

# Динамика функциональной активности тромбоцитов и гемостатического статуса у ребенка с хронической иммунной тромбоцитопенией на терапии ромиплостимом

Е.В. Сунцова, А.А. Игнатова, А.В. Пшонкин, И.В. Серкова, А.А. Масчан, Г.А. Новичкова, М.А. Пантелеев

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Иммунная тромбоцитопения (ИТП) характеризуется изменением как количества, так и качества тромбоцитов. В результате этого тяжесть кровотечений не всегда коррелирует со степенью тромбоцитопении. Если пациент находится на терапии, оценка качества тромбоцитов дополнительно усложняется. Наиболее многообещающим методом исследования тромбоцитов при ИТП является проточная цитометрия. В данном сообщении описан клинический случай наблюдения за динамикой состояния ребенка с хронической ИТП на терапии ромиплостимом в течение 50 недель с использованием проточной цитометрии для контроля функциональной активности тромбоцитов.

**Ключевые слова:** иммунная тромбоцитопения, функциональная активность тромбоцитов.

## Dynamics of platelet functional activity and hemostatic status in a child with chronic immune thrombocytopenia on romiplostim treatment

E.V. Suntsova, A.A. Ignatova, A.V. Pshonkin, I.V. Serkova, A.A. Maschan, G.A. Novichkova, M.A. Panteleev

Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Immune thrombocytopenia (ITP) is characterized by changes in both quantity and quality of platelets. As a result, severity of bleeding does not always correlate with the degree of thrombocytopenia. The quality of platelets on treatment becomes difficult to evaluate. The most promising method to investigate quality of platelets in ITP is flow cytometry. Here we describe a clinical case of monitoring of a pediatric ITP patient status on romiplostim treatment for 50 weeks using flow cytometry for platelet functional activity control.

**Key words:** immune thrombocytopenia, platelet function.

**И**ммунная тромбоцитопения (ИТП) – приобретенное аутоиммунное заболевание, при котором вырабатываются антитела против собственных тромбоцитов пациента. Это ведет к ускорению их клиренса, тромбоцитопении и кровотечениям. Кроме того, антитела влияют на качество тромбоцитов, ухудшая их функциональную активность [1]. В частности, недавние исследования показали прямую способность ряда антител активировать циркулирующие тромбоциты [2]. В результате при одинаковом уровне тромбоцитов одни пациенты могут чувствовать себя хорошо, а у других происходят тяжелые кровотечения из-за нарушенной функциональности тромбоцитов [3].

Агонисты тромбопозитивного рецептора (ТПО-РА) – это новое поколение препаратов, которые применяют для терапии ИТП. Они могут влиять как на количество, так и на качество тромбоцитов [4–6]; то же свойство имеет ряд других применяемых при ИТП препаратов [7]. Наше собственное исследование состояния тромбоцитов у детей с ИТП показало, что изначально преактивированные тромбоциты приходят в норму во время терапии, и у ряда пациентов это коррелирует с нормализацией гемостаза, независимо от повышения количества тромбоцитов [6].

В данном сообщении описан яркий клинический случай наблюдения за динамикой состояния ребенка с хронической ИТП на терапии ромиплостимом в

### Контактная информация:

Пантелеев Михаил Александрович, д-р физ.-мат. наук, профессор, заведующий лабораторией клеточного гемостаза и тромбоза Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1. Тел.: +7 (495) 287-6570, доб. 6932. E-mail: mapanteleev@yandex.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-3-69-72

### Correspondence:

Mikhail A. Panteleev, PhD, DSc, Head of the Laboratory of cellular hemostasis and thrombosis of Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation. Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1. Tel.: +7 (495) 287-6570, ext. 6932. E-mail: mapanteleev@yandex.ru

течение 50 недель с использованием проточной цитометрии для контроля статуса тромбоцитов. Несмотря на то что на начальном этапе терапии не было стабильного повышения уровня тромбоцитов, их качество непрерывно улучшалось, и геморрагический синдром разрешился.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Функциональную активность тромбоцитов исследовали, как описано в литературе [6, 8]. Кровь забирали в пробирку с 106 мМ (3,2%) цитрата натрия – соотношение кровь:цитрат = 9:1. Разведенную цельную кровь инкубировали с мепакрином для окраски плотных гранул, затем образцы стимулировали пептидами-активаторами тромбинового и коллагенового рецепторов и инкубировали с антителами против ключевых тромбоцитарных антигенов: PAC1-FITC, CD42b-PE, CD62P-Alexa 647, CD61-PE, Annexin V-Alexa 647 (Biolegend, San Diego, California, USA). Измерение функциональной активности тромбоцитов в покое и после стимуляции производили в цельной крови на проточном цитофлуориметре Novocyte (Acea Bioscience, San Diego, California, USA).

