



КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ НЕЗРЕЛЫХ ТРОМБОЦИТОВ

Дифференциальная диагностика тромбоцитопении

Тромбоцитопения и автоматический подсчет количества тромбоцитов

Тромбоцитопения – состояние, характеризующееся аномально низким количеством тромбоцитов: ниже нормального количества тромбоцитов у взрослых, которое варьируется от $150 \times 10^9/\text{л}$ до $450 \times 10^9/\text{л}$. При тяжелой форме тромбоцитопении, когда количество тромбоцитов составляет менее $20 \times 10^9/\text{л}$, возможно развитие спонтанного кровотечения (нетравматического характера). Игнорирование симптомов тяжелой формы тромбоцитопении может иметь серьезные последствия для пациента, поэтому получение достоверных результатов подсчета тромбоцитов крайне важно при принятии клинически важных решений.

В то же время получение точного числа тромбоцитов, особенно из тромбоцитопенических образцов пациентов, является довольно сложной лабораторной задачей. Sysmex предлагает доступное решение для подсчета тромбоцитов — PLT-F (флуоресцентный анализ тромбоцитов). Дальнейшую информацию по данной теме вы найдете в разделе «определения точного количества тромбоцитов».

Этиология тромбоцитопении

Несмотря на то, что тромбоцитопения характеризуется низким содержанием тромбоцитов, число тромбоцитов само по себе не выявляет первопричин заболевания, которые могут быть наследственными или приобретенными. Причины заболевания можно разделить на две основные категории: сниженное образование тромбоцитов в костном мозге и повышенное разрушение/потребление тромбоцитов в периферической крови. Часто диагностическая задача состоит в том, чтобы определить обусловлена ли тромбоцитопения недостаточностью костного мозга, как в случае апластической анемии (АА) или миелодиспластического синдрома (МДС), или повышенной периферической деструкцией/потреблением тромбоцитов, как при иммунной тромбоцитопении (ИТП), тромботической тромбоцитопенической пурпуре (ТТП) или диссеминированном внутрисосудистом свертывании (ДВС-синдроме). Для выявления этиологии обычно рекомендуется проводить инвазивную биопсию костного мозга.

Заключение и клиническая интерпретация

Число тромбоцитов само по себе не выявляет этиологию тромбоцитопении. Причины тромбоцитопении могут быть обусловлены сниженным образованием тромбоцитов в костном мозге или повышенным разрушением/потреблением тромбоцитов в периферической крови. IPF является установленным параметром, с помощью которого врачи определяют причину тромбоцитопении, исходя из этиологии различных врожденных и приобретенных тромбоцитопенических состояний, как описано в данном информационном буклете.

Высокое значение IPF предполагает наличие нарушений потребления тромбоцитов или врожденную макротромбоцитопению, а также может служить признаком соответствующей реакции костного мозга на тромбоцитопению. При апластических состояниях наблюдается, напротив, низкое или нормальное значение IPF (Таблица 3). Для определенных категорий пациентов может потребоваться анализ IPF, или IPF может быть определена в рамках рефлекс теста для неизвестных пациентов с тромбоцитопенией неясной этиологии.

Таблица 3 Этиология тромбоцитопении и соответствующие значения IPF. Интервалы в таблице приведены лишь в качестве рекомендации, интерпретация IPF должны всегда сопровождаться полной клинической картиной, включая клинические симптомы и другие лабораторные тесты.

Приобретенная		Наследственная
Неэффективное образование тромбоцитов	Повышенное разрушение/потребление тромбоцитов	Врожденная макротромбоцитопения
IPF 1,1 – 6,1%	IPF > 6,1%	IPF > 12%
Повреждение костного мозга <ul style="list-style-type: none"> ■ Миелодиспластические синдромы ■ Неопластическая инфильтрация костного мозга ■ Апластическая анемия, вызванная химическими веществами, лекарствами или инфекциями ■ Хроническая ИТП с апоптотическими мегакариоцитами 	Иммунные причины <ul style="list-style-type: none"> ■ Иммунная тромбоцитопения (ИТП) ■ Гепарин-индуцированная тромбоцитопения (ГИТ) II типа 	IPF > 12% <ul style="list-style-type: none"> ■ Синдром Бернара-Сулье ■ Тромбоцитопения, связанная с альфа-актиноном-1 ■ Альфа-бета-дефицитарная тромбоцитопатия ■ Вариатная форма тромбастении Гланцманна
Неэффективное образование тромбоцитов <ul style="list-style-type: none"> ■ Мегалобластная анемия 	Неиммунные причины <ul style="list-style-type: none"> ■ Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) ■ Гемолитико-уремический синдром (ГУС) ■ Диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС) ■ ГИТ I типа ■ Кровотечение 	IPF > 40% <ul style="list-style-type: none"> ■ Заболевания, связанные с мутацией гена MYH9 (аномалия Мей-Хегглина)

Ссылки

[1] **Ault A et al.** (1992): The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol.* 98(6):637 – 46.

