферической крови ($p < 0,001$). Корреляционный анализ показал среднюю взаимосвязь между количеством мегакариоцитов и активностью АЛТ в миелоплазме ($R = 0,531$, $p = 0,016$), а также слабую отрицательную взаимосвязь с инволютивными формами мегакариоцитов ($R = -0,484$, $p = 0,035$) (рисунок 47). Таким образом, активность АЛТ в миелоплазме у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой может служить индикатором выраженности тромбоцитобразования (патент РФ № 2672471 «Способ оценки метаболической активности мегакариоцитарного ростка костного мозга»).

Уровень ИЛ-6 (рисунок 48) в миелоплазме более высокий в двух сравниваемых группах ($p<0,05$), количество ИЛ-8 в плазме у пациентов с ИТП имеет более высокое значение, чем в сопоставляемой группе ($p<0,01$). В группе сравнения количество ИЛ-8 в миелоплазме значительно выше, чем в плазме ($p<0,001$). Распределение эритропоэтина у пациентов с ИТП имеет схожие данные как миелоплазме, так и в плазме, значимую разницу значений показали данные периферической крови по отношению к группе сравнения ($p<0,01$), при этом миелоплазменные уровни ЭПО показывают стабильные значения, не зависящие от плазменных.

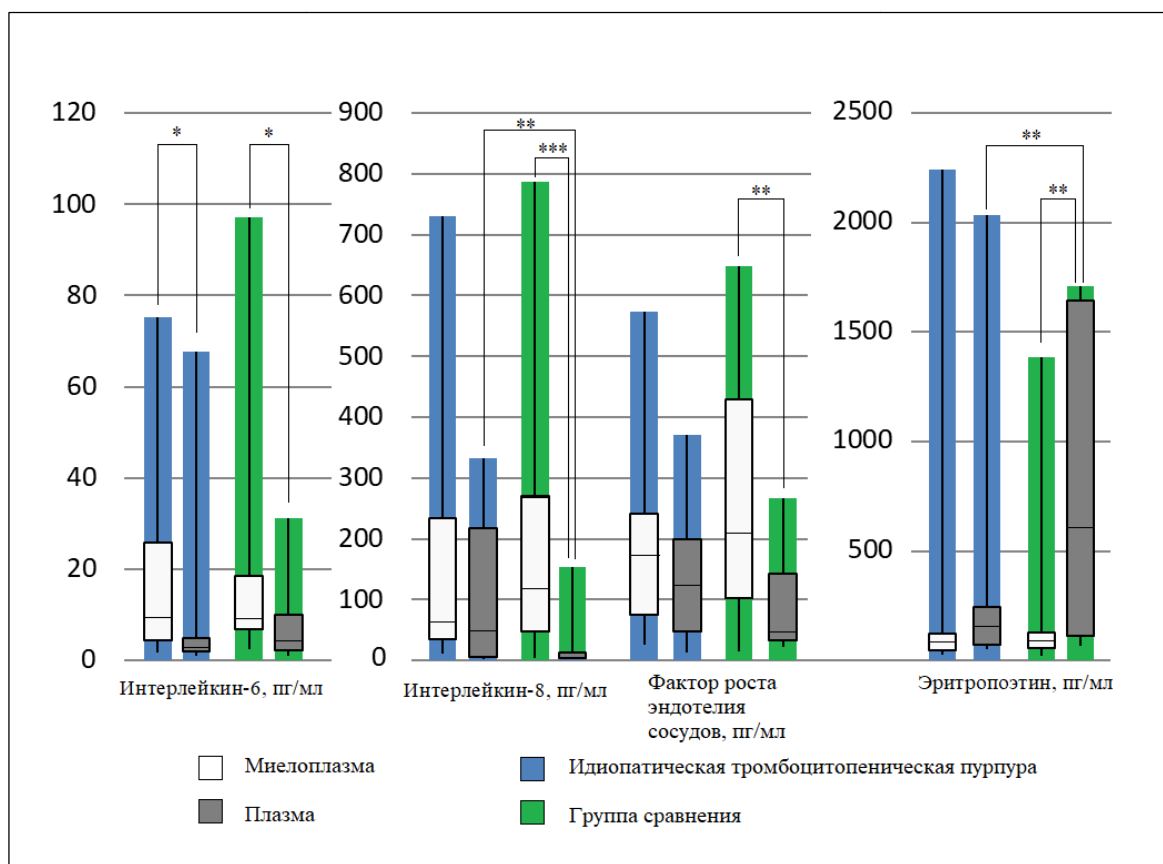


Рисунок 48 – Цитокиновый профиль миелоплазмы и плазмы крови пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Миелоплазменные уровни VEGF не показали различий в сравниваемых группах, значимые изменения были выявлены в группе сравнения между содержанием VEGF в интерстициальной жидкости костного мозга и периферической кровью ($p<0,01$).

Корреляционные взаимосвязи между уровнями цитокинов в миелоплазме и видами мегакариоцитов

Показатели			PLT	Всего мегакариоцитов	Незрелые мегакариоциты	Мегакариоциты базофильные	Мегакариоциты полихроматофильные	Мегакариоциты оксифильные	Инволютивные мегакариоциты	Голоядерные мегакариоциты
ИТП	Интерлейкин-6	R	0,268	-0,034	0,200	0,220	0,046	-0,244	-0,260	0,199
		p	0,334	0,903	0,475	0,430	0,869	0,318	0,350	0,478
	Интерлейкин -8	R	-0,168	0,170	-0,095	-0,275	0,294	-0,537	-0,395	0,704
		p	0,492	0,487	0,696	0,255	0,221	0,017	0,094	0,0008
	Эритропоэтин	R	0,382	-0,291	-0,067	0,253	-0,036	-0,253	-0,278	0,306
		p	0,096	0,213	0,777	0,281	0,879	0,282	0,234	0,189
	Фактор роста эндотелия сосудов	R	0,030	-0,101	-0,590	-0,464	-0,346	0,444	0,173	0,360
		p	0,907	0,700	0,012	0,060	0,174	0,074	0,507	0,155
Группа сравнения	Интерлейкин-6	R	0,118	0,246	0,018	0,693	0,495	-0,497	-0,081	-0,514
		p	0,675	0,377	0,948	0,004	0,060	0,059	0,773	0,050
	Интерлейкин -8	R	0,057	0,073	0,120	0,340	0,407	-0,538	0,078	0,079
		p	0,813	0,766	0,624	0,153	0,083	0,017	0,749	0,747
	Эритропоэтин	R	-0,104	-0,252	0,105	0,123	-0,264	0,216	0,115	-0,108
		p	0,673	0,298	0,669	0,617	0,275	0,374	0,640	0,659
	Фактор роста эндотелия сосудов	R	0,200	-0,055	0,093	0,589	0,191	-0,342	0,119	-0,156
		p	0,474	0,844	0,741	0,021	0,494	0,212	0,672	0,577
Показатели			Дегенеративные мегакариоциты	Эмбриополез	Микро-мегакариоциты	Мегакариоциты с множеством ядер	Гипогранулярные мегакариоциты	Пластинкообразующие мегакариоциты	Пластинкосодержающие мегакариоциты	
ИТП	Интерлейкин-6	R	-0,307	0,271	0,216	0,377	-0,271	-0,168	0,501	
		p	0,265	0,327	0,439	0,165	0,329	0,549	0,057	
	Интерлейкин -8	R	-0,138	-0,160	-0,044	-0,085	-0,656	0,130	0,134	
		p	0,572	0,513	0,858	0,729	0,002	0,596	0,583	
	Эритропоэтин	R	-0,008	0,346	0,190	0,538	-0,143	-0,210	0,421	
		p	0,970	0,134	0,421	0,014	0,546	0,374	0,064	
	Фактор роста эндотелия сосудов	R	-0,406	0,143	-0,328	-0,422	-0,199	-0,062	-0,113	
		p	0,105	0,583	0,198	0,091	0,442	0,811	0,666	
Группа сравнения	Интерлейкин-6	R	0,222	0,172	0,00	0,00	0,286	0,606	-0,483	
		p	0,427	0,541	1,00	1,00	0,300	0,016	0,068	
	Интерлейкин -8	R	0,258	0,164	0,00	-0,043	0,178	0,220	-0,270	
		p	0,287	0,501	1,00	0,861	0,466	0,364	0,264	
	Эритропоэтин	R	0,190	-0,145	0,00	0,129	-0,342	-0,053	0,278	
		p	0,436	0,554	1,00	0,598	0,151	0,826	0,249	
	Фактор роста эндотелия сосудов	R	0,002	-0,055	0,00	-0,247	0,489	0,415	-0,411	
		p	0,994	0,844	1,00	0,373	0,064	0,124	0,127	

Примечание. Жирным шрифтом отмечены значения $p < 0,05$, указывающие на статистически значимые различия групп

Проведенный корреляционный анализ в группе с ИТП (таблица 30) показал наличие взаимосвязи между интерлейкином-8 и оксифильными мегакариоцитами ($R=-0,537$, $p<0,05$), гипогранулярными ($R=-0,656$, $p<0,01$) и голаядерными формами ($R=0,704$, $p<0,001$).

Доказано, что молодые мегакариоциты активно экспрессируют рецепторы к ИЛ-8 CCR8 (Majka M. et al., 2001), известна взаимосвязь снижения экспрессии ИЛ-8 с дисмегакариопозом (Kim H., Lee M.K., Kim H.R., 2019), но нет данных влияния интерлейкинов на процесс тромбоцитообразования. Выявленные нами корреляции подтверждают влияние ИЛ-8 на созревание мегакариоцитов (корреляция с оксифильными мегакариоцитами), процесс дисмегакариопоза (корреляция с гипогранулярными мегакариоцитами), но также демонстрируют новые, ранее не выявленные взаимосвязи с тромбоцитопозом (корреляция с голаядерными мегакариоцитами), которые необходимо изучить в дальнейшем.

Взаимосвязь в группе с ИТП также обнаружена между количеством эритропоэтина в миелоплазме и мегакариоцитами с множеством ядер ($R=0,538$, $p<0,05$), VEGF и незрелыми мегакариоцитами ($R=-0,590$, $p<0,05$).

Ранее было показано, что эритропоэтин действует через путь рецептора ЭПО-ЭПО на поздней стадии мегакариопоза и отвечает за продукцию тромбоцитов большого размера, в то время как путь TPO-Mpl способствует продукции тромбоцитов малого размера (Hasein-Bey-Abina S. et al., 2020). Также существует взаимосвязь между размером, плоидностью мегакариоцита и количеством, объемом образующихся тромбоцитов (Italiano J.E., Shivdasani R.A., 2003). Мегакариоциты с множеством ядер всегда отличаются гиперплоидией ядра и более крупным размером клетки, чем другие созревающие виды мегакариоцитов. Таким образом, корреляционная взаимосвязь эритропоэтина и мегакариоцитов с множеством ядер может, с морфологической точки зрения, объяснять реализацию эффектов ЭПО на мегакариоцитарную линию.

Показано, что VEGF может повышать экспрессию CXCR4 в мегакариоцитах, благодаря чему усиливается миграция их к сосудистой нише, где и происходит непосредственное тромбоцитообразование (Pitchford S.C. et al.,

2012). Определено, что при ИТП количество мегакариоцитов в сосудистой нише снижается, что приводит к нарушению процесса формирования протромбоцитов (Wang M. et al., 2019). Другие исследования показали, что концентрация VEGF в костном мозге снижена на мышинных моделях в 2,43 раза по сравнению со здоровой популяцией, и составляет $338,77 \pm 73,08$ пг/мл. Наши данные демонстрируют уровень в миелоплазме VEGF $235,21 \pm 61,83$ пг/мл у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой.

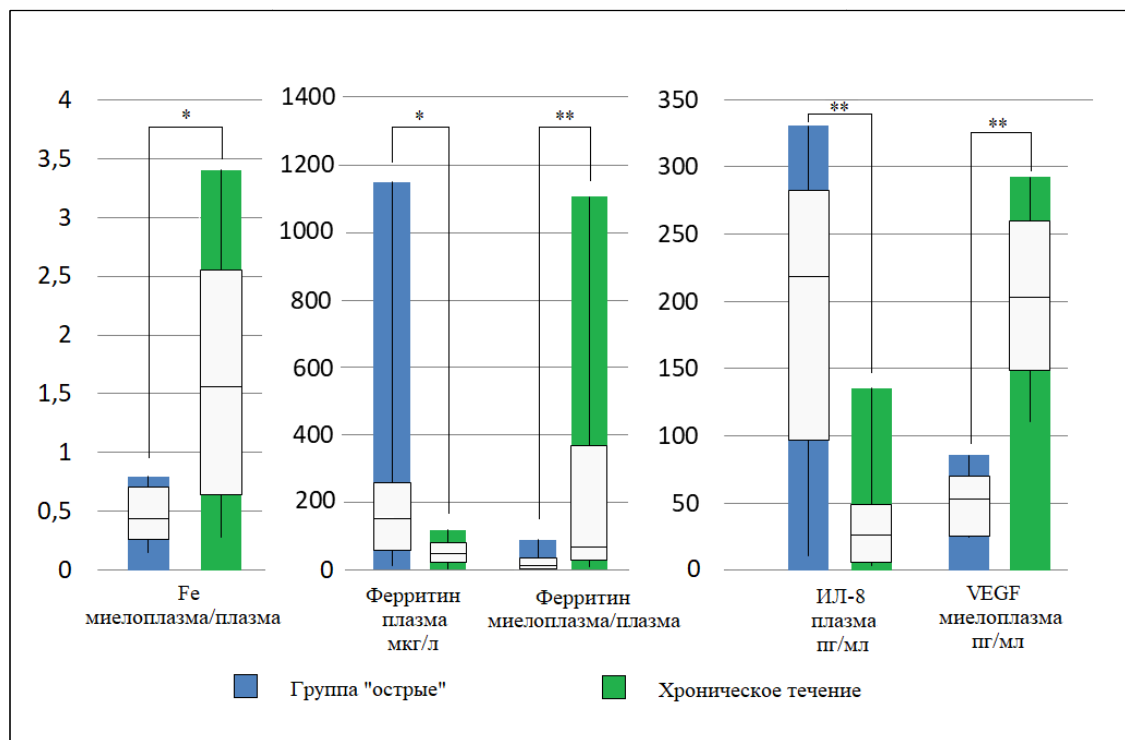


Рисунок 49 – Содержание анализов в миелоплазме и плазме пациентов в группе «острые» и с хроническим течением ИТП

В дальнейшем мы сравнивали миелоплазменные и плазменные показатели цитокинов и анализов у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой в зависимости от характера течения заболевания (рисунок 49). При хронической форме ИТП отношение количества железа миелоплазмы к плазме выше (хроническое течение – 0,64-2,55, группа «острые» – 0,26-0,71, $p < 0,05$), более низкое содержание ферритина в плазме (хроническое течение – 27,15-85,80 мкг/л, группа «острые» – 62,0-262,0 мкг/л, $p < 0,05$) и более высокое отношение ферритина миелоплазмы к плазме (хроническое течение – 31,59-373,03, группа

«острые» – 7,1-38,29, $p=0,009$), количество интерлейкина-8 в плазме ниже (хроническое течение – 6,32-48,56 пг/мл, группа «острые» – 96,61-282,55 пг/мл, $p=0,0016$), как и уровень VEGF в интерстициальной жидкости костного мозга (хроническое течение – 148,97-259,95 пг/мл, группа «острые» – 25,48-70,4 пг/мл, $p=0,004$). Таким образом, мы обнаружили несколько предикторов хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры со значимым уровнем достоверности.