### Описание клинического случая

Девочка, 14 лет (2001 г. р.), поступила в ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в апреле 2016 года с жалобами на синяки, множественные точечные высыпания по всей поверхности тела, носовые и десневые кровотечения.

Из анамнеза заболевания: девочка больна с марта 2014 года, когда впервые внезапно появились множественные синяки и петехиальная сыпь по всей поверхности кожи туловища и конечностей, стали беспокоить носовые и десневые кровотечения. На основании развития типичного геморрагического синдрома и выявленной в общем анализе крови изолированной тромбоцитопении (тромбоциты –  $4 \times 10^9/\text{л}$ )

после исключения других вероятных причин развития тромбоцитопении был установлен диагноз «ИТП, впервые выявленная, тяжелая форма». Девочка начала получать специфическую терапию ИТП: преднизолон – 2 мг/кг/сут, *per os*, 10 дней с постепенной отменой (количество тромбоцитов кратковременно нормализовалось, но через неделю вновь снизилось до  $9 \times 10^9/\text{л}$ ). Был проведен курс метилпреднизолона (МП) в дозе 28 мг/м<sup>2</sup>/сут, внутривенно, в течение 4 дней (число тромбоцитов вновь кратковременно нормализовалось).

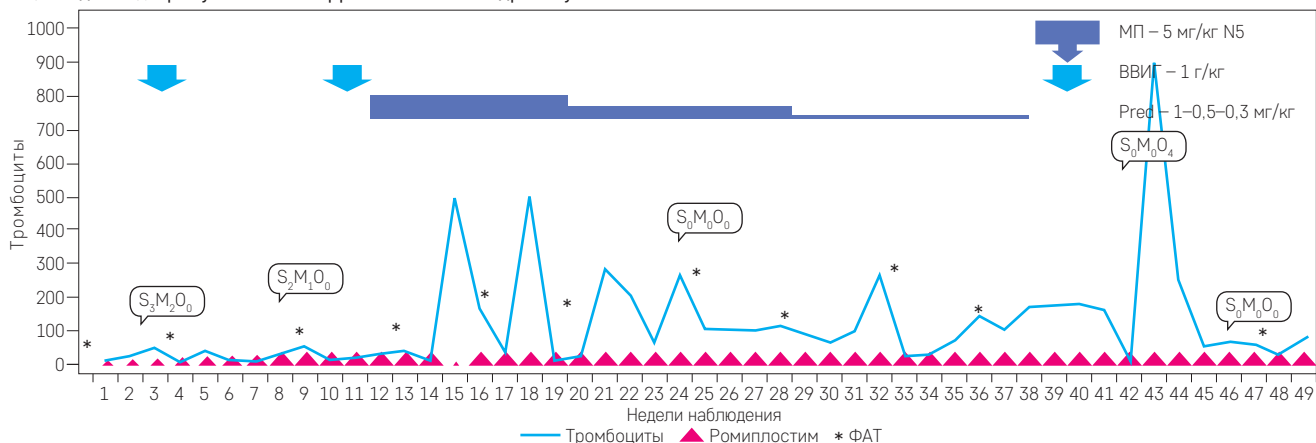
В дальнейшем, учитывая отсутствие стойкого ответа на терапию первой линии, была начата терапия альфа-интерфероном. Ее продолжительность составила 17 мес. (во время терапии количество тромбоцитов было  $30\text{--}50 \times 10^9/\text{л}$ , после ее отмены снизилось до  $5 \times 10^9/\text{л}$ ). В связи с хроническим течением ИТП пациентка была направлена в ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева для подбора дальнейшей терапии.