[2] **Pons I et al.** (2010): Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. *Eur J Haematol.* 85(2):158 – 63.

[3] **Guthikonda S et al.** (2008): Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 52(9):743 – 9.

[4] **Zucker MJ et al.** (2006): Immature platelet fraction as a predictor of platelet recovery following hematopoietic progenitor cell transplantation. *Lab Hematol.* 12(3):125 – 30.

[5] **Cho YG et al.** (2007): Clinical usefulness of the simple technique to diagnose thrombocytopenia using immature platelet fraction. *Korean J Lab Med.* 27(1):1 – 6.

[6] **Pekelharing JM et al.** (2010): Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. *Sysmex J Int.* 20(1):1 – 11.

[7] **Ko YJ et al.** (2013): Establishment of reference interval for immature platelet fraction. *Int J Lab Hematol.* 35(5):528 – 33.

[8] **Sysmex Corporation** (2014): Reference ranges analysis document for XN series.

[9] **Seo A et al.** (2015): Reference intervals for immature platelet fraction and immature platelet count. *Int J Lab Hematol.* 37(1):e1 – 2.

[10] **Briggs C et al.** (2004): Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 126(1):93 – 9.

[11] **Kickler T et al.** (2006): A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol.* 125(2):282 – 7.

[12] **Jung H et al.** (2010): Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. *Korean J Lab Med.* 30(5):451 – 9.

[13] **Cremer M et al.** (2004): Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 144(4):619 – 21.

[14] **Solberg HE.** (2004): The IFCC recommendation on the estimation of reference intervals. *The RefVal program.* *Clin Chem Lab Med.* 42(7):710 – 4.

[15] **Abe Y et al.** (2006): A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res.* 118(4):463 – 9.

[16] **Cannavo I et al.** (2010): Assessment of an immature platelet fraction (IPF%) in the diagnosis of thrombocytopenia. *Ann Biol Clin (Paris).* 68(4):415 – 20.

[17] **Strauss G et al.** (2011): Immature platelet count: a simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer.* 57(4):641 – 7.

[18] **Adly AA et al.** (2015): Evaluation of the immature platelet fraction in the diagnosis and prognosis of childhood immune thrombocytopenia. *Platelets.* 26(7):645 – 50.

[19] **Sakuragi M et al.** (2015): Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. *Int J Hematol.* 101(4):369 – 75.

[20] **Cremer M et al.** (2016) Thrombocytopenia and platelet transfusion in the neonate. *Semin Fetal Neonatal Med.* 21(1):10 – 8.

[21] **Miyazaki K et al.** (2015): Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. *Hematology.* 20(10):587 – 92.

[22] **Sokolic R et al.** (2015): Assessment of immature platelet fraction in the diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Front Pediatr.* 3:1 – 10.

[23] **Gerrits AJ et al.** (2015): Effects of eltrombopag on platelet count and platelet activation in Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia. *Blood* 126(11):1367 – 78.

[24] **Tanaka Y et al.** (2014): Performance Evaluation of Platelet Counting by Novel Fluorescent Dye Staining in the XN-Series Automated Hematology Analyzers. *J Clin Lab Anal.* 28(5):341 – 8.

[25] **Park S et al.** (2014): The Sysmex XN-2000 Hematology Autoanalyzer Provides a Highly Accurate Platelet Count than the Former Sysmex XE-2100 System Based on Comparison with the CD41/CD61 Immuno-platelet Reference Method of Flow Cytometry. *Ann Lab Med.* 34(6):471 – 4.

Получите новые знания из общедоступных информационных буклетов компании Sysmex: www.sysmex.ru/whitepapers

Дифференциальная диагностика тромбоцитопении

Дифференциальная диагностика тромбоцитопении – сложная задача, требующая изучения анамнеза пациента, оценки клинических симптомов, проведения тестов на функциональную активность тромбоцитов и оценки параметров тромбоцитов, выделенных из крови. Традиционно клиницисты использовали средний объем тромбоцитов (MPV) в качестве суррогатного маркера образования тромбоцитов, поскольку незрелые тромбоциты занимают, как правило, больший объем крови, чем зрелые. Тем не менее, присутствие шизоцитов, микроцитов или других частиц, имеющих объем аналогичный тромбоцитам, может сделать MPV недостоверным. Кроме того, значения MPV неточны или их невозможно определить в образцах с очень низким количеством тромбоцитов, для которых данные об образовании тромбоцитов необходимы в первую очередь.