Таблица 31.

Анализ ROC-кривых для моделей прогноза диагностической эффективности показателей между группами «острые» и хроническим течением идиопатической тромбоцитопенической пурпуры

Показатели	AUC	SE	Significance level P (Sig)	95% CI of AUC		Cutoff point	Sensitivity (%)	Specificity (%)
				Lower	Upper			
Fe миелоплазма/ плазма	0,792	0,107	0,0064	0,539	0,944	>0,80	54,55	100,0
Ферритин миелоплазма/ плазма	0,852	0,088	0,0001	0,616	0,971	>14,81	90,91	75,00
VEGF миелоплазма, пг/мл	0,829	0,101	0,0012	0,571	0,964	>85,59	100,0	71,43
ИЛ-8 плазма, пг/мл	0,625	0,123	0,307	0,396	0,819	≤135,4	83,33	60,0

Примечание. AUC – площадь под кривой; SE – стандартная ошибка; Significance level P (Sig) – асимптотическая значимость; 95% CI of AUC – асимптотический 95% доверительный интервал; Lower Bound – нижняя граница; Upper Bound – верхняя граница, Cutoff point – точка отсечения; Sensitivity (%) – чувствительность; Specificity (%) – специфичность

Для оценки диагностической эффективности выявленных предикторов хронического течения ИТП применялся анализ ROC-кривых. Чувствительность и специфичность для соотношения содержания железа и ферритина в миелоплазме к плазме крови, VEGF в миелоплазме и ИЛ-8 в плазме при различных пороговых значениях были перечислены в таблице 31. Площадь под кривой ROC (AUC) в группе «острые» при сравнении с хронической формой ИТП составили 0,792, 0,852, 0,829 и 0,625 соответственно. Индекс Юдена был максимальным в точке отсечения. Таким образом, установлены точки отсечения для всех показателей.

Для соотношения содержания железа в миелоплазме к плазме крови – $>0,80$; для соотношения содержания ферритина в миелоплазме к плазме – $>14,81$; для содержания VEGF в миелоплазме – $>85,59$ пг/мл; для интерлейкина 8 – $\leq 135,4$ пг/мл.

При помощи пакета SPSS 26.00 для прогноза хронической формы ИТП был применен алгоритм «случайный лес», в котором из потока данных выбирается иерархия по степени важности параметров (подпоток параметров), и алгоритм «дерево принятия решений», где идет построение аналитических зависимостей. Нами было проведено сопоставление двух дифференцированных подходов к прогнозу хронической формы ИТП. Первый прогноз – с использованием исследования взаимосвязей между параметрами данных костного мозга и периферической крови (рисунок 50). Второй прогноз – в исследование вошли только данные по костному мозгу (рисунок 52).

В первой дендрограмме были получены системы неравенств, четыре из которых прогнозируют хроническое течение ИТП. Применения метода «дерево принятия решений» позволило сформулировать следующее диагностическое правило:

1. Если количество мегакариоцитов на 250 полей зрения $\leq 22,5$; показатель RDW-SD $\leq 46,4$ фл; соотношение ферритина миелоплазмы к плазме $>14,85$;

или 2. если количество мегакариоцитов на 250 полей зрения $\leq 22,5$; показатель RDW-SD $>46,4$ фл; концентрация VEGF в миелоплазме $>85,59$ пг/мл;

или 3. если количество мегакариоцитов на 250 полей зрения $>22,5$; количество сегментоядерных нейтрофилов в костном мозге $\leq 17,80\%$; концентрация ИЛ-8 в периферической крови $>135,44$ пг/мл;

или 4. если количество мегакариоцитов на 250 полей зрения $>22,5$; количество сегментоядерных нейтрофилов в костном мозге $>17,80\%$;

то прогнозируем хроническое течение идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

Информационная значимость диагностического теста прогноза развития хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры:

чувствительность – 83,61%, специфичность – 80,65%, диагностическая точность теста – 82,6%.

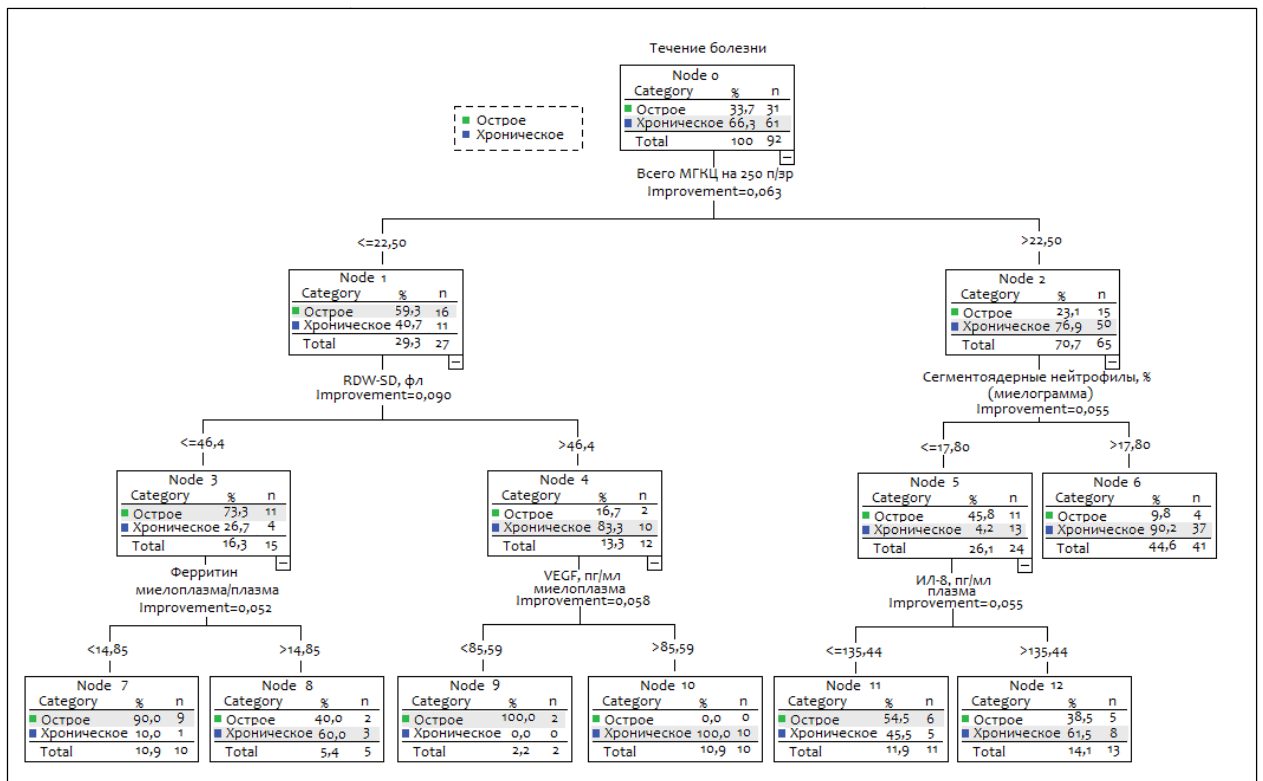


Рисунок 50 – Модель прогноза хронического течения ИТП по данным костного мозга и периферической крови (первый прогноз)

Для визуальной оценки полученной системы диагностических правил построена ROC-кривая (рисунок 51). Прогностичность положительного результата (PPV) – 90,2%, отрицательного результата (NPV) – 67,7%. Показатель AUC, отражающий площадь под кривой, равный 0,821, свидетельствует об очень хорошем качестве прогностической модели.

Второй прогноз включал данные исследования миелограммы и миелоплазменные концентрации цитокинов и анализов, вошедших в исследование. С помощью метода «дерево принятия решений» (рисунок 52) также были получены системы неравенств, четыре из которых классифицируют хроническую форму ИТП.

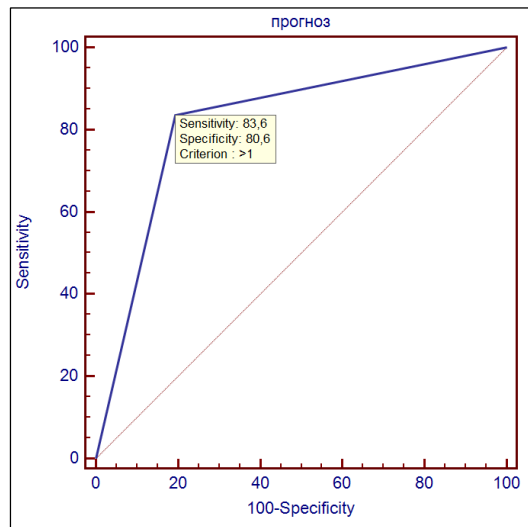


Рисунок 51 – ROC-кривая для модели прогноза диагностической эффективности дендрограммы (первый прогноз)

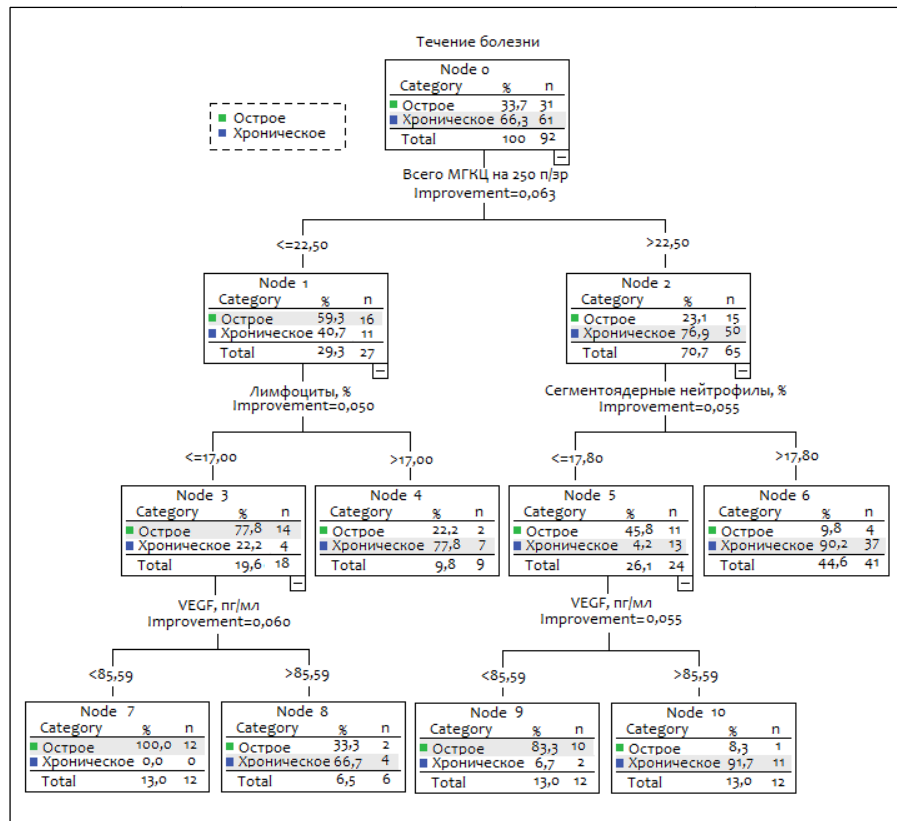


Рисунок 52 – Модель прогноза хронического течения ИТП по данным костного мозга (второй прогноз)

Применение метода «дерево принятия решений» позволило сформулировать следующее диагностическое правило:

1. Если количество мегакариоцитов на 250 полей зрения $\leq 22,5$; количество лимфоцитов $\leq 17,0\%$; концентрация VEGF в миелоплазме $> 85,59$ пг/мл;
 или 2. если количество мегакариоцитов на 250 полей зрения $\leq 22,5$; количество лимфоцитов $> 17,0\%$;
 или 3. если количество мегакариоцитов на 250 полей зрения $> 22,5$; количество сегментоядерных нейтрофилов в костном мозге $\leq 17,80\%$; концентрация VEGF в миелоплазме $> 85,59$ пг/мл;
 или 4. если количество мегакариоцитов на 250 полей зрения $> 22,5$; количество сегментоядерных нейтрофилов в костном мозге $> 17,80\%$;
 то прогнозируем хроническое течение идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

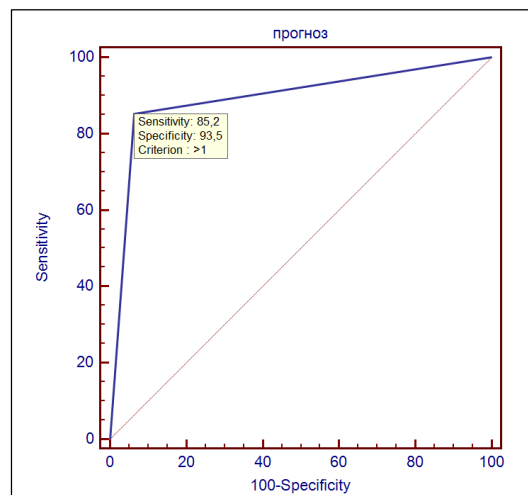


Рисунок 53 – ROC-кривая для модели прогноза диагностической эффективности дендрограммы (второй прогноз)

Информационная значимость диагностического теста прогноза развития хронического течения ИТП (второй прогноз): чувствительность – 85,25%, специфичность – 93,55%, диагностическая точность теста – 88,0%.

Для визуальной оценки полученной системы диагностических правил построена ROC-кривая (рисунок 53).

Прогностичность положительного результата (PPV) – 96,7%, отрицательного результата (NPV) – 71,0%. Показатель AUC, отражающий

площадь под кривой, равный 0,894, свидетельствует об очень хорошем качестве прогностической модели.

В ходе проведенного ROC-анализа показано, что второй прогноз имеет более высокую информативность. В частности, комбинация показателей, включающая количество мегакариоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, концентрация VEGF в миелоплазме повысила значение площади под кривой (AUC) до 0,894, чувствительность метода – до 85,25%, специфичность – до 93,55%, диагностическую точность теста – до 88,0%.

Таким образом, комбинация результатов миелограммы и определение цитокинов в миелоплазме позволяют сделать прогноз развития хронической формы идиопатической тромбоцитопенической пурпуры с высоким уровнем качества.

Полученные данные легли в основу прогностического алгоритма оценки риска развития хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, включающего показатели миелограммы, мегакариоцитограммы и уровень VEGF в миелоплазме (рисунок 54).