Осмотр при поступлении: девочка нормально телосложения, масса тела – 44 кг, рост – 148 см. Кожные покровы обычной окраски, геморрагический синдром полиморфный, в виде множественных «свежих» экхимозов, петехиальных элементов; слизистые ротовой полости чистые, в левом носовом ходе – геморрагические корочки. Накануне происходили умеренной интенсивности носовое и десневое кровотечения. Сердечно-легочная деятельность удовлетворительная. Живот мягкий, безболезненный. Печень и селезенка не увеличены. Физиологические отправления в норме.

При лабораторном обследовании в общем анализе крови выявлена тромбоцитопения ( $0 \times 10^9/\text{л}$ ), легкая анемия (гемоглобин – 111 г/л), лейкоциты и лейкоцитарная формула – в норме (число лейкоцитов –  $4,88 \times 10^9/\text{л}$ , сегментоядерные нейтрофилы – 40%, моноциты – 7%, лимфоциты – 48%, эозинофилы – 5%). Биохимический анализ крови и коагулограмма – в норме. Проба Кумбса – отрицательная; ВИЧ,

### Рисунок 1

Полная динамика терапии, тромбоцитарного и клинического ответов у пациента: количество тромбоцитов (сплошная линия), введение ромиплостима (красные треугольники), точки проведения исследования функциональной активности тромбоцитов (звездочки), присутствие геморрагического синдрома указано по SMO-шкале [9]



гепатит В, С, ПЦР ЦМВ, ЭВВ, парвовирус В19 – отрицательные. По данным миелограммы: костный мозг нормоклеточный, полиморфный по составу, мегакариоцитарный росток расширен, мегакариоциты без видимой «отшнуровки» тромбоцитов. Стандартная цитогенетика костного мозга – 46 XX.

В связи с экстремально низким количеством тромбоцитов и выраженным геморрагическим синдромом проведен курс ВВИГ в дозе 1 г/кг, получен полный тромбоцитарный ответ (число тромбоцитов –  $337 \times 10^9/\text{л}$ ), сохранявшийся в течение 7 дней.

После обследования у девочки был подтвержден диагноз: ИТП, хроническое течение; назначена терапия ТПО-РА (ромиплостим). Терапию ромиплостимом начали со стартовой дозы 1 мкг/кг; еженедельно дозу увеличивали на 1 мкг/кг до максимальной дозы – 10 мкг/кг/нед с целью достижения стабильного количества тромбоцитов выше  $50 \times 10^9/\text{л}$ . Максимальная доза была достигнута к 10-й неделе терапии. В связи со снижением количества тромбоцитов в качестве дополнительной терапии на 4-й и 14-й неделях назначили повторные курсы ВВИГ – 1 г/кг. С 16-й недели терапии ромиплостимом была назначена базовая терапия преднизолоном – 1 мг/кг/сут *per os* с постепенным снижением дозы до 0,5 мг/кг к 22-й неделе и до 0,3 мг/кг к 32-й неделе, далее терапию преднизолоном продолжали в этой же дозе. Полный тромбоцитарный ответ был достигнут на комбинированной терапии с 32-й недели.

Девочка была выписана для наблюдения по месту жительства. На 42-й неделе терапии ромиплостимом состояние девочки ухудшилось: на фоне начала первых в жизни месячных развилось обильное маточное кровотечение, сопровождавшееся слабостью, обморочным состоянием, потерей тромбоцитарного ответа и тяжелой постгеморрагической анемией (тромбоциты –  $4 \times 10^9/\text{л}$ ; гемоглобин – 73 г/л). Девочка была госпитализирована в стационар по месту жительства, где получала пульс-терапию МП, ВВИГ и заместительные трансфузии эритроцитарной массой. Терапию ромиплостимом не прерывали. В результате проведенной терапии удалось достичь повышения количества тромбоцитов, доза преднизолона была снижена до поддерживающей – 0,4 мг/кг/сут. В дальнейшем сохранялся парциальный тромбоцитарный ответ (количество тромбоцитов  $35\text{--}80 \times 10^9/\text{л}$ ) без признаков геморрагического синдрома.