Фракция незрелых тромбоцитов (IPF) является более точным маркером образования тромбоцитов и отражает процент незрелых тромбоцитов от их общего количества. Она была описана в 1992 году Ault с соавторами, которые ввели термин «ретикулярные тромбоциты», обозначающий вновь образованные тромбоциты с повышенным содержанием РНК, количество которых соотносится с активностью мегакариоцитов [1]. IPF – воспроизводимый параметр, хорошо коррелирующий с количеством ретикулярных тромбоцитов, полученным методом проточной цитометрии с использованием антител CD61 [2]. Несмотря лишь на частичную корреляцию с MPV, незрелые тромбоциты занимают, как правило, больший объем крови, чем зрелые: в ходе одного исследования было установлено, что 61% ретикулярных тромбоцитов были в терциле, содержащем тромбоциты наибольшего размера,

Референсные интервалы IPF

В ряде исследований были установлены диапазоны нормальных значений для IPF на анализаторах Sysmex серий XE и XN [4–12]. В целом, результаты данных исследований согласуются друг с другом, в референсном диапазоне примерно 1,1–6,1%. В одном исследовании был установлен диапазон нормальных значений IPF у новорожденных: 0,7–7,9% [13]. Тем не менее, соответствие референсных интервалов должно всегда проверяться для исследуемой категории пациентов в соответствии с методом, рекомендованным Международной федерацией клинической химии и лабораторной медицины [14].

Тромбоцитопения с повышенным IPF может служить признаком повышенной деструкции тромбоцитов в периферической крови, потери тромбоцитов или наследственной макроцитопении.

в то время как 32% и 7% находились в среднем и малом терцилях соответственно [3]. Кроме того, незрелые тромбоциты обладают большей реактивностью, чем зрелые. Они содержат большее количество РНК и способны образовывать различные протеины, характерные для активных тромбоцитов (например, гликопротеин IIb/IIIa, P-селектин) [3].

Тромбоцитопения с нормальным или пониженным значением IPF может служить признаком сниженного образования тромбоцитов в костном мозге.

В ряде публикаций было отмечено, что IPF, полученный на анализаторах Sysmex серий XE и XN, выше у пациентов с тромбоцитопенией, вызванной избыточным разрушением/потреблением тромбоцитов, чем у пациентов с тромбоцитопенией, вызванной сниженным образованием тромбоцитов в костном мозге [2, 5, 10–12, 15–19]. Например:

- Briggs с соавт. (2004) наблюдали пациентов с ИТП и ТТП, вызванной в обоих случаях избыточным потреблением тромбоцитов: значения IPF были значительно выше у этих двух групп пациентов, в то время как у пациентов, проходящих химиотерапию (вызывающую снижение образования тромбоцитов в костном мозге), и пациентов с ИТП и ТТП в состоянии ремиссии значения IPF были в норме (Рис. 1) [10].

- По результатам исследования Kickler с соавт. (2006) высокие значения IPF были отмечены у пациентов с тромбоцитопенией с повышенным разрушением тромбоцитов, в то время как у пациентов со сниженным образованием тромбоцитов были отмечены нормальные или чуть повышенные значения (Таблица 1) [11].

- Abe с соавт. (2006) использовали величину IPF, равную 7,7%, для получения чувствительности 86,8% и специфичности 92,6% при дифференциальной диагностике ИТП и АА. Кроме того, значение IPF было намного информативнее среднего объема тромбоцитов [15].

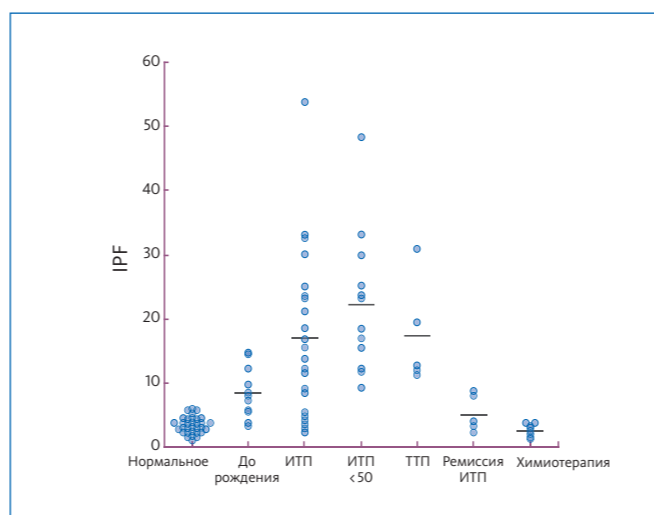


Рис. 1 Значения IPF в различных группах пациентов. ИТП: иммунная тромбоцитопения; ИТП < 50: пациенты с ИТП с количеством тромбоцитов менее $50 \times 10^9/\text{л}$; ТТП: тромбоцитическая тромбоцитопеническая пурпура; химиотерапия: пациенты, проходящие химиотерапию. На основе исследования Briggs с соавт [10].