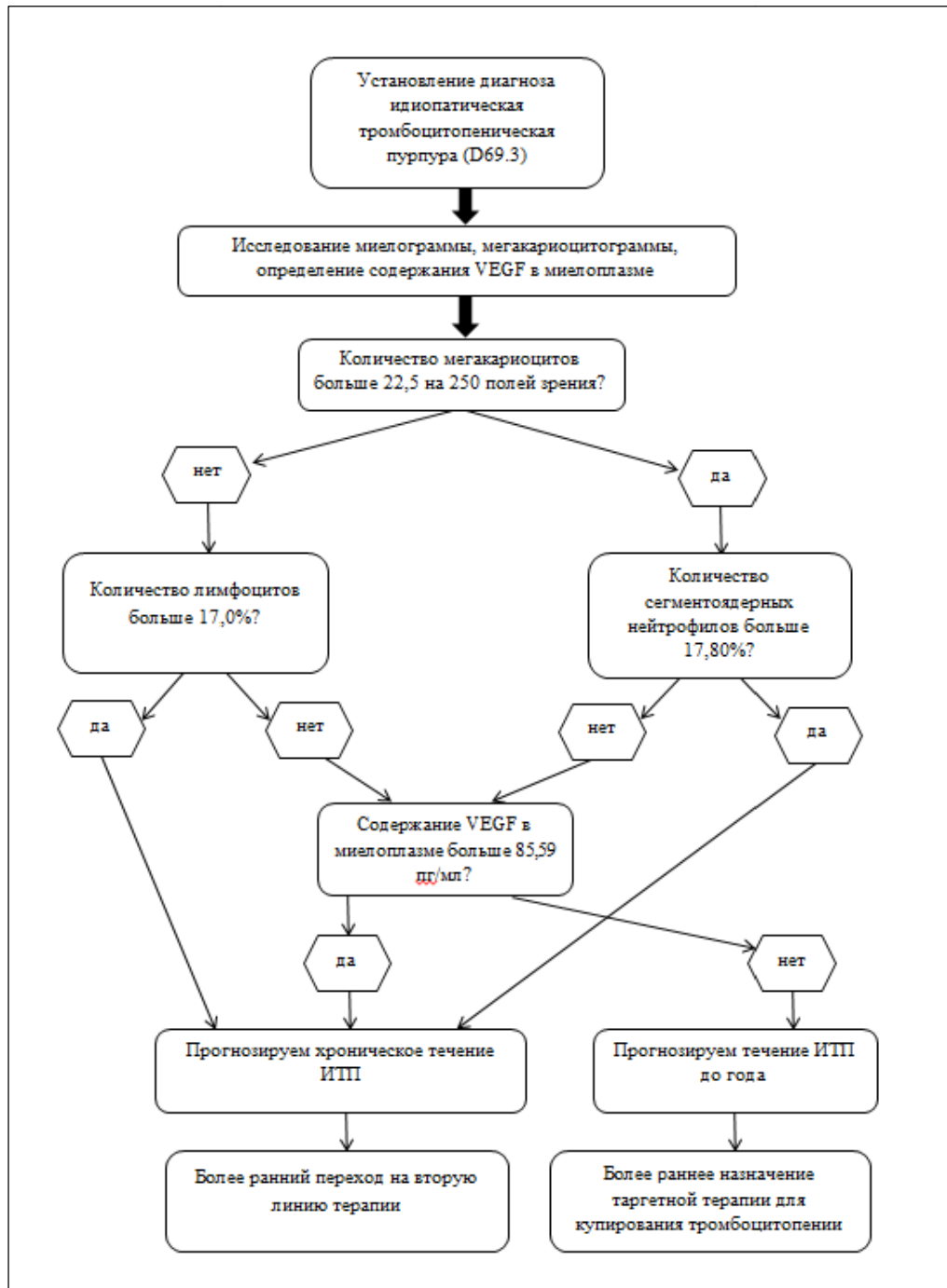


Рисунок 54 – Алгоритм оценки риска развития хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры

ВЫВОДЫ

1. Установлены особенности мегакариоцитарно-тромбоцитарного звена гемопоэза у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой, характеризующиеся увеличением количества мегакариоцитов, неэффективным тромбоцитопозом, тромбоцитопенией с изменением тромбоцитарных индексов.

2. Возрастные особенности мегакариоцитограмм характеризуются преобладанием одного из морфотипов мегакариоцитарной формулы. Установлено, что у детей с ИТП мегакариоцитограмма характеризуется высоким уровнем мегакариоцитов, преобладанием созревающих базофильных форм и гипогранулярных мегакариоцитов, что формирует «детский» морфотип мегакариоцитарной формулы. Установлено, что у пациентов с ИТП с 17 лет мегакариоцитограмма характеризуется преобладанием полихроматофильных мегакариоцитов и «голаядерных» форм, что формирует «взрослый» морфотип мегакариоцитарной формулы.

3. Установлено, что биохимические методики, применяемые для исследования сыворотки крови, могут быть использованы для характеристики показателей миелоплазмы после проведения корректирующих мероприятий, основанных на результатах валидации.

4. Выявлено, что при хроническом течении ИТП соотношение железа и ферритина миелоплазмы к плазме выше в 1,3 и 6,7 раза соответственно, концентрация VEGF миелоплазмы выше в 3,8 раза, уровень интерлейкина-8 в плазме ниже в 8,8 раза, что определяет использование данных показателей в качестве предикторов хронического течения ИТП.

5. Предложен прогностический алгоритм оценки риска хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, включающий показатели миелограммы, мегакариоцитограммы и уровень VEGF в миелоплазме.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Врачам клинико-диагностических лабораторий и врачам-гематологам рекомендовано добавить подсчет мегакариоцитограммы к рутинному исследованию миелограммы всем пациентам с признаками тромбоцитопении для оценки степени созревания мегакариоцитарного ростка, признаков диспоэза и активности тромбоцитообразования.

2. Врачам клинико-диагностических лабораторий и врачам-гематологам при исследовании костного мозга и периферической крови пациентов с первичной ИТП рекомендовано включить определение VEGF в миелоплазме, ИЛ-8 в плазме, соотношение содержания в интерстициальной жидкости костного мозга к плазме крови для ферритина и железа для оценки прогноза развития хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

3. Разработанный алгоритм оценки риска развития хронического течения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры рекомендуется к использованию врачам-гематологам в специализированных гематологических центрах.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективой для дальнейшей разработки темы является определение референсных интервалов для биохимических и иммунологических методик исследования миелоплазмы, дальнейшая их индивидуализация для различных возрастных групп, а также изучения отклонений состава для разных гематологических заболеваний. Включение в разные исследования определения дополнительных биохимических параметров миелоплазмы позволит понять патохимические аспекты развития заболеваний, выделить предикторы рецидивов и хронизации гематологических заболеваний. Учитывая различия состава каждой белковой фракции миелоплазмы в сравнении с плазмой, перспективным будет изучение количества макробелков каждой фракции в миелоплазме и определение их функциональной роли в процессе кроветворения, например, липидный спектр миелоплазмы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- AP-1 – Activator protein 1, фактор транскрипции
- Cdc42 – ГТФаза, действующая на филоподии
- CLP– общий лимфоидный предшественник
- CLSI – Институт Клинических Лабораторных Стандартов (США)
- СМР – общий миелоидный предшественник
- CXCR4 – хемокиновый рецептор СХС типа 4
- CYP2E1 – цитохром Р450 2Е1
- DANA – 2-дезоксидезокси-2,3-дегидро-N-ацетилнейраминавая кислота
- ECT2 – Epithelial cell transforming 2, белок 2, трансформирующий эпителиальные клетки
- ERK1/2 – extracellular signal-regulated kinases, внутриклеточные сигнальные протеинкиназы
- ETS – Erythroblast Transformation Specific, семейство белков факторов транскрипции
- Fas – рецептор клеточной смерти (апоптоза)
- FcR γ – рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов
- FLI1 – фактор транскрипции Friend leukemia Integration1 из семейства белков ETS
- Flt-3 – лиганд тирозинкиназы 3
- FOG1 – транскрипционный белковый кофактор
- GATA-1 – эритроидный фактор транскрипции
- GEF-H1 – фактор обмена нуклеотидов
- GP – гликопротеин
- GWAS – genome-wide association study полногеномные исследования ассоциаций
- HCT – гематокрит
- HGB – количество гемоглобина
- HIF2 α – фактор, индуцируемый гипоксией
- HLA – человеческий лейкоцитарный антиген

IFCC – Международная Федерация Клинической Химии и Лабораторной Медицины

IFN- γ – интерферон гамма

IL – интерлейкин

IPF – незрелая фракция тромбоцитов

JAK2 – янус-киназа 2

МАРК – mitogen-activated protein kinase митоген-активируемая протеинкиназа

МСН – среднее содержание гемоглобина в одном эритроците

МСНС – средняя концентрация гемоглобина в одном эритроците

МСV – средний объем эритроцитов

MEP – предшественник мегакариоцитов-эритроцитов

MgcRacGAP – белок, активирующий ГТФазу

Mpl-D – рецептор тромбопоэтина

MPV – средний объем тромбоцитов

Neu – нейроминидаза

NF-E2 – эритроид-специфический транскрипционный фактор

p19INK4D – белок анкириновых повторов

p21Cip1 / Waf1 – ингибитор циклинзависимой киназы

PDW – распределение тромбоцитов по объему

PLC γ 2 – 2-гамма-1-Фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатфосфодиэстераза

PLT – количество тромбоцитов

PU.1 – транскрипционный белковый кофактор семейства белков ETS

Rab27a, Rab27b, Rab38 – белки семейства малых ГТФаз

Rac1 – ГТФаза, действующая на ламеллоподии

RBC – количество эритроцитов

RDW – распределение эритроцитов по объему

Rho – трансформирующий белок гуанозинтрифосфатаза

RUNX1 – Runt-related transcription factor 1, белок острого миелоидного лейкоза 1 (AML1)

SCF – фактор стволовых клеток человека

Sec1/Munc18 – семейство белков, участвующих в слиянии везикул эукариотических клеток

STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции из семейства белков STAT

TERF1 – фактор связывания теломерных повторов 1

TGF- β – трансформирующий фактор роста бета

Th – Т-хелперы

TNFR – рецептор фактора некроза опухоли

TNF- α – фактор некроза опухоли

TPO-RA – агонисты рецепторов тромбопоэтина

TRAIL – TNF-related apoptosis-inducing ligand, цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз

Tregs – регуляторные Т-клетки

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

VEGFR – рецепторы фактора роста эндотелия сосудов

VPS16B – везикулярный белок 16B, ассоциированный с сортировкой белков

VPS33B – Vacuolar protein sorting-associated protein 33B, белок 33B, ассоциированный с сортировкой везикулярных белков

АлАТ – аланинаминотрансфераза

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ГТФаза – гуанозинтрифосфатаза

ИСМ – индекс созревания мегакариоцитов

ИЛ – интерлейкин

ИТП – идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура

ИФА – иммуноферментный анализ

Ув. – увеличение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Возрастные периоды развития человека // Психология: учебник / [В. М. Аллахвердов, С. И. Богданова, Л. И. Вансовская и др.]; под ред. А. А. Крылова. – 2-е изд. – Москва: Проспект, 2005. – С. 201–218.
2. Горбачева, Д. В. Электрофоретическое исследование белков в лабораторной практике: практическое пособие для врачей / Д. В. Горбачева; ГУ «Республиканский научно–практический центр радиационной медицины и экологии человека». – Гомель, ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2020. – 41 с.
3. Дифференциальная диагностика тромбоцитопений / А. Л. Меликян, Е. И. Пустовая, Е. К. Егорова [и др.] // Онкогематология. – 2017. – Т. 12, № 1. – С. 78–87.
4. Долгов, В. В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В. В. Долгов, П. В. Свиринов. – Москва; Тверь: Триада, 2005. – 227 с.: ил.
5. Лемешко, Б. Ю. Сравнительный анализ критериев проверки отклонения распределения от нормального закона / Б. Ю. Лемешко, С. Б. Лемешко // Метрология. – 2005. – № 2. – С. 3–23.
6. Луговская, С. А. Морфология клеток костного мозга в норме и патологии. Интерпретация миелограмм / С. А. Луговская, М. Е. Почтарь. – Москва; Тверь: Триада, 2018. – 246 с.
7. Морозова, В. Т. Коагулологические синдромы. Лабораторная диагностика: учебное пособие / В. Т. Морозова, Н. А. Авдеева. – Москва. – 2006. – 131 с.
8. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (первичной иммунной тромбоцитопении) у взрослых (редакция 2016 г.) / А. Л. Меликян, Е. И. Пустовая, Н. В. Цветаева [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2017. – Т. 62, № 1–S1. – С. 1–24.

9. Особенности метаболического состава спермальной плазмы при различных морфофункциональных патологиях эякулята / О. А. Гусякова, С. И. Мурский, Г. В. Тукманов [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64, № 8. – С. 469–476.
10. Первичная иммунная тромбоцитопеническая пурпура: подходы к терапии согласно новым клиническим рекомендациям американской гематологической ассоциации и международного консенсусного доклада / С.С. Бессмельцев // Вестник гематологии. – 2020. – Т. 16. № 2. – С. 1-29.
11. Петров, В. Ю. Вакциноиндуцированная острая тромбоцитопеническая пурпура у детей / В. Ю. Петров, Т. Г. Плахута, Г. И. Сосков // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского. – 2006. – Т. 85, № 6. – С. 8–12.
12. Полифункциональность тромбоцитов, их активация и возможности ее оценки / Л. И. Бурячковская, И. А. Учитель, А. Б. Сумароков [и др.] // Сердечно-сосудистые заболевания. Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. – 2007. – Т. 8, № 2. – С. 43–50.
13. Предикторы рефрактерного течения аутоиммунной тромбоцитопении / А. В. Туев, Л. А. Некрутенко, В. Г. Желобов [и др.] // Здоровье семьи – 21 век. – 2013. – № 1. – С. 225–234.
14. Румянцев, А. Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению иммунной тромбоцитопенической пурпуры у детей / А. Г. Румянцев, А. А. Масчан. – Москва: НОДГО, 2015. – 23 с.
15. Современные представления о патофизиологии и терапии идиопатической тромбоцитопенической пурпуры / В. Ю. Петров, Г. И. Сосков, Т. Г. Плахута [и др.] // Педиатрия. – 2009. – Т. 87, № 4. – С. 125–134.
16. A case-control study to assess the risk of immune thrombocytopenia associated with vaccines / L. Grimaldi-Bensouda, M. Michel, E. Aubrun [et al.] // Blood. – 2012. – Dec. 13, vol. 120(25). – P. 4938–4944.
17. A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia / I. M. Morison, E. M. Cramer Bordé, E. J. Cheesman [et al.] // Nat. Genet. – 2008. – Apr., vol. 40(4). – P. 387–389.

18. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix / T. Matsubara, S. Tsutsumi, H. Pan [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 313(3). – P. 503–508.
19. A novel role for PECAM-1 in megakaryocytoikinesis and recovery of platelet counts in thrombocytopenic mice / T. S. Dhanjal, C. Pendaries, E. A. Ross [et al.] // *Blood.* – 2007. – Vol. 109(10). – P. 4237–4244.
20. A novel role of CYP2E1 in human megakaryocyte development / Y. Tang, G. Zhang, M. Baird [et al.] // *In Vivo.* – 2014. – Nov.-Dec., vol. 28(6). – P. 1077–1084.
21. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haemopoietic disorders / T. Tahara, K. Usuki, H. Sato [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 1996. – Jun., vol. 93(4). – P. 783–788.
22. A β 1-tubulin-based megakaryocyte maturation reporter system identifies novel drugs that promote platelet production / H. Seo, S. J. Chen, K. Hashimoto [et al.] // *Blood Adv.* – 2018. – Sep. 11, vol. 2(17). – P. 2262–2272.
23. α 2 β 1 integrin, GPVI receptor, and common FcR γ chain on mouse platelets mediate distinct responses to collagen in models of thrombosis / R. J. Marjoram, Z. Li, L. He [et al.]. – Text: electronic // *PLoS One.* – 2014. – Nov. 21, vol. 9(11). – e114035. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25415203/> (date accessed: 24.01.2022).
24. Abnormal megakaryocyte development and platelet function in Nbeal2(-/-) mice / W. H. Kahr, R. W. Lo, L. Li [et al.] // *Blood.* – 2013. – Nov. 7, vol. 122(19). – P. 3349–3358.
25. Accelerated uptake of VWF/platelet complexes in macrophages contributes to VWD type 2B-associated thrombocytopenia / C. Casari, V. Du, Y. P. Wu [et al.] // *Blood.* – 2013. – Oct. 17, vol. 122(16). – P. 2893–2902.