#### Динамика лабораторных показателей

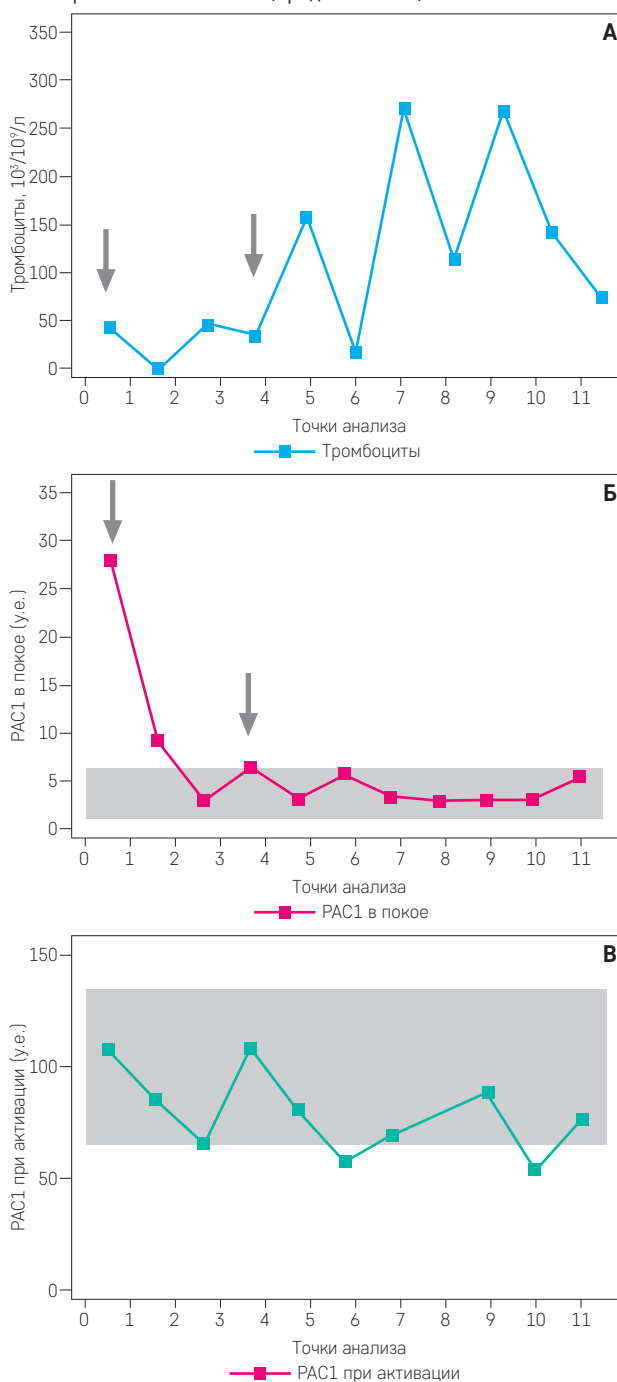
В период наблюдения пациентки в ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева с целью оценки эффективности и переносимости терапии ромиплостимом проводили регулярный контроль показателей общего анализа крови с морфологическим исследованием мазков периферической крови и биохимических по-

казателей сыворотки крови. Кроме того, до начала терапии ромиплостимом и далее, во время ее проведения, регулярно (до 40-й недели терапии) исследовали функциональную активность тромбоцитов методом проточной цитометрии (рис. 1).

На рисунке 2 динамика тромбоцитов в точках этого исследования (панель А) представлена параллельно с ключевым индикатором активности тромбоцитов, степенью активации главных агрегационных

**Рисунок 2**

Функциональная активность тромбоцитов (ФАТ) на фоне терапии ромиплостимом: **А** – число тромбоцитов в точках, где измерялась ФАТ, стрелки указывают на геморрагический синдром; терапия начата между точками 1 и 2; **Б** – количество активных интегринов в покое; **В** – количество активных интегринов при стимуляции; серая область – референсный интервал нормальных значений (среднее  $\pm 2SD$ )



интегринов  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (антитело PAC1) в покое (панель Б) и при сильной стимуляции (панель В). Несмотря на нормальный ответ тромбоцитов при сильной стимуляции, исходно они существенно преактивированы в циркуляции. На терапии этот показатель монотонно уменьшается до нормальных значений. Те же результаты наблюдались и по другим маркерам активации (эти данные не представлены на *рис. 2*). Несмотря на то что по количеству тромбоцитов в первых семи точках показатели пациента регулярно опускались ниже первоначального значения (иногда экстремально ниже), тяжесть кровотечения никогда не была такой же. Только в точке 4 наблюдался легкий геморрагический синдром (при этом преактивированность тромбоцитов как раз в этой точке немного вышла за пределы нормы).