- Jung с соавт. (2010) установили, что IPF выше у пациентов с ИТП, чем у пациентов с АА, и что для разграничения ИТП и АА можно использовать величину IPF, равную 7,3%, для получения чувствительности 54,0% и специфичности 92,2% [12]. (Меньшая чувствительность по сравнению с исследованием Abe с соавт. может быть связана с разными когортами пациентов: как правило, у пациентов с острой ИТП высокое значение IPF, в то время как у пациентов в состоянии ремиссии также может быть нормальное значение IPF.)

- Strauss с соавт. (2011) проводили исследование среди детей с тромбоцитопенией и установили, что IPF была низкой у детей с нарушениями образования тромбоцитов, в то время как у пациентов с ИТП с ускоренным обновлением тромбоцитов она была существенно выше [17].

- Sakuragi с соавт. (2015) установили, что IPF, полученная на анализаторах серии XN, имела более высокую точность и испытывала меньшее влияние интерференций, чем IPF, полученная на анализаторах серии XE. Использование величины IPF, равной 5,8%, позволило добиться чувствительности 85,1% и специфичности 89,3% при дифференциальной диагностике ИТП и апластической тромбоцитопении [19].

Таким образом, параметр IPF позволяет оценить образование тромбоцитов в костном мозге и дифференцировать тромбоцитопению, вызванную сниженным образованием тромбоцитов в костном мозге, и тромбоцитопению, вызванную повышенным разруше-

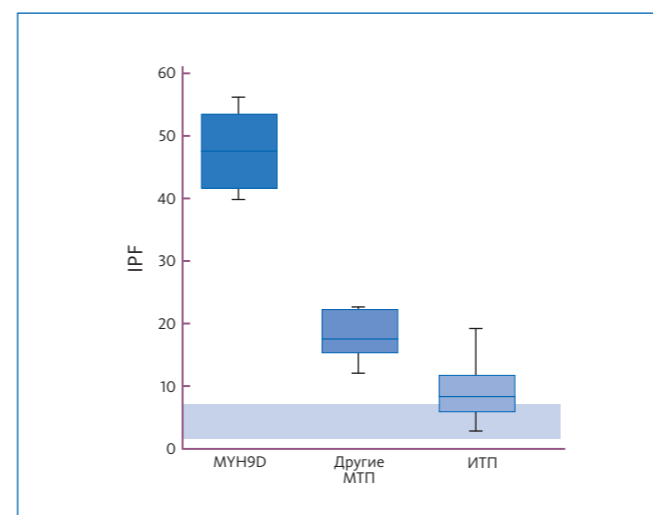


Рис. 2 Значения IPF в различных группах пациентов. MYH9: заболевания, связанные с мутацией гена MYH9; МТП: макроцитопения; ИТП: иммунная тромбоцитопения. На основе исследования Miyazaki с соавт [21].

нием/потреблением тромбоцитов. Данный параметр позволяет получить дополнительную информацию, которая может помочь избежать проведения инвазивной биопсии костного мозга.

Влияние IPF на дифференциальную диагностику врожденной тромбоцитопении

IPF также может помочь в дифференциальной диагностике предполагаемой врожденной тромбоцитопении. Врожденная тромбоцитопения обычно предполагается в случае тромбоцитопении новорожденных, проявления симптомов кровотоочности в детском возрасте, генетической предрасположенности к тромбоцитопении или отсутствия влияния лечения ИТП на число тромбоцитов.

При дифференциальной диагностике наследственной тромбоцитопении часто используется MPV [20], однако, как упоминалось ранее, MPV подвержен влиянию интерференций, и во многих случаях его значение является неточным или его невозможно определить в образцах с очень низким количеством тромбоцитов.