26. Acute megakaryoblastic leukemia and loss of the RUNX1 gene / R. Berger, M. Busson, N. Dastugue [et al.] // *Cancer Genet Cytogenet.* – 2006. – Jan. 1, vol. 164(1). – P. 71–73.
27. Addition of sialidase or p38 MAPK inhibitors does not ameliorate decrements in platelet in vitro storage properties caused by 4 °C storage / A. Skripchenko, D. Thompson-Montgomery, H. Awatefe [et al.] // *Vox. Sang.* – 2014. – Nov., vol. 107(4). – P. 360–367.
28. Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes / A. Balduini, I. Pallotta, A. Malara [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2008. – Nov., vol. 6(11). – P. 1900–1907.
29. Ahmed, A. Rehman. α -2-Macroglobulin: a physiological guardian / A. A. Rehman, H. Ahsan, F. H. Khan // *J. Cell. Physiol.* – 2013. – Aug., vol. 228(8). – P. 1665–1675.
30. α IIB β 3 binding to a fibrinogen fragment lacking the γ -chain dodecapeptide is activation dependent and EDTA inducible / H. Zafar, Y. Shang, J. Li [et al.] // *Blood Adv.* – 2017. – Feb. 22, vol. 1(7). – P. 417–428.
31. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis / M. Ichikawa, T. Asai, T. Saito [et al.] // *Nat. Med.* – 2004. – Mar., vol. 10(3). – P. 299–304.
32. An analysis of megakaryocytopoiesis in the C3H mouse: an animal model whose megakaryocytes have 32N as the modal DNA class / C. W. Jackson, S. A. Steward, P. J. Chenaille [et al.] // *Blood.* – 1990. – Aug. 15, vol. 76(4). – P. 690–696.
33. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab / R. Stasi, N. Cooper, G. Del Poeta [et al.] // *Blood.* – 2008. – Aug. 15, vol. 112(4). – P. 1147–1150.
34. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18) / B. P. Thornton, V. Větvicka, M. Pitman [et al.] // *J. Immunol.* – 1996. – Feb. 1, vol. 156(3). – P. 1235–1246.

35. Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface / B. Boylan, H. Chen, V. Rathore [et al.] // *Blood*. – 2004. – Sep. 1, vol. 104(5). – P. 1350–1355.
36. Aukland, K. Protein concentration of lymph and interstitial fluid in the rat tail / K. Aukland, G. C. Kramer, E. M. Renkin // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Jul., vol. 247(1 Pt 2). – P. H74–H79.
37. Aurora Kinase B, a novel regulator of TERF1 binding and telomeric integrity / F. L. Chan, B. Vinod, K. Novy [et al.] // *Nucleic. Acids Res.* – 2017. – Dec. 1, vol. 45(21). – P. 12340–12353.
38. Autoantibody against integrin $\alpha v \beta 3$ contributes to thrombocytopenia by blocking the migration and adhesion of megakaryocytes / D. F. Zeng, F. Chen, S. Wang [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2018. – Sep., vol. 16(9). – P. 1843–1856.
39. Avanzi, M. P. Ex vivo production of platelets from stem cells / M. P. Avanzi, W. B. Mitchell // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Apr., vol. 165(2). – P. 237–247.
40. Baksh, D. Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances in vitro CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment / D. Baksh, J. E. Davies, P. W. Zandstra // *Blood*. – 2005. – Vol. 106(9). – P. 3012–3019.
41. Beyond the platelet count: immature platelet fraction and thromboelastometry correlate with bleeding in patients with immune thrombocytopenia / L. A. Greene, S. Chen, C. Seery [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Aug., vol. 166(4). – P. 592–600.
42. Biological significance of chemokine receptor expression by normal human megakaryoblasts / M. Majka, J. Ratajczak, M. Baj-Krzyworzek [et al.] // *Folia Histochem Cytobiol.* – 2001. – Vol. 39(3). – P. 235–244.
43. Can we Predict the Clinical Course of Immune Thrombocytopenia in Children by The Mean Platelet Volume? A Preliminary Study / Y. K. Lee, H. S. Yoon, E. H. Lee [et al.] // *Clin. Lab.* – 2021. – Vol. 67(3). – P. 255–261.

44. Cardier, J. E. Differential effect of erythropoietin and GM-CSF on megakaryocytopoiesis from primitive bone marrow cells in serum-free conditions / J. E. Cardier, C. L. Erickson-Miller, M. J. Jr. Murphy // *Stem. Cells.* – 1997. – Vol. 15(4). – P. 286–290.
45. Caspase-9 mediates the apoptotic death of megakaryocytes and platelets, but is dispensable for their generation and function / M. J. White, S. M. Schoenwaelder, E. C. Josefsson [et al.] // *Blood.* – 2012. – May 3, vol. 119(18). – P. 4283–4290.
46. CD8(+) T cells induce platelet clearance in the liver via platelet desialylation in immune thrombocytopenia / J. Qiu, X. Liu, X. Li [et al.]. – Text: electronic // *Sci. Rep.* – 2016. – Jun. 20, vol. 6. – 27445. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27321376/> (date accessed: 24.01.2022).
47. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura / F. Zhang, X. Chu, L. Wang [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 2006. – May, Vol. 76(5). – P. 427–431.
48. Chakraborti, S. Self-Assembly of Ferritin: Structure, Biological Function and Potential Applications in Nanotechnology / S. Chakraborti, P. Chakrabarti // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 1174. – P. 313–329.
49. Chemical and thyroid hormone profile of the bone marrow interstitial fluid in hematologic disorders and patients without primary hematologic disorders / E. Krashin, M. Ellis, K. Cohen [et al.] // *Hematological Oncology.* – 2018. – Vol. 36 – P. 445–450.
50. Chen, X. Th17 cells and Tregs: unlikely allies / X. Chen, J. J. Oppenheim // *J. Leukoc Biol.* – 2014. – May, vol. 95(5). – P. 723–731.
51. Circulating CD4+CD161+CD196+ Th17 cells are not increased in immune thrombocytopenia / D. Sollazzo, S. Trabanelli, A. Curti [et al.] // *Haematologica.* – 2011. – Apr., Vol. 96(4). – P. 632–634.

52. Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone / Y. Ling, X. Cao, Z. Yu [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 2007. – Oct., vol. 79(4). – P. 310–316.
53. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura / S. Kosugi, Y. Kurata, Y. Tomiyama [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 1996. – Jun., vol. 93(3). – P. 704–706.
54. Clinical significance of HLA-DRB1*0410 in Japanese patients with idiopathic thrombocytopenic purpura / S. Nomura, T. Matsuzaki, Y. Ozaki [et al.] // *Blood.* – 1998. – May 15, vol. 91(10). – P. 3616–3622.
55. C-Mpl Is Expressed on Osteoblasts and Osteoclasts and Is Important in Regulating Skeletal Homeostasis / T. E. Meijome, J. T. Baughman, R. A. Hooker [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2016. – Apr., vol. 117(4). – P. 959–969.
56. Cohen, D. J. Secret handshakes: cell-cell interactions and cellular mimics / D. J. Cohen, W. J. Nelson // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2018. – Feb., vol. 50. – P. 14–19.
57. Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen / C. G. Knight, L. F. Morton, D. J. Onley [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – Feb., vol. 41(2). – P. 450–457.
58. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death / M. C. Clarke, J. Savill, D. B. Jones [et al.] // *J. Cell. Biol.* – 2003. – Feb. 17, vol. 160(4). – P. 577–587.
59. Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura / E. I. Peerschke, B. Andemariam, W. Yin [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2010. – Feb., vol. 148(4). – P. 638–645.
60. Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors / X. Wang, J. D. Crispino, D. L. Letting [et al.] // *EMBO J.* – 2002. – Oct. 1, vol. 21(19). – P. 5225–5234.

61. Copy number variation of the activating FCGR2C gene predisposes to idiopathic thrombocytopenic purpura / W. B. Breunis, E. van Mirre, M. Bruin [et al.] // *Blood*. – 2008. – Feb. 1, vol. 111(3). – P. 1029–1038.
62. Critical role of Src-Syk-PLC γ 2 signaling in megakaryocyte migration and thrombopoiesis / A. Mazharian, S. G. Thomas, T. S. Dhanjal [et al.] // *Blood*. – 2010. – Aug. 5, vol. 116(5). – P. 793–800.
63. Cunin, P. Megakaryocyte emperipoiesis: a new frontier in cell-in-cell interaction / P. Cunin, P. A. Nigrovic // *Platelets*. – 2020. – Aug. 17, vol. 31(6). – P. 700–706.
64. De Alarcon, P. A. In vitro megakaryocytopoiesis in children with acute idiopathic thrombocytopenic purpura / P. A. De Alarcon, E. M. Mazur, J. A. Schmieder // *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* – 1987. – Vol. 9. – P. 212–218.
65. De Bock, K. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting / K. De Bock, M. Georgiadou, P. Carmeliet // *Cell Metab.* – 2013. – Vol. 18. – P. 634–647.
66. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura / J. Yu, S. Heck, V. Patel [et al.] // *Blood*. – 2008. – Aug. 15, vol. 112(4). – P. 1325–1328.
67. Defective megakaryopoiesis and abnormal erythroid development in Fli-1 gene-targeted mice / H. Kawada, T. Ito, P. N. Pharr [et al.] // *Int. J. Hematol.* – 2001. – Jun., vol. 73(4). – P. 463–468.
68. Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42 / I. Pleines, S. Dütting, D. Cherpokova [et al.] // *Blood*. – 2013. – Oct. 31, vol. 122(18). – P. 3178–3187.
69. DeKoter, R. P. Analysis of concentration-dependent functions of PU.1 in hematopoiesis using mouse models / R. P. DeKoter, M. B. Kamath, I. B. Houston // *Blood Cells Mol Dis.* – 2007. – Nov.-Dec., vol. 39(3). – P. 316–320.
70. Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIIb α metalloproteinase-mediated cleavage in mice / A. J. Jansen, E. C. Josefsson, V. Rumjantseva [et al.] // *Blood*. – 2012. – Feb. 2, vol. 119(5). – P. 1263–1273.

71. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia / J. Li, D. E. van der Wal, G. Zhu [et al.]. – Text : electronic // Nat. Commun. – 2015. – Jul. 17, vol. 6. – 7737. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26185093/> (date accessed: 24.01.2022).
72. Desialylation is associated with apoptosis and phagocytosis of platelets in patients with prolonged isolated thrombocytopenia after allo-HSCT / X. H. Zhang, Q. M. Wang, J. M. Zhang [et al.]. – Text : electronic // J. Hematol. Oncol. – 2015. – Oct. 23, vol. 8. – 116. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26497387/> (date accessed: 24.01.2022).
73. Detection of various platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry in idiopathic thrombocytopenic purpura / T. Nishioka, T. Yamane, T. Takubo [et al.] // Cytometry B Clin. Cytom. – 2005. – Nov., vol. 68(1). – P. 37–42.
74. Deutsch, V. R. Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside / V. R. Deutsch, A. Tomer // Br. J. Haematol. – 2013. – Jun., vol. 161(6). – P. 778–793.
75. Developmental differences in megakaryocyte maturation are determined by the microenvironment / W. B. Slayton, D. A. Wainman, X. M. Li [et al.] // Stem Cells. – 2005. – Oct., vol. 23(9). – P. 1400–1408.
76. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity / J. W. Semple, Y. Milev, D. Cosgrave [et al.] // Blood. – 1996. – May 15, vol. 87(10). – P. 4245–4254.
77. Differential expression of endogenous sialidases of human monocytes during cellular differentiation into macrophages / N. M. Stamatou, F. Liang, X. Nan [et al.] // FEBS J. – 2005. – May, vol. 272(10). – P. 2545–2556.
78. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes / S. R. Patel, J. L. Richardson, H. Schulze [et al.] // Blood. – 2005. – Dec. 15, vol. 106(13). – P. 4076–4085.

79. Differentiation-dependent interactions between RUNX-1 and FLI-1 during megakaryocyte development / H. Huang, M. Yu, T. E. Akie [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2009. – Aug., vol. 29(15). – P. 4103–4115.
80. DiMaggio, D. Cytomegalovirus can make immune thrombocytopenic purpura refractory / D. DiMaggio, A. Anderson, J. B. Bussel // *Br. J. Haematol.* – 2009. – Jun., vol. 146(1). – P. 104–112.
81. Dimerization of glycoprotein Ib α is not sufficient to induce platelet clearance / X. Liang, A. K. Syed, S. R. Russell [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2016. – Feb., vol. 14(2). – P. 381–386.
82. Dynamic combinatorial interactions of RUNX1 and cooperating partners regulates megakaryocytic differentiation in cell line models / N. Pencovich, R. Jaschek, A. Tanay [et al.] // *Blood.* – 2011. – Jan. 6, vol. 117(1). – P. e1–e14.
83. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow / T. Junt, H. Schulze, Z. Chen [et al.] // *Science.* – 2007. – Sep. 21, vol. 317(5845). – P. 1767–1770.
84. Dysregulated megakaryocyte distribution associated with nestin + mesenchymal stem cells in immune thrombocytopenia / M. Wang, R. Feng, J.-M. Zhang [et al.] // *Blood Adv.* – 2019. – May 14, vol. 3(9). – P. 1416–1428.
85. Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells / F. Norol, N. Vitrat, E. Cramer [et al.] // *Blood.* – 1998. – Vol. 91. – P. 830–843.
86. Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review / R. Stasi, A. Sarpatwari, J. B. Segal [et al.] // *Blood.* – 2009. – Feb. 5, vol. 113(6). – P. 1231–1240.
87. Effects of flt-3 ligand in combination with TPO on the expansion of megakaryocytic progenitors / K. Li, M. Yang, A. C. Lam [et al.] // *Cell Transplant.* – 2000. – Jan.-Feb., vol. 9(1). – P. 125–131.
88. Elevated profiles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia / Y. Hu, H. Li, L. Zhang [et al.] // *Hum. Immunol.* – 2012. – Jun., vol. 73(6). – P. 629–635.

89. Eliades, A. New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization / A. Eliades, N. Papadantonakis, K. Ravid // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Jun. 11, vol. 285(24). – P. 18909–18917.
90. Elsayed, M. E. Transferrin Saturation: A Body Iron Biomarker / M. E. Elsayed, M. U. Sharif, A. G. Stack // *Advances in Clinical Chemistry.* – 2016. – Vol. 75. – P. 71–97.
91. Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database / W.M. Schoonen, G. Kucera, J. Coalson [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2009. – Apr., vol. 145(2). – P. 235–244.
92. Epidemiology of incident immune thrombocytopenia: a nationwide population-based study in France / G. Moulis, A. Palmaro, J. L. Montastruc [et al.] // *Blood.* – 2014. – Nov. 20, vol. 124(22). – P. 3308–3315.
93. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation / B. Peng, G. Kong, C. Yang [et al.]. – Text: electronic // *Cell Death Dis.* – 2020. – Feb. 3, vol. 11(2). – 79. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015330/> (date accessed: 24.01.2022).
94. Erythropoietin is a major regulator of thrombopoiesis in thrombopoietin-dependent and -independent contexts / S. Hacein-Bey-Abina, M. Estienne, S. Bessoles [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2020. – Aug., vol. 88. – P. 15–27.
95. Evaluation of the role of the GPIb-IX-V receptor complex in development of the platelet storage lesion / M. Rijkers, P. F. van der Meer, I. J. Bontekoe [et al.] // *Vox. Sang.* – 2016. – Oct., vol. 111(3). – P. 247–256.
96. Expansion of the neonatal platelet mass is achieved via an extension of platelet lifespan / Z. J. Liu, K. M. Hoffmeister, Z. Hu [et al.] // *Blood.* – 2014. – May 29, vol. 123(22). – P. 3381–3389.
97. Fcgamma receptor IIa and IIIa polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura / M. D. Carcao, V. S. Blanchette, C. D. Wakefield [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2003. – Jan., vol. 120(1). – P. 135–141.