К сожалению, из-за отсутствия пациентки в Москве не было возможности оценить статус тромбоцитов во время тяжелых кровотечений на 42-й неделе терапии. Однако можно предположить, что исключительность произошедшего события (первые месячные) в любом случае не позволяет сопоставлять данные с предыдущим периодом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наблюдения описанного клинического случая, а именно отсутствие однозначной корреляции между числом тромбоцитов и тяжестью кровотечений, сопоставимы с описанными в литературе.

Среди пациентов, получавших терапию ромиплостимом и наблюдавшихся в ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, и описанных в литературе, данный случай наиболее ярко иллюстрирует возможность клинического и функционального (по лабораторным показателям активности тромбоцитов) ответов в отсутствие стабильного повышения количества тромбоцитов. Инновационные методы мониторинга функционального состояния тромбоцитов, такие как проточная цитометрия, могут дать дополнительную информацию для прогнозирования риска развития кровотечения и оценки эффективности терапии. Более объемные, статистически значимые исследования в этой области необходимы для разработки рекомендаций о возможностях такого мониторинга.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Разработка, валидация, стандартизация и апробация метода мониторинга статуса тромбоцитов при ИТП поддержаны грантом от фонда «Врачи, инновации, наука – детям», грантом РФФИ 17-04-01309, грантом Президента РФ для молодых докторов наук МД-229.2017.4 и грантом по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## ORCID

**Е.В. Сунцова** <http://orcid.org/0000-0001-8404-1800>

**А.В. Пшонкин** <http://orcid.org/0000-0002-2057-2036>

**Г.А. Новичкова** <http://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

**М.А. Пантелеев** <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

## Литература

- van Bladel E.R., Laarhoven A.G., van der Heijden L.B., Heitink-Polle K.M., Porcelijn L., van der Schoot C.E., et al. Functional platelet defects in children with severe chronic ITP as tested with 2 novel assays applicable for low platelet counts. *Blood* 2014; 123: 1556–63.
- Li J., van der Wal D.E., Zhu G., Xu M., Yougbare I., Ma L., et al. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun* 2015; 6: 7737.
- Frelinger A.L., 3rd, Grace R.F., Gerrits A.J., Berny-Lang M.A., Brown T., Carmichael S.L., et al. Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP. *Blood* 2015; 126: 873–9.
- Psaila B., Bussel J.B., Linden M.D., Babula B., Li Y., Barnard M.R., et al. In vivo effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation. *Blood* 2012; 119: 4066–72.
- Haselboeck J., Kaider A., Pabinger I., Panzer S. Function of eltrombopag-induced platelets compared to platelets from control patients with immune thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2013; 109: 676–83.
- Suntsova E.V., Demina I.M., Ignatova A.A., Ershov N.M., Trubina N.M., Dobrynina J., et al. Bleeding tendency and platelet function during treatment with romiplostim in children with severe immune thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2017; 105: 841–8.
- Korkmaz S., Uslu A.U., Aydin B., Dogan O., Sencan M. Pre-treatment and post-treatment changes in platelet indices in patients with immune thrombocytopenia. *Saudi Med J* 2013; 34: 591–6.
- Ignatova A.A., Karpova O.V., Trakhtman P.E., Rumiantsev S.A., Panteleev M.A. Functional characteristics and clinical effectiveness of platelet concentrates treated with riboflavin and ultraviolet light in plasma and in platelet additive solution. *Vox Sang* 2016; 110: 244–52.
- Rodeghiero F., Michel M., Gernsheimer T., Rugged M., Bianchette V., Bussel J.B., et al. Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group. *Blood* 2013; 121: 2596–606.