В ряде недавних публикаций описывается, как IPF может способствовать дифференциальной диагностике врожденной тромбоцитопении. Например, Miyazaki с соавт. (2015) выявили, что IPF была в пять раз выше у пациентов с заболеваниями, связанными с мутацией гена MYH9 (аномалия Мей-Хегглина), ($48,6\% \pm 1,9$) и примерно в два раза выше у пациентов с другими макроцитопеническими состояниями ($18,4\% \pm 2,1$), по сравнению с пациентами с ИТП с аналогичным количеством тромбоцитов ($9,2\% \pm 0,3$) (Рис. 2) [21]. В то же время у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича

с врожденной микроцитопенией значение IPF было ниже, чем можно было бы ожидать для такого уровня тромбоцитопении, и IPF у данных пациентов было ниже, чем у пациентов с ИТП [22]. Аналогичные выводы были получены в наблюдении за семью детьми с синдромом Вискотта-Олдрича, у которых абсолютное содержание IPF было ниже, чем у пациентов аналогичной возрастной группы с хронической ИТП [23].

Таблица 1 Значения IPF в различных группах пациентов. ИТП: иммунная тромбоцитопения; ДВС: диссеминированное внутрисосудистое свертывание; АА: апластическая анемия; ПНГ: пароксизмальная ночная гемоглобинурия; *: статистическое значение p по сравнению со здоровыми представителями контрольной группы; NS3: не являющийся статистически значимым по сравнению с контрольной группой. На основе исследования Kickler с соавт [11].

Пациент	Объем выборки	Среднее значение	p*
Здоровый	80	3,1	–
Разрушение			
ИТП	37	15,0	<,0001
ДВС	25	9,5	<,0001
Все – разрушение	62	12,8	<,0001
Подавление			
АА/ПНГ	3	6,1	,019
Рак	16	3,8	NS
Все – подавление	19	4,1	,05

Сложности определения точного количества тромбоцитов

Как правило, автоматические гематологические анализаторы позволяют добиться достоверного и точного подсчета количества тромбоцитов на основе импедансного метода (PLT-I). Тем не менее, интерферирующие частицы могут стать причиной неправильного завышенного количества, в то время как точность может быть ограничена в случае тяжелой формы тромбоцитопении у пациентов (количество тромбоцитов $\leq 20 \times 10^9/\text{л}$), так как низкий уровень тромбоцитов ограничивает количество анализируемых клеток. В рамках решения данной проблемы анализаторы серии XN могут выполнять рефлекс тестирование с применением альтернативных методов проточной цитометрии (PLT-O (оптический подсчет тромбоцитов) или PLT-F (флуоресцентный

анализ тромбоцитов)) в случае предполагаемого наличия интерферирующих частиц или тяжелой тромбоцитопении (Таблица 2). В анализаторах серии XN, имеющих функции PLT-I и PLT-O, алгоритм переключения автоматически определяет необходимость рефлекс измерения PLT-O для получения точного количества тромбоцитов. В анализаторах, оснащенных PLT-I и PLT-F, в случае необходимости в проведении рефлекс измерения в PLT-F оно проводится аналогичным образом. Особенно в случае подозрения на тяжелую тромбоцитопению требуется более точный подсчет для получения надежных результатов и уверенного принятия клинически важных решений. В этом случае PLT-F является предпочтительным методом.

Таблица 2 Сравнительная характеристика различных методов подсчета тромбоцитов, доступных на анализаторах Sysmex XN-серии

	Импедансный подсчет (PLT-I)	Оптический подсчет (PLT-O)	Флуоресцентный анализ (PLT-F)
Схема работы	Стандартный автоматизированный метод	Обычно рефлекс тестирование	Обычно рефлекс тестирование
Анализ	Часть общего анализа крови	Часть подсчета ретикулоцитов	Подсчет только тромбоцитов
Точность, достоверность и интерференции	<ul style="list-style-type: none"> ■ Низкая точность при количестве тромбоцитов $< 20 \times 10^9/\text{л}$ ■ Низкая достоверность для образцов с интерференциями, т.е. содержащих частицы с объемом аналогичным объему тромбоцитов (кристаллы реагента, пузырьки воздуха, микроциты, фрагменты эритроцитов) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Низкая точность при количестве тромбоцитов $< 20 \times 10^9/\text{л}$ ■ Высокая достоверность при наличии аномалий эритроцитов ■ Низкая достоверность для образцов с фрагментами лейкоцитов (апоптоз/некроз) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Высокая точность вплоть до количества тромбоцитов = $3 \times 10^9/\text{л}$ вследствие пятикратного объема подсчета ■ Практически отсутствуют интерференции ■ Сравним с эталонным методом (CD41/CD61) (CD41/CD61) [24, 25]
Диагностические параметры, кроме количества тромбоцитов	PDW, MPV, PCT, P-LCR	Нет	IPF, КОЛИЧЕСТВО IPF