98. Fc γ receptor gene polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura / D. M. Amorim, Vda S. Silveira, C. A. Scrideli [et al.] // *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* – 2012. – Jul., vol. 34(5). – P. 349–352.
99. Fc γ RIIa and Fc γ RIIIa polymorphisms in childhood primary immune thrombocytopenia: implications for disease pathogenesis and outcome / A. Papagianni, M. Economou, A. Tragiannidis [et al.] // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* – 2013. – Jan., vol. 24(1). – P. 35–39.
100. Ferrara, N. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy / N. Ferrara, A. P. Adamis // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2016. – Jun., vol. 15(6). – P. 385–403.
101. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia / A. Hart, F. Melet, P. Grossfeld // *Immunity.* – 2000. – Aug., vol. 13(2). – P. 167–177.
102. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation / A. P. Tsang, J. E. Visvader, C. A. Turner [et al.] // *Cell.* – 1997. – Jul. 11, vol. 90(1). – P. 109–119.
103. FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1 / W. Hong, M. Nakazawa, Y. Y. Chen [et al.] // *EMBO J.* – 2005. – Jul. 6, vol. 24(13). – P. 2367–2378.
104. FOG-1-mediated recruitment of NuRD is required for cell lineage re-enforcement during haematopoiesis / Z. Gao, Z. Huang, H. E. Olivey [et al.] // *EMBO J.* – 2010. – Jan. 20, vol. 29(2). – P. 457–468.
105. Function of the lectin domain of Mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion / Y. Xia, G. Borland, J. Huang [et al.] // *J. Immunol.* – 2002. – Dec. 1, vol. 169(11). – P. 6417–6426.
106. GATA-1: friends, brothers, and coworkers / F. Morceau, M. Schnekenburger, M. Dicato [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – Dec., vol. 1030. – P. 537–554.
107. Gawaz, M. Platelets in inflammation and atherogenesis / M. Gawaz, H. Langer, A. E. May // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Dec., vol. 115(12). – P. 3378–3384.

108. Geddis, A. E. Endomitotic megakaryocytes form a midzone in anaphase but have a deficiency in cleavage furrow formation / A. E. Geddis, K. Kaushansky // *Cell Cycle*. – 2006. – Mar., vol. 5(5). – P. 538–545.
109. Geddis, A. E. Megakaryocytes express functional Aurora-B kinase in endomitosis / A. E. Geddis, K. Kaushansky // *Blood*. – 2004. – Aug. 15, vol. 104(4). – P. 1017–1024.
110. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors / N. Takayama, H. Nishikii, J. Usui [et al.] // *Blood*. – 2008. – Jun. 1, vol. 111(11). – P. 5298–5306.
111. Generation of megakaryocytes and platelets from preadipocyte cell line 3T3-L1, but not the parent cell line 3T3, in vitro / Y. Matsubara, H. Suzuki, Y. Ikeda [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – Nov. 26, vol. 402(4). – P. 796–800.
112. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation / J. H. Roark, J. B. Bussel, D. B. Cines [et al.] // *Blood*. – 2002. – Aug. 15, vol. 100(4). – P. 1388–1398.
113. George, J. N. Platelet immunoglobulin G: its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha-granule proteins / J. N. George // *Blood*. – 1990. – Sep. 1, vol. 76(5). – P. 859–870.
114. Glycoprotein Iba α clustering induces macrophage-mediated platelet clearance in the liver / R. Yan, M. Chen, N. Ma [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2015. – Jan., vol. 113(1). – P. 107–117.
115. Glycoprotein VI in securing vascular integrity in inflamed vessels / Y. Boulaftali, M. A. Mawhin, M. Jandrot-Perrus [et al.] // *Res. Pract. Thromb. Haemost.* – 2018. – Apr. 3, vol. 2(2). – P. 228–239.
116. Gremmel, T. Platelet Physiology / T. Gremmel, A. L. Frelinger, A. D. Michelson // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2016. – Apr., vol. 42(3). – P. 191–204.
117. Grewal, P. K. The Ashwell-Morell receptor / P. K. Grewal // *Methods Enzymol.* – 2010. – Vol. 479. – P. 223–241.

118. Gupta, G. P. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link / G. P. Gupta, J. Massagué // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Dec., vol. 114(12). – P. 1691–1693.
119. Haptoglobin: From hemoglobin scavenging to human health / A. Di Masi, G. De Simone, C. Ciaccio [et al.]. – Text : electronic // *Molecular Aspects of Medicine.* – 2020. – Jun., vol. 73. – 100851. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32660714/> (date accessed: 24.01.2022).
120. Harrison, P. Platelet function analysis / P. Harrison // *Blood Rev.* – 2005. – Mar., vol. 19(2). – P. 111–123.
121. Hemostasis in the mouse (*Mus musculus*): a review / D. A. Tsakiris, L. Scudder, K. Hodivala-Dilke [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 1999. – Feb., vol. 81(2). – P. 177–188.
122. High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura / F. Emmerich, G. Bal, A. Barakat [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2007. – Jan., vol. 136(2). – P. 309–314.
123. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation / T. Youssefian, A. Drouin, J. M. Massé [et al.] // *Blood.* – 2002. – Jun. 1, vol. 99(11). – P. 4021–4029.
124. Human adipose tissue-derived stromal cells can differentiate into megakaryocytes and platelets by secreting endogenous thrombopoietin / Y. Ono-Uruga, K. Tozawa, T. Horiuchi [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2016. – Jun., vol. 14(6). – P. 1285–1297.
125. Human endometrial stromal stem cells differentiate into megakaryocytes with the ability to produce functional platelets / J. Wang, S. Chen, C. Zhang [et al.]. – Text: electronic // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(8). – e44300. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22952951/> (date accessed: 24.01.2022).

126. Hyunji Kim. Difference in megakaryocyte expression of GATA-1, IL-6, and IL-8 associated with maintenance of platelet counts in patients with plasma cell neoplasm with dysmegakaryopoiesis / Hyunji Kim, Mi-Kyung Lee, Hye Ryoung Kim // *Exp. Hematol.* – 2019. – May, vol. 73. – P. 13–17.
127. Identification and characterization of an alternative splice variant of Mpl with a high affinity for TPO and its activation of ERK1/2 signaling / Q. Wang, R. Sun, L. Wu [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2013. – Dec., vol. 45(12). – P. 2852–2863.
128. Identification of a juxtamembrane mechanosensitive domain in the platelet mechanosensor glycoprotein Ib-IX complex / W. Zhang, W. Deng, L. Zhou // *Blood.* – 2015. – Jan. 15, vol. 125(3). – P. 562–569.
129. Idiopathic thrombocytopenic purpura: better therapeutic responses of patients with B- or T-cell clonality than patients without clonality / J. Kim, C. J. Park, H. S. Chi [et al.] // *Int. J. Hematol.* – 2003. – Dec., vol. 78(5). – P. 461–466.
130. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology / K. Eyerich, V. Dimartino, A. Cavani // *Eur. J. Immunol.* – 2017. – Apr., vol. 47(4). – P. 607–614.
131. IL1RN VNTR and IL2-330 polymorphic genes are independently associated with chronic immune thrombocytopenia / A. M. Rocha, C. De Souza, G. A. Rocha [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2010. – Sep., vol. 150(6). – P. 679–684.
132. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions / M. Mihara, M. Hashizume, H. Yoshida [et al.] // *Clin. Sci. (Lond.)*. – Vol. 122. – P. 143–159.
133. Immature platelet count: a simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia / G. Strauss, C. Vollert, A. von Stackelberg [et al.] // *Pediatr. Blood Cancer.* – 2011. – Vol. 57. – P. 641–647.

134. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro / M. Chang, P. A. Nakagawa, S. A. Williams [et al.] // *Blood*. – 2003. – Aug. 1, vol. 102(3). – P. 887–895.
135. Immunological characteristics and effect of cyclosporin in patients with immune thrombocytopenia / T. Wang, X. He, N. Ran [et al.]. – Text: electronic // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2021. – Jul. 30. – e23922. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34329516/> (date accessed: 24.01.2022).
136. Incidence of Primary Immune Thrombocytopenia (ITP) in adults in one region of Russia / A. L. Melikyan, E. I. Pustovaya, E. M. Volodicheva [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 128(22). – P. 4941–4941.
137. Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies / C. Zhao, X. Li, F. Zhang [et al.] // *Haematologica*. – 2008. – Sep., vol. 93(9). – P. 1428–1430.
138. Increased expression of HIF2 α during iron deficiency-associated megakaryocytic differentiation / K. Jimenez, V. Khare, R. Evstatiev [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2015. – Jun., vol. 13(6). – P. 1113–1127.
139. Inducing host protection in pneumococcal sepsis by preactivation of the Ashwell-Morell receptor / P. K. Grewal, P. V. Aziz, S. Uchiyama [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2013. – Dec. 10, vol. 110(50). – P. 20218–20223.
140. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf / Y. Ono, Y. Wang, H. Suzuki [et al.] // *Blood*. – 2012. – Nov. 1, vol. 120(18). – P. 3812–3821.
141. Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide / E. Battinelli, S. R. Willoughby, T. Foxall [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2001. – Dec. 4, vol. 98(25). – P. 14458–14463.
142. Inflammatory cytokines as biomarkers in heart failure / T. Ueland, L. Gullestad, S. H. Nymo [et al.] // *Clin. Chim. Acta*. – 2015. – Vol. 443. – P. 71–77.

143. Insights into association of the NuRD complex with FOG-1 from the crystal structure of an RbAp48·FOG-1 complex / S. Lejon, S. Y. Thong, A. Murthy [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Jan. 14, vol. 286(2). – P. 1196–1203.
144. Interleukin 4, interleukin 6 and interleukin 10 polymorphisms in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura / K. H. Wu, C. T. Peng, T. C. Li [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2005. – Mar., Vol. 128(6). – P. 849–852.
145. Interleukin-17F gene polymorphism in patients with chronic immune thrombocytopenia / T. Saitoh, N. Tsukamoto, H. Koiso [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 2011. – Sep., vol. 87(3). – P. 253–258.
146. Interleukin-6 and erythropoietin act as direct potentiators and inducers of in vitro cytoplasmic process formation on purified mouse megakaryocytes / E. An, K. Ogata, S. Kuriya [et al.] // *Exp. Hematol.* – 1994. – Feb., vol. 22(2). – P. 149–156.
147. Interleukin-6 enhances murine megakaryocytopoiesis in serum-free culture / K. Koike, T. Nakahata, T. Kubo [et al.] // *Blood.* – 1990. – Jun. 15, vol. 75(12). – P. 2286–2291.
148. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia / D. Provan, R. Stasi, A. C. Newland [et al.] // *Blood.* – 2010. – Jan. 14, vol. 115(2). – P. 168–186.
149. Investigation of TNF-alpha, TGF-beta 1, IL-10, IL-6, IFN-gamma, MBL, GPIIb/IIIa, and IL1A gene polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura / M. Pehlivan, V. Okan, T. Sever [et al.] // *Platelets.* – 2011. – Vol. 22(8). – P. 588–595.
150. Iron deficiency alters megakaryopoiesis and platelet phenotype independent of thrombopoietin / R. Evstatiev, A. Bukaty, K. Jimenez [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2014. – May, vol. 89(5). – P. 524–529.
151. Iversen, P. O. Tumor necrosis factor α and adiponectin in bone marrow interstitial fluid from patients with acute myeloid leukemia inhibit normal hematopoiesis / P. O. Iversen, H. Wiig // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Oct. 1, vol. 11(19). – P. 6793-6799.

152. Kacena, M. A. Megakaryocyte-bone cell interactions / M. A. Kacena, W. A. Ciovacco // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 658. – P. 31–41.
153. Kaushansky, K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis / K. Kaushansky // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* – 2009. – P. 147–152.
154. Kile, B. T. The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets / B. T. Kile // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Apr., vol. 165(2). – P. 217–226.
155. Klement, K. DNA double strand break responses and chromatin alterations within the aging cell / K. Klement, A. A. Goodarzi // *Exp. Cell Res.* – 2014. – Nov. 15, vol. 329(1). – P. 42–52.
156. Kornfeld, S. The biogenesis of lysosomes / S. Kornfeld, I. Mellman // *Annu. Rev. Cell Biol.* – 1989. – Vol. 5. – P. 483–525.
157. Kuwana, M. Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura / M. Kuwana, Y. Okazaki, Y. Ikeda // *J. Thromb. Haemost.* – 2009. – Feb., vol. 7(2). – P. 322–329.
158. LaFave, L. M. JAK2 the future: therapeutic strategies for JAK-dependent malignancies / L. M. LaFave, R. L. Levine // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2012. – Nov., vol. 33(11). – P. 574–582.
159. Larson, M. K. Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3 / M. K. Larson, S. P. Watson // *Blood.* – 2006. – Sep. 1, vol. 108(5). – P. 1509–1514.
160. Levin, J. Why are recently published platelet counts in normal mice so low? / J. Levin, S. Ebbe // *Blood.* – 1994. – Jun. 15, vol. 83(12). – P. 3829–3831.
161. Levine, R. L. Myeloproliferative disorders / R. L. Levine, D. G. Gilliland // *Blood.* – 2008. – Sep. 15, vol. 112(6). – P. 2190–2198.
162. Li, H. Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery / H. Li, Z. M. Qian // *Medicinal Research Reviews.* – 2002. – May, vol. 22(3). – P. 225–250.
163. Li, R. Glycans and the platelet life cycle / R. Li, K. M. Hoffmeister, H. Falet // *Platelets.* – 2016. – Sep., vol. 27(6). – P. 505–511.

164. Li, R. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex / R. Li, J. Emsley // *J. Thromb. Haemost.* – 2013. – Apr., vol. 11(4). – P. 605–614.
165. Li, Z. Role of molecular mimicry to HIV-1 peptides in HIV-1-related immunologic thrombocytopenia / Z. Li, M. A. Nardi, S. Karpatkin // *Blood.* – 2005. – Jul. 15, vol. 106(2). – P. 572–576.
166. Lillicrap, D. Von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy / D. Lillicrap // *Blood.* – 2013. – Nov. 28, vol. 122(23). – P. 3735–3740.
167. Low iron promotes megakaryocytic commitment of megakaryocytic-erythroid progenitors in humans and mice / J. Xavier-Ferruccio, V. Scanlon, X. Li [et al.] // *Blood.* – 2019. – Oct. 31, vol. 134(18). – P. 1547–1557.
168. Machlus, K. R. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation / K. R. Machlus, J. N. Thon, J. E. Jr. Italiano // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Apr., vol. 165(2). – P. 227–236.
169. Machlus, K. R. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation / K. R. Machlus, J. E. Jr. Italiano // *J. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 201(6). – P. 785–796.
170. Major histocompatibility complex susceptibility genes and immune thrombocytopenic purpura in Caucasian adults / S. J. Stanworth, D. M. Turner, J. Brown [et al.] // *Hematology.* – 2002. – Apr., vol. 7(2). – P. 119–121.
171. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases / M. Malumbres. – Text: electronic // *Genome Biol.* – 2014. – Vol. 15(6). – 122. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25180339/> (date accessed: 24.01.2022).
172. Mantadakis, E. Thrombocytopenic purpura after measles-mumps-rubella vaccination: a systematic review of the literature and guidance for management / E. Mantadakis, E. Farmaki, G. R. Buchanan // *J. Pediatr.* – 2010. – Apr., vol. 156(4). – P. 623–628.

173. Mazharian, A. Critical role for ERK1/2 in bone marrow and fetal liver-derived primary megakaryocyte differentiation, motility, and proplatelet formation / A. Mazharian, S. P. Watson, S. Séverin // *Exp. Hematol.* – 2009. – Oct., vol. 37(10). – P. 1238.e5–1249.e5.
174. McMillan, R. The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura / R. McMillan // *Semin. Hematol.* – 2007. – Oct., vol. 44(4 Suppl 5). – P. S3–S11.
175. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production / J. L. Richardson, R. A. Shivdasani, C. Boers [et al.] // *Blood.* – 2005. – Dec. 15, vol. 106(13). – P. 4066–4075.
176. Megakaryocyte and platelet production from human cord blood stem cells / A. Robert, V. Cortin, A. Garnier [et al.] // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 788. – P. 219–247.
177. Megakaryocyte emperipoiesis mediates membrane transfer from intracytoplasmic neutrophils to platelets / P. Cunin, R. Bouslama, K. R. Machlus [et al.]. – Text: electronic // *Elife.* – 2019. – May 1, vol. 8. – e44031. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31042146/> (date accessed: 24.01.2022).
178. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling / L. Lordier, A. Jalil, F. Aurade [et al.] // *Blood.* – 2008. – Oct. 15, vol. 112(8). – P. 3164–3174.
179. Megakaryocyte morphology and its impact in predicting response to steroid in immune thrombocytopenia / A. K. Tripathi, S. Mishra, A. Kumar [et al.] // *Platelets.* – 2014. – vol. 25(7). – P. 526–531.
180. Megakaryocyte TGF β 1 partitions erythropoiesis into immature progenitor/stem cells and maturing precursors / S. D. Giandomenico, P. Kermani, N. Mollé [et al.] // *Blood.* – 2020. – Aug. 27, vol. 136(9). – P. 1044–1054.
181. Megakaryocyte-mediated inhibition of osteoclast development / M. A. Kacena, T. Nelson, M. E. Clough [et al.] // *Bone.* – 2006. – Nov., vol. 39(5). – P. 991–999.

182. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets / E.C. Josefsson, C. James, K. J. Henley // *J. Exp. Med.* – 2011. – Sep. 26, vol. 208(10). – P. 2017–2031.
183. Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis / I. Pleines, I. Hagedorn, S. Gupta [et al.] // *Blood.* – 2012. – Jan. 26, vol. 119(4). – P. 1054–1063.
184. Megakaryocytopoiesis in idiopathic thrombocytopenic purpura / H. Sugiyama, M. Yagita, T. Takahashi [et al.] // *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi.* – 1987. – Feb., vol. 50(1). – P. 119–128.
185. Megakaryopoiesis and platelet production: insight into hematopoietic stem cell proliferation and differentiation / T. Guo, X. Wang, Qu. Yigong [et al.]. – Text: electronic // *Stem. Cell Investig.* – 2015. – Feb. 14, vol. 2. – 3. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27358871/> (date accessed: 24.01.2022).
186. Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein / M. Bender, J. N. Thon, A. J. Ehrlicher [et al.] // *Blood.* – 2015. – Jan. 29, vol. 125(5). – P. 860–868.
187. miRNAs can increase the efficiency of ex vivo platelet generation / S. Emmrich, K. Henke, J. Hegermann [et al.] // *Ann. Hematol.* – 2012. – Nov., vol. 91(11). – P. 1673–1684.
188. Miyagi, T. Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions / T. Miyagi, K. Yamaguchi // *Glycobiology.* – 2012. – Jul., vol. 22(7). – P. 880–896.
189. Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura / T. Takahashi, T. Yujiri, K. Shinohara [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2004. – Jan., vol. 124(1). – P. 91–96.

190. Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels / E. Brown, L. M. Carlin, C. Nerlov [et al.]. – Text: electronic // Life Sci Alliance. – 2018. – May 21, vol. 1(2). – e201800061. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30393781/> (date accessed: 24.01.2022).
191. New gene functions in megakaryopoiesis and platelet formation / C. Gieger, A. Radhakrishnan, A. Cvejic [et al.] // Nature. – 2011. – Nov 30, vol. 480(7376). – P. 201–208.
192. NF-E2-mediated enhancement of megakaryocytic differentiation and platelet production in vitro and in vivo / E. L. Fock, F. Yan, S. Pan [et al.] // Exp. Hematol. – 2008. – Jan., vol. 36(1). – P. 78–92.
193. Nurden, A. T. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease / A. T. Nurden, P. Nurden // Blood Rev. – 2007. – Jan., vol. 21(1). – P. 21–36.
194. OP9 bone marrow stroma cells differentiate into megakaryocytes and platelets / Y. Matsubara, Y. Ono, H. Suzuki [et al.]. – Text : electronic // PLoS One. – 2013. – Vol. 8(3). – e58123. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23469264/> (date accessed: 24.01.2022).
195. Overexpression of cyclin D1 moderately increases ploidy in megakaryocytes / S. Sun, J. M. Zimmet, P. Toselli [et al.] // Haematologica. – 2001. – Jan., vol. 86(1). – P. 17–23.
196. P19INK4D links endomitotic arrest and megakaryocyte maturation and is regulated by AML-1 / L. Gilles, R. Guièze, D. Bluteau [et al.] // Blood. – 2008. – Apr. 15, vol. 111(8). – P. 4081–4091.
197. Panitsas, F. P. Effect of splenectomy on type-1/type-2 cytokine gene expression in a patient with adult idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) / F. P. Panitsas, A. Mouzaki. – Text : electronic // BMC Blood Disord. – 2004. – Oct. 18, vol. 4(1). – 4. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15491502/> (date accessed: 24.01.2022).

198. Patel, S. R. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets / S. R. Patel, J. H. Hartwig, J. E. Jr. Italiano // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Dec., vol. 115(12). – P. 3348–3354.
199. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia: increased platelet destruction and/or decreased platelet production / D. Nugent, R. McMillan, J. L. Nichol [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2009. – Sep., vol. 146(6). – P. 585–596.
200. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin / F. J. Sauvage, K. Carver-Moore, S. M. Luoh [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1996. – Feb. 1, vol. 183(2). – P. 651–656.
201. Pierschbacher, M. D. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of themolecule / M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti // *Nature.* – 1984. – May 3-9, vol. 309(5963). – P. 30–33.
202. Pitchford, S. C. VEGFR1 stimulates a CXCR4-dependent translocation of megakaryocytes to the vascular niche, enhancing platelet production in mice / S. C. Pitchford, T. Lodie, S. M. Rankin // *Blood.* – 2012. – Oct. 4, vol. 120(14). – P. 2787–2795.
203. Plasma antiproteinase screen and neutrophil-mediated platelet activation. A major role played by alpha 1 antitrypsin / M. Chignard, E. Hazouard, P. Renesto [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – Dec. 30, vol. 1224(3). – P. 433–440.
204. Plasma thrombopoietin levels in thrombocytopenic states: implication for a regulatory role of bone marrow megakaryocytes / M. Hou, P. O. Andersson, D. Stockelberg [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 1998. – Vol. 101. – P. 420–424.
205. Platelet activation induced by human antibodies to interleukin-8 / V. Regnault, E. Maistre, J. P. Carteaux [et al.] // *Blood.* – 2003. – Vol. 101. – P. 1419–1421.
206. Platelet adhesion to collagen / B. P. Nuyttens, T. Thijs, H. Deckmyn [et al.] // *Thrombosis Research.* – 2011. – Jan., vol. 127, suppl. 2. – P. S26–S29.

207. Platelet Apoptosis in Adult Immune Thrombocytopenia: Insights into the Mechanism of Damage Triggered by Auto-Antibodies / N. P. Goette, A. C. Glembotsky, P. R. Lev [et al.]. – Text : electronic // PLoS One. – 2016. – Aug. 5, vol. 11(8). – e0160563. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27494140/> (date accessed: 24.01.2022).
208. Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow / S. Kowata, S. Isogai, K. Murai [et al.] // Thromb. Haemost. – 2014. – Oct., vol. 112(4). – P. 743–756.
209. Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP / A. L. Frelinger, R. F. Grace, A. J. Gerrits [et al.] // Blood. – 2015. – Aug. 13, vol. 126(7). – P. 873–879.
210. Platelet function to estimate the bleeding risk in autoimmune thrombocytopenia / S. Panzer, M. Rieger, R. Vormittag [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. – 2007. – Oct., vol. 37(10). – P. 814–819.
211. Platelet production proceeds independently of the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways / E. C. Josefsson, D. L. Burnett, M. Lebois [et al.]. – Text: electronic // Nat. Commun. – 2014. – Mar. 17, vol. 5. – 3455. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24632563/> (date accessed: 24.01.2022).
212. Ponka, P. Function and regulation of transferrin and ferritin / P. Ponka, C. Beaumont, D. R. Richardson // Semin. Hematol. – 1998. – Jan., vol. 35(1). – P. 35–54.
213. Pope, N. J. Differential coregulator requirements for function of the hematopoietic transcription factor GATA-1 at endogenous loci / N. J. Pope, E. H. Bresnick // Nucleic. Acids Res. – 2010. – Apr., vol. 38(7). – P. 2190–2200.
214. Potente, M. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis / M. Potente, H. Gerhardt, P. Carmeliet // Cell. – 2011. – Vol. 146. – P. 873–887.

215. Predisposition to idiopathic thrombocytopenic purpura maps close to the major histocompatibility complex class I chain-related gene A / M. H. Maia, Rde L. Peixoto, C. P. de Lima [et al.] // *Hum. Immunol.* – 2009. – Mar., vol. 70(3). – P. 179–183.
216. Presence of a defect in karyokinesis during megakaryocyte endomitosis / L. Lordier, J. Pan, V. Naim [et al.] // *Cell Cycle.* – 2012. – Dec. 1, vol. 11(23). – P. 4385–4389.
217. Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura / D. Ma, X. Zhu, P. Zhao [et al.] // *Ann. Hematol.* – 2008. – Nov., vol. 87(11). – P. 899–904.
218. Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding / M. Eisbacher, M. L. Holmes, A. Newton [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – May, vol. 23(10). – P. 3427–3441.
219. Proteomic analysis of interstitial fluid in bone marrow identified that peroxiredoxin 2 regulates H₂O₂ level of bone marrow during aging / W. Wang, L. Gou, G. Xie [et al.] // *J. Proteome. Res.* – 2010. – Aug. 06, vol. 9(8). – P. 3812–3819.
220. Pshezhetsky, A. V. Desialylation of surface receptors as a new dimension in cell signaling / A. V. Pshezhetsky, L. I. Ashmarina // *Biochemistry (Mosc).* – 2013. – Jul., vol. 78(7). – P. 736–745.
221. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules / T. Tolmachova, M. Abrink, C. E. Futter [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2007. – Apr. 3, vol. 104(14). – P. 5872–5877.
222. Rabinovich, A. Predictive value of markers of inflammation in the postthrombotic syndrome: a systematic review: inflammatory biomarkers and PTS / A. Rabinovich, J. M. Cohen, S. R. Kahn // *Thromb. Res.* – 2015. – Vol. 136. – P. 289–297.

223. Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia / K. Kiyomizu, H. Kashiwagi, T. Nakazawa [et al.] // *Blood*. – 2012. – Aug. 16, vol. 120(7). – P. 1499–1509.
224. Recombinant human c-Mpl ligand (thrombopoietin) not only acts on megakaryocyte progenitors, but also on erythroid and multipotential progenitors in vitro / S. Tanimukai, T. Kimura, H. Sakabe [et al.] // *Exp. Hematol.* – 1997. – Sep., vol. 25(10). – P. 1025–1033.
225. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment / Y. Muguruma, T. Yahata, H. Miyatake [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 107(5). – P. 1878–1887.
226. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1 / B. Olsson, B. Ridell, L. Carlsson [et al.] // *Blood*. – 2008. – Aug. 15, vol. 112(4). – P. 1078–1084.
227. Reduced susceptibility to colitis-associated colon carcinogenesis in mice lacking plasma membrane-associated sialidase / K. Yamaguchi, K. Shiozaki, S. Moriya [et al.]. – Text: electronic // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(7). – e41132. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22815940/> (date accessed: 24.01.2022).
228. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation / D. Bluteau, L. Lordier, A. Di Stefano [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2009. – Jul., vol. 7, suppl 1. – P. 227–234.
229. Regulation of the megakaryocytic glycoprotein IX promoter by the oncogenic Ets transcription factor Fli-1 / L. S. Bastian, B. A. Kwiatkowski, J. Breininger [et al.] // *Blood*. – 1999. – Apr. 15, vol. 93(8). – P. 2637–2644.
230. Requirement of VPS33B, a member of the Sec1/Munc18 protein family, in megakaryocyte and platelet alpha-granule biogenesis / B. Lo, L. Li, P. Gissen [et al.] // *Blood*. – 2005. – Dec. 15, vol. 106(13). – P. 4159–4166.

231. Rho kinase inhibition drives megakaryocyte polyploidization and proplatelet formation through MYC and NFE2 downregulation / M. P. Avanzi, F. Goldberg, J. Davila [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Mar., vol. 164(6). – P. 867–876.
232. RhoA is essential for maintaining normal megakaryocyte ploidy and platelet generation / A. Suzuki, J. W. Shin, Y. Wang [et al.]. – Text : electronic // *PLoS One.* – 2013. – Jul. 23, vol. 8(7). – e69315. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23935982/> (date accessed: 24.01.2022).
233. Rodeghiero, F. Beyond immune thrombocytopenia: the evolving role of thrombopoietin receptor agonists / F. Rodeghiero, G. Carli // *Ann. Hematol.* – 2017. – Sep., vol. 96(9). – P. 1421–1434.
234. Rojnuckarin, P. Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha / P. Rojnuckarin, K. Kaushansky // *Blood.* – 2001. – Jan. 1, vol. 97(1). – P. 154–161.
235. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation / D. H. Farrell, P. Thiagarajan, D. W. Chung [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1992. – Nov. 15, vol. 89(22). – P. 10729–10732.
236. Role of GATA-1 in proliferation and differentiation of definitive erythroid and megakaryocytic cells in vivo / S. Takahashi, T. Komeno, N. Suwabe [et al.] // *Blood.* – 1998. – Jul. 15, vol. 92(2). – P. 434–442.
237. Role of glycoprotein Ibalpha in phagocytosis of platelets by macrophages / B. A. Badlou, G. Spierenburg, H. Ulrichs [et al.] // *Transfusion.* – 2006. – Dec., vol. 46(12). – P. 2090–2099.
238. Role of human interleukin-9 as a megakaryocyte potentiator in culture / H. Fujiki, T. Kimura, H. Minamiguchi [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2002. – Dec., vol. 30(12). – P. 1373–1380.
239. Role of molecular mimicry of hepatitis C virus protein with platelet GPIIIa in hepatitis C-related immunologic thrombocytopenia / W. Zhang, M. A. Nardi, W. Borkowsky [et al.] // *Blood.* – 2009. – Apr. 23, vol. 113(17). – P. 4086–4093.

240. Role of p21(Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes / V. Baccini, L. Roy, N. Vitrat [et al.] // *Blood*. – 2001. – Dec. 1, vol. 98(12). – P. 3274–3282.
241. Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes / Y. Gao, E. Smith, E. Ker [et al.] // *Dev. Cell*. – 2012. – Mar. 13, vol. 22(3). – P. 573–584.
242. Role of sialic acid for platelet life span: exposure of beta-galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes / A. L. Sorensen, V. Rumjantseva, S. Nayeb-Hashemi [et al.] // *Blood*. – 2009. – Aug. 20, vol. 114(8). – P. 1645–1654.
243. Rose, N. R. Negative selection, epitope mimicry and autoimmunity / N. R. Rose // *Curr. Opin. Immunol.* – 2017. – Dec., vol. 49. – P. 51–55.
244. Ruggeri, Z. M. Interaction of von Willebrand factor with platelets and the vessel wall / Z. M. Ruggeri, G. L. Mendolicchio // *Hamostaseologie*. – 2015. – Vol. 35(3). – P. 211–224.
245. Rumjantseva, V. Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets / V. Rumjantseva, K. M. Hoffmeister // *Transfus. Apher. Sci.* – 2010. – Feb., vol. 42(1). – P. 63–70.
246. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation / K. E. Elagib, F. K. Racke, M. Mogass [et al.] // *Blood*. – 2003. – Jun. 1, vol. 101(11). – P. 4333–4341.
247. RUNX1 suppression induces megakaryocytic differentiation of UT-7/GM cells / R. Nagai, E. Matsuura, Y. Hoshika [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Jun. 23, vol. 345(1). – P. 78–84.
248. Sandhoff, K. Gangliosides and gangliosidoses: principles of molecular and metabolic pathogenesis / K. Sandhoff, K. Harzer // *J. Neurosci.* – 2013. – Jun. 19, vol. 33(25). – P. 10195–208.

249. Savage, B. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow / B. Savage, F. Almus-Jacobs, Z. M. Ruggeri // *Cell*. – 1998. – Sep. 4, vol. 94(5). – P. 657–666.
250. Segal, J. B. Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data / J. B. Segal, N. R. Powe // *J. Thromb. Haemost.* – 2006. – Nov., vol. 4(11). – P. 2377–2383.
251. Serotonin enhances megakaryopoiesis and proplatelet formation via p-Erk1/2 and F-actin reorganization / J. Y. Ye, E. Y. Liang, Y. S. Cheng [et al.] // *Stem. Cells*. – 2014. – Nov., vol. 32(11). – P. 2973–2982.
252. Serum levels of thrombopoietin, IL-11, and IL-6 in pediatric thrombocytopenias / M. Cremer, H. Schulze, G. Linthorst [et al.] // *Ann. Hematol.* – 1999. – Vol. 78. – P. 401–417.
253. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review / C. Neunert, N. Noroozi, G. Norman [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2015. – Mar., vol. 13(3). – P. 457–464.
254. Severe platelet desialylation in a patient with glycoprotein Ib/IX antibody-mediated immune thrombocytopenia and fatal pulmonary hemorrhage / J. Li, J. L. Callum, Y. Lin [et al.] // *Haematologica*. – 2014. – Apr., Vol. 99(4). – P. e61–e63.
255. Sialidase significance for cancer progression / T. Miyagi, K. Takahashi, K. Hata [et al.] // *Glycoconj J.* – 2012. – Dec., vol. 29(8-9). – P. 567–577.
256. Sialidases in vertebrates: a family of enzymes tailored for several cell functions / E. Monti, E. Bonten, A. D'Azzo [et al.] // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* – 2010. – Vol. 64. – P. 403–479.
257. Silencing of membrane-associated sialidase Neu3 diminishes apoptosis resistance and triggers megakaryocytic differentiation of chronic myeloid leukemic cells K562 through the increase of ganglioside GM3 / C. Tringali, B. Lupo, F. Cirillo [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2009. – Jan., vol. 16(1). – P. 164–174.

258. SLC35D3 delivery from megakaryocyte early endosomes is required for platelet dense granule biogenesis and is differentially defective in Hermansky-Pudlak syndrome models / R. Meng, Y. Wang, Y. Yao [et al.] // *Blood*. – 2012. – Jul. 12, vol. 120(2). – P. 404–414.
259. Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura / R. He, D. M. Reid, C. E. Jones [et al.] // *Blood*. – 1994. – Feb. 15, vol. 83(4). – P. 1024–1032.
260. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura / M. Kuwana, Y. Okazaki, J. Kaburaki [et al.] // *J. Immunol.* – 2002. – Apr. 1, vol. 168(7). – P. 3675–3682.
261. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group / F. Rodeghiero, R. Stasi, T. Gernsheimer [et al.] // *Blood*. – 2009. – Mar. 12, vol. 113(11). – P. 2386–2393.
262. Stellos, K. Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment / K. Stellos, M. Gawaz // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2007. – Mar., vol. 33(2). – P. 159–164.
263. Stem cell factor enhances proliferation, but not maturation, of murine megakaryocytic progenitors in serum-free culture / R. Tanaka, K. Koike, T. Imai [et al.] // *Blood*. – 1992. – Oct. 1, vol. 80(7). – P. 1743–1749.
264. Stinchcombe, J. Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes / J. Stinchcombe, G. Bossi, G. M. Griffiths // *Science*. – 2004. – Jul. 2, vol. 305(5680). – P. 55–59.
265. Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies / W. Bergmeier, K. Rackebrandt, W. Schröder [et al.] // *Blood*. – 2000. – Feb. 1, Vol. 95(3). – P. 886–893.
266. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain / E. G. Huizinga, S. Tsuji, R. A. Romijn [et al.] // *Science*. – 2002. – Aug. 16, vol. 297(5584). – P. 1176–1179.

267. Successful treatment with oseltamivir phosphate in a patient with chronic immune thrombocytopenia positive for anti-GPIb/IX autoantibody / L. Shao, Y. Wu, H. Zhou [et al.] // *Platelets*. – 2015. – Vol. 26(5). – P. 495–497.
268. Targeting platelet GPIIb/IIIa reduces platelet adhesion, GPIIb/IIIa signaling and thrombin generation and prevents arterial thrombosis / E. Maurer, C. Tang, M. Schaff [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2013. – Jun., vol. 33(6). – P. 1221–1229.
269. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein IIb/IIIa, VI, and GPIIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding / C. Kleinschnitz, M. Pozgajova, M. Pham [et al.] // *Circulation*. – 2007. – May 1, vol. 115(17). – P. 2323–2330.
270. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura / B. Olsson, P. O. Andersson, M. Jernås [et al.] // *Nat. Med.* – 2003. – Sep., vol. 9(9). – P. 1123–1124.
271. Tedgui, A. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways / A. Tedgui, Z. Mallat // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86. – P. 515–581.
272. Temporal and pharmacological characterization of angiostatin release and generation by human platelets: implications for endothelial cell migration / A. Radziwon-Balicka, de la Rosa C. Moncada, B. Zielnik [et al.]. – Text: electronic // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(3). – e59281. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23555012/> (date accessed: 24.01.2022).
273. Terminal platelet production is regulated by von Willebrand factor / S. Poirault-Chassac, K. A. Nguyen, A. Pietrzyk [et al.]. – Text: electronic // *PLoS One*. – 2013. – May 30, vol. 8(5). – e63810. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23737952/> (date accessed: 24.01.2022).
274. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia / C. Neunert, W. Lim, M. Crowther [et al.]; American Society of Hematology // *Blood*. – 2011. – Apr. 21, vol. 117(16). – P. 4190–41207.

275. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling / R. Grozovsky, A. J. Begonja, K. Liu [et al.] // *Nat. Med.* – 2015. – Jan., vol. 21(1). – P. 47–54.
276. The contribution of von Willebrand factor-GPIb α interactions to persistent aggregate formation in apheresis platelet concentrates / H. B. Feys, B. Van Aelst, R. Devloo [et al.] // *Vox. Sang.* – 2016. – May, vol. 110(4). – P. 344–351.
277. The glycoprotein Iba α -von Willebrand factor interaction induces platelet apoptosis / S. Li, Z. Wang, Y. Liao [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2010. – Feb., vol. 8(2). – P. 341–350.
278. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports / D. R. Terrell, L. A. Beebe, S. K. Vesely [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2010. – Mar., vol. 85(3). – P. 174–180.
279. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity / D. B. Cines, J. B. Bussel, H. A. Liebman [et al.] // *Blood.* – 2009. – Jun. 25, vol. 113(26). – P. 6511–6521.
280. The macrophage α M β 2 integrin α M lectin domain mediates the phagocytosis of chilled platelets / E. C. Josefsson, H. H. Gebhard, T. P. Stossel [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – May 6, Vol. 280(18). – P. 18025–18032.
281. The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors / N. Debili, F. Wendling, A. Katz [et al.] // *Blood.* – 1995. – Oct. 1, vol. 86(7). – P. 2516–2525.
282. The Novel Association of Circulating Tumor Cells and Circulating Megakaryocytes with Prostate Cancer Prognosis / L. Xu, X. Mao, T. Guo [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2017. – Sep. 1, vol. 23(17). – P. 5112–5122.
283. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 / J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813. – P. 878–888.
284. The role of Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) in immune thrombocytopenia / Z. Wu, J. Zhou, X. Wei [et al.] // *Hematology.* – 2013. – Sep., vol. 18(5). – P. 295–299.

285. The role of interleukin 6 in megakaryocyte formation, megakaryocyte development and platelet production / N. Williams, I. Bertoncello, H. Jackson [et al.] // *Ciba Found. Symp.* – 1992. – Vol. 167. – P. 160–170.
286. The role of Rab38 in platelet dense granule defects / I. Ninkovic, J. G. White, A. Rangel-Filho [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2008. – Dec., vol. 6(12). – P. 2143–2151.
287. The role of Th17 cells in adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura / Z. X. Guo, Z. P. Chen, C. L. Zheng // *Eur. J. Haematol.* – 2009. – Jun., vol. 82(6). – P. 488–489.
288. The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation / S. Patel-Hett, H. Wang, A. J. Begonja [et al.] // *Blood.* – 2011. – Aug. 11, vol. 118(6). – P. 1641–1652.
289. The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin / L. N. Varghese, J. P. Defour, C. Pecquet. – Text: electronic // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2017. – Mar. 31, vol. 8. – 59. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28408900/> (date accessed: 24.01.2022).
290. The VPS33B-binding protein VPS16B is required in megakaryocyte and platelet α -granule biogenesis / Denisa Urban, Ling Li, Hilary Christensen [et al.] // *Blood.* – 2012. – Dec. 13, vol. 120(25). – P. 5032–5040.
291. Thrombopoietin, but not erythropoietin, directly stimulates multilineage growth of primitive murine bone marrow progenitor cells in synergy with early acting cytokines: distinct interactions with the ligands for c-kit and FLT3 / V. Ramsfjell, O. J. Borge, O. P. Veiby [et al.] // *Blood.* – 1996. – Dec. 15, vol. 88(12). – P. 4481–4492.
292. Thrombopoietin, the Mp1 ligand, is essential for full megakaryocyte development / K. Kaushansky, V. C. Broudy, N. Lin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1995. – Apr. 11, Vol. 92(8). – P. 3234–3238.

293. Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development / S. H. Orkin, R. A. Shivdasani, Y. Fujiwara [et al.] // *Stem. Cells.* – 1998. – Vol. 16, suppl 2. – P. 79–83.
294. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development / R. A. Shivdasani, M. F. Rosenblatt, D. Zucker-Franklin [et al.] // *Cell.* – 1995. – Jun. 2, vol. 81(5). – P. 695–704.
295. Transferrin modifications and lipid peroxidation: Implications in diabetes mellitus / A. Van Campenhout, C. Van Campenhout, A. R. Lagrou [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2003. – Vol. 37. – P. 1069–1077.
296. Transferrin Saturation Inversely Correlates with Platelet Function / C. Barale, R. Senkeev, F. Napoli [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2019. – May, vol. 119(5). – P. 766–778.
297. Two mechanisms for platelet-mediated killing of tumour cells: one cyclooxygenase dependent and the other nitric oxide dependent / M. Okada, T. Sagawa, A. Tominaga [et al.] // *Immunology.* – 1996. – Sep., vol. 89(1). – P. 158–164.
298. Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura / T. Wang, H. Zhao, H. Ren [et al.] // *Haematologica.* – 2005. – Jul., vol. 90(7). – P. 914–923.
299. Upper Normal Limits of Serum Alanine Aminotransferase in Healthy Population: A Systematic Review / S. Kolahehdoozan, B. Mirminachi, S. G. Sepanlou [et al.] // *Middle East. J. Dig. Dis.* – 2020. – Jul., vol. 12(3). – P. 194–205.
300. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules / S. Patel-Hett, J. L. Richardson, H. Schulze [et al.] // *Blood.* – 2008. – May 1, vol. 111(9). – P. 4605–4616.
301. Ware, J. Dysfunctional platelet membrane receptors: from humans to mice / J. Ware // *Thromb. Haemost.* – 2004. – Sep., vol. 92(3). – P. 478–485.
302. Ware, J. Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome / J. Ware, S. Russell, Z. M. Ruggeri // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2000. – Mar. 14, vol. 97(6). – P. 2803–2808.

303. Warren, M. K. The role of interleukin 6 and interleukin I in megakaryocyte development / M. K. Warren, L. B. Conroy, J. S. Rose // *Exp. Hematol.* – 1989. – Vol. 17. – P. 1095–1099.
304. Weyrich, A. S. Platelets: signaling cells in the immune continuum / A. S. Weyrich, G. A. Zimmerman // *Trends Immunol.* – 2004. – Sep., vol. 25(9). – P. 489–495.
305. White, M. J. Apoptotic processes in megakaryocytes and platelets / M. J. White, B. T. Kile // *Semin. Hematol.* – 2010. – Jul., vol. 47(3). – P. 227–234.
306. Yang, J. G. Effects of vascular endothelial growth factors and their receptors on megakaryocytes and platelets and related diseases / J. G. Yang, L. L. Wang, D. C. Ma // *Br. J. Haematol.* – 2018. – Feb., vol. 180(3). – P. 321–334.
307. Yin, T. The stem cell niches in bone / T. Yin, L. Li // *J. Clin. Invest.* – 2006. – May, vol. 116(5). – P. 1195–1201.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 17.

Показатели миелограмм возрастных групп взрослого населения с ИТП

Показатель	Зрелый 1 период (n=30) Me [25%, 75%]	Зрелый 2 период (n=46) Me [25%, 75%]	Пожилой (n=46) Me [25%, 75%]	Старческий (n=24) Me [25%, 75%]	<i>p</i> k-w
Бласты, %	1,00 [0,50–1,90]	1,00 [0,40–1,80]	0,80 [0,55–1,20]	1,00 [0,35–2,00]	0,731
Промиелоциты, %	2,40 [1,70–3,40]	2,40 [1,20–3,50]	2,60 [1,60–3,60]	1,80 [1,50–3,90]	0,950
Миелоциты нейтрофильные, %	14,60 [8,60–20,60]	18,20 [11,70–21,60]	13,20 [10,4–22,05]	16,10 [14,2–20,65]	0,612
Метамиелоциты нейтрофильные, %	9,20 [6,80–13,00]	9,00 [6,80–10,20]	9,70 [7,20–12,55]	6,50 [4,60–10,55]	0,268
Палочкоядерные нейтрофилы, %	8,40 [6,30–10,60]	8,00 [6,10–9,60]	7,30 [5,90–8,80]	6,30 [3,80–9,80]	0,310
Сегментоядерные нейтрофилы, %	17,60 [15,20–23,30]	19,40 [16,50–26,90]	20,80 [17,45–25,7]	17,10 [13,95–22,25]	0,164
Миелоциты эозинофильные, %	1,20 [0,40–2,00]	1,20 [0,60–1,80]	1,20 [0,40–1,65]	1,30 [0,95–1,80]	0,782
Метамиелоциты эозинофильные, %	0,40 [0,20–0,60]	0,40 [0,20–0,60]	0,40 [0,15–0,60]	0,40 [0,20–0,60]	0,886
Эозинофилы зрелые, %	2,00 [1,10–2,50]	1,40 [0,70–1,60]	1,10 [0,60–1,85]	1,40 [0,60–1,95]	0,141
Базофилы, %	0,00 [0,00–0,40]	0,00 [0,00–0,40]	0,20 [0,00–0,40]	0,10 [0,00–0,40]	0,158
Лимфоциты, %	12,80 [9,40–20,00]	12,80 [9,40–17,60]	12,60 [9,20–15,30]	13,30 [7,70–18,90]	0,838
Плазмоциты, %	1,00 [0,40–1,20]	1,20 [0,80–1,80]	1,10 [0,60–1,60]	1,10 [0,40–1,80]	0,555
Моноциты, %	2,80 [1,50–3,90]	2,40 [1,40–3,70]	2,50 [1,60–3,60]	2,40 [2,00–3,60]	0,956
Проэритробласты, %	0,20 [0,00–0,60]	0,00 [0,00–0,40]	0,20 [0,00–0,40]	0,40 [0,15–0,65]	0,276
Эритробласты базофильные, %	4,20 [1,40–6,40]	2,80 [1,20–5,30]	3,90 [2,15–5,60]	5,00 [2,65–8,20]	0,191
Эритробласты Полихроматофильные, %	9,20 [6,70–13,60]	8,00 [5,70–12,00]	10,00 [6,90–15,25]	11,00 [7,35–15,85]	0,318
Эритробласты оксифильные, %	3,60 [1,80–7,40]	3,60 [1,60–7,80]	3,60 [1,80–6,80]	3,20 [2,40–6,45]	0,993
Эритробластические элементы [сумм], %	18,80 [12,00–25,50]	16,40 [12,30–24,70]	18,70 [14,40–25,2]	23,40 [15,10–39,0]	0,306

Показатели мегакариоцитограмм возрастных групп взрослого населения с ИТП

Показатель	Зрелый 1 период (n=30) Me [25%, 75%]	Зрелый 2 период (n=46) Me [25%, 75%]	Пожилой (n=46) Me [25%, 75%]	Старческий (n=24) Me [25%, 75%]	<i>p</i> k-w
Всего мегакариоцитов на 250 полей зрения	46,00 [10,00–94,50]	33,00 [20,00–52,50]	37,00 [18,00–68,0]	38,00 [13,75–52,25]	0,869
Мегакариобласты, %	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–1,00]	0,00 [0,00–1,00]	0,00 [0,00–1,00]	0,148
Промегакариоциты, %	2,00 [0,00–4,00]	2,00 [0,00–3,50]	2,00 [0,00–4,00]	1,50 [0,00–5,00]	0,986
Мегакариоциты базофильные, %	9,00 [2,50–23,00]	9,00 [5,00–15,00]	11,00 [5,50–21,00]	5,50 [3,50–19,25]	0,674
Мегакариоциты полихроматофил., %	41,00 [27,00–45,00]	42,00 [31,50–51,00]	39,00 [32,0–46,50]	45,50 [36,0–49,25]	0,339
Мегакариоциты оксифильные, %	20,00 [10,00–25,00]	18,00 [9,50–25,00]	14,00 [9,50–22,50]	11,00 [5,75–15,25]	0,257
Инволютивные формы, %	2,00 [1,00–5,50]	3,00 [1,50–4,50]	2,00 [1,00–4,00]	2,00 [0,00–4,00]	0,457
Голоядерные, %	17,00 [10,00–43,50]	20,00 [11,50–28,00]	23,00 [13,50–30,0]	22,00 [15,25–34,25]	0,871
Дегенеративные, %	1,00 [0,00–2,00]	1,00 [0,00–3,00]	1,00 [0,00–4,00]	0,50 [0,00–2,00]	0,508
Эмпериоплез, %	5,00 [2,50–7,00]	4,00 [1,50–6,50]	3,00 [1,00–6,00]	5,00 [3,00–7,00]	0,325
Микромегакариоциты, %	3,00 [1,00–8,50]	4,00 [2,00–8,50]	4,00 [1,00–9,00]	2,00 [0,00–8,00]	0,601
Мегакариоциты с множеством ядер, %	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,00 [0,00–0,00]	0,839
Индекс созревания мегакариоцитов	0,22 [0,06–0,46]	0,21 [0,13–0,37]	0,27 [0,12–0,50]	0,09 [0,06–0,52]	0,739

Показатели общего анализа крови пациентов групп взрослого населения с
ИТП

Показатель	Зрелый 1 период (n=30) Me [25%, 75%]	Зрелый 2 период (n=46) Me [25%, 75%]	Пожилой (n=46) Me [25%, 75%]	Старческий (n=24) Me [25%, 75%]	<i>p</i> k-w
Лейкоциты [WBC], $\times 10^9/\text{л}$	7,98 [5,55-10,2]	7,19 [5,50-10,7]	7,77 [5,59-10,16]	6,78 [5,37-10,2]	0,918
Эритроциты [RBC], $\times 10^{12}/\text{л}$	4,56 [4,05-5,25]	4,83 [4,25-5,27]	4,79 [4,30-5,22]	4,66 [3,81-5,15]	0,475
Гематокрит [HCT], %	37,75 [34,9-43,8]	42,1 [38,6-46,6]	41,3 [38,2-43,5]	41,3 [34,6-42,4]	0,110
Гемоглобин [HGB], г/л	120,0 [109,0-146,0]	138,0 [125,2-148,0]	128,5 [122,0-139,7]	127,5 [105,0-145,0]	0,051
Среднее содержание гемоглобина в эритроците [MCH], пг	27,25 [25,6-29,1]	27,7 [26,3-29,9]	28,0 [26,6-29,0]	28,1 [26,6-29,4]	0,773
Средний объем эритроцитов [MCV], фл	86,6 [83,4-90,3]	87,9 [84,6-92,4]	88,6 [84,8-91,3]	87,0 [85,4-90,8]	0,607
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците [MCHC], г/дл	31,15 [28,6-33,65]	30,3 [28,0-33,1]	30,9 [27,32-33,65]	28,3 [26,7-30,9]	0,343
Распределение эритроцитов по объему, коэффициент вариации [RDW-CV], %	14,65 [13,3-17,4]	14,2 [13,1-16,8]	14,3 [13,1-16,0]	14,35 [13,0-14,9]	0,954
Распределение эритроцитов по объему, стандартное отклонение [RDW-SD], фл	42,55 [41,8-43,3]	43,05 [41,2-46,9]	43,00 [41,2-47,5]	44,30 [42,3-47,0]	0,435
Тромбоциты [PLT], $\times 10^9/\text{л}$	18,0 [8,0-29,0]	30,0 [13,0-63,4]	34,0 [12,0-74,0]	24,6 [7,0-63,0]	0,291
Тромбокрит [PCT], %	0,04 [0,027-0,108]	0,07 [0,027-0,104]	0,072 [0,036-0,125]	0,075 [0,035-0,084]	0,438
Средний объем тромбоцитов [MPV], фл	11,7 [8,71-13,90]	12,2 [9,47-14,47]	11,90 [8,63-13,7]	10,9 [9,52-13,85]	0,813
Анизцитоз тромбоцитов [PDW], %	21,2 [17,0-24,0]	22,80 [21,85-23,75]	22,25 [21,1-23,65]	21,5 [16,7-22,8]	0,351

Вариабельность показателей миелограмм у представителей разного пола с
идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Показатель	Мужчины (n=105) Me [25%, 75%]	Женщины (n=167) Me [25%, 75%]	Отличие, <i>p</i>
Бласты, %	0,90 [0,4-1,6]	0,80 [0,4-1,6]	0,140
Промиелоциты, %	2,0 [1,2-3,2]	2,4 [1,6-3,5]	0,132
Миелоциты нейтрофильные, %	9,4 [5,6-16,4]	10,8 [7,65-15,5]	0,062
Метамиелоциты нейтрофильные, %	7,9 [5,4-9,6]	8,9 [6,1-12,0]	0,033
Палочкоядерные нейтрофилы, %	7,8 [6,0-10,4]	8,0 [6,0-10,1]	0,851
Сегментоядерные нейтрофилы, %	18,0 [15,0-22,8]	19,4 [15,6-24,4]	0,138
Сумма нейтрофильных элементов, %	50,7 [39,2-58,2]	54,6 [45,4-61,6]	0,009
Миелоциты эозинофильные, %	1,1 [0,4-1,6]	0,8 [0,4-1,5]	0,150
Метамиелоциты эозинофильные, %	0,4 [0,0-0,8]	0,4 [0,0-0,6]	0,326
Эозинофилы зрелые, %	1,4 [0,8-2,4]	1,4 [0,8-2,0]	0,60
Сумма эозинофильных элементов, %	3,2 [2,0-4,4]	2,8 [1,6-4,0]	0,185
Базофилы, %	0,0 [0,0-0,4]	0,0 [0,0-0,2]	0,961
Лимфоциты, %	17,7 [12,4-24,40]	17,2 [12,0-23,0]	0,612
Плазмоциты, %	0,40 [0,0-1,0]	0,40 [0,0-1,2]	0,43
Моноциты, %	3,2 [2,0-4,4]	2,9 [1,6-4,4]	0,771
Проэритробласты, %	0,0 [0,0-0,6]	0,0 [0,0-0,4]	0,167
Эритробласты базофильные, %	3,1 [1,6-5,6]	2,8 [1,5-4,8]	0,222
Эритробласты полихроматофильные, %	14,2 [8,8-19,2]	12,0 [7,6-16,3]	0,033
Эритробласты оксифильные, %	2,8 [1,2-5,6]	2,4 [1,0-4,9]	0,822
Эритробластические элементы [сумм], %	21,6 [17,2-26,8]	18,9 [14,4-24,9]	0,009
Цитоллиз на 500 кл	98,5 [49,0-130,0]	91,0 [53,0-123,0]	0,385
Лейко-эритробластическое соотношение	3,62 [2,73-4,81]	4,29 [3,01-5,94]	0,009
Индекс созревания нейтрофилов	0,80 [0,58-1,08]	0,83 [0,63-1,14]	0,282
Индекс созревания эритрокариоцитов	0,83 [0,72-0,90]	0,84 [0,73-0,90]	0,813

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

Вариабельность показателей мегакариоцитогрaмм у представителей разного пола с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Показатель	Мужчины (n=105) Me [25%, 75%]	Женщины (n=167) Me [25%, 75%]	Отличие, <i>p</i>
Всего мегакариоцитов на 250 полей зрения	59,0 [31,0-109,0]	51,5 [28,5-85,5]	0,156
Мегакариобласты, %	0,0 [0,0-1,0]	0,0 [0,0-1,0]	0,479
Промегакариоциты, %	1,0 [0,0-3,0]	1,0 [0,0-3,0]	0,729
Мегакариоциты базофильные, %	29,5 [11,0-46,0]	22,0 [9,0-40,0]	0,114
Мегакариоциты полихроматофильные, %	38,0 [31,0-47,0]	39,0 [30,5-46,0]	0,787
Мегакариоциты оксифильные, %	10,5 [6,0-17,0]	14,5 [8,5-22,0]	0,044
Инволютивные формы, %	1,0 [0,0-3,0]	1,0 [0,0-3,0]	0,31
Голоядерные, %	6,0 [2,0-17,0]	8,5 [4,0-21,0]	0,148
Дегенеративные, %	1,0 [0,0-2,0]	1,0 [0,0-2,0]	0,231
Эмпериоплез, %	3,0 [1,0-5,0]	3,0 [1,0-5,0]	0,719
Микро-мегакариоциты, %	3,0 [1,0-8,0]	3,0 [1,0-6,0]	0,670
Гипогранулярные мегакариоциты, %	53,5 [29,0-68,0]	42,0 [28,0-58,0]	0,076
Мегакариоциты с множеством ядер, %	0,0 [0,0-0,0]	0,0 [0,0-0,0]	0,653
Пластинкообразующие формы, %	4,5 [2,0-11,0]	6,0 [2,0-11,0]	0,290
Пластинкосодержающие формы, %	25,0 [16,0-33,0]	28,0 [20,5-34,0]	0,120
Индекс созревания мегакариоцитов	0,57 [0,23-1,04]	0,45 [0,19-0,87]	0,123

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий

Вариабельность показателей общего анализа крови у представителей разного пола
с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой

Показатель	Мужчины [n=105] Me [25%, 75%]	Женщины [n=167] Me [25%, 75%]	Отличие, <i>p</i>
Лейкоциты [WBC], $\times 10^9/\text{л}$	8,17 [5,95-9,7]	7,5 [6,05-9,9]	0,297
Эритроциты [RBC], $\times 10^{12}/\text{л}$	4,77 [4,32-5,18]	4,49 [4,09-4,93]	0,004
Гематокрит [HCT], %	38,9 [34,8-45,7]	37,95 [34,0-41,6]	0,034
Гемоглобин [HGB], г/л	131 [116-146]	122 [111-131]	0,0012
Среднее содержание гемоглобина в эритроците [MCH], пг	27,3 [25,9-28,8]	26,9 [25,7-28,7]	0,295
Средний объем эритроцитов [MCV], фл	83,8 [78,3-89,1]	84,2 [79,9-88,5]	0,764
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците [MCHC], г/дл	32,65 [31,0-33,7]	32,6 [29,8-33,6]	0,453
Распределение эритроцитов по объему, коэффициент вариации [RDW-CV], %	13,5 [13,0-14,4]	13,7 [13,0-15,32]	0,267
Распределение эритроцитов по объему, стандартное отклонение [RDW-SD], фл	41,6 [39,5-43,32]	41,9 [40,1-44,2]	0,201
Ретикулоциты [Ret], ‰	12,0 [7,5-14,8]	12,8 [8,8-19,75]	0,176
Ретикулоциты [Ret#], $\times 10^9/\text{л}$	0,067 [0,045-0,083]	0,053 [0,041-0,078]	0,679
Гемоглобин ретикулоцитов [RET-He], пг	31,4 [29,8-32,4]	30,1 [27,87-31,22]	0,023
Тромбоциты [PLT], $\times 10^9/\text{л}$	26,5 [11,6-49,1]	20,0 [11,0-43,0]	0,328
Тромбокрит [PCT], %	0,037 [0,016-0,073]	0,044 [0,022-0,081]	0,408
Средний объем тромбоцитов [MPV], фл	10,30 [9,0-12,1]	10,6 [8,9-12,6]	0,288
Анизцитоз тромбоцитов [PDW], %	15,9 [15,3-20,5]	17,85 [15,4-22,5]	0,020

Примечание. Серым цветом выделены показатели со статистической значимостью различий