

Zespół szarych płytek

Gray platelet syndrome

Anna Szumera-Ciećkiewicz, Monika Prochorec-Sobieszek

Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie

Zespół szarych płytek (GPS) jest rzadko występującym, wrodzonym, dziedzicznym w sposób autosomalny recesywny lub dominujący zaburzeniem czynności płytek krwi, które jest przyczyną skazy krwotocznej. Jego nazwa pochodzi od charakterystycznego szarego koloru płytek w barwieniu Wrighta-Giemsy w rozmazach krwi, co jest związane ze zmniejszonym gromadzeniem ziarnistości α . W ostatnich 4 latach dokonano przełomowych odkryć dotyczących identyfikacji genów odpowiedzialnych za ten zespół, obejmujących mutacje genów *NBEAL2* (neurobeaching-like 2) i *GFI1B* (growth factor independent 1B). U większości pacjentów z GPS występują małopłytkowość i krwawienia o umiarkowanym lub łagodnym nasileniu, a chorzy mają predyspozycję do rozwoju mielofibrozy i wtórnej splenomegalii. Diagnostyka laboratoryjna i genetyczna GPS jest trudna i obejmuje nabyte trombocytopatie oraz inne, częstsze, wrodzone zaburzenia czynności płytek krwi. W artykule przedstawiono patogenezę, podłoże genetyczne i kryteria rozpoznania GPS.

Słowa kluczowe: zespół szarych płytek, małopłytkowość, patogenezę

Hematologia 2014; 5, 2: 115–121

Abstract

Gray platelet syndrome (GPS) is a rare congenital condition mostly inherited as an autosomal recessive disorder of platelet function, resulting in bleeding diathesis. Its name originates from the characteristic gray color of platelets in Wright-Giemsa stained blood smears. Decreased accumulation of α granules is identified by electron microscopy. A significant breakthrough on identifying mutations of two genes, *NBEAL2* (neurobeaching-like 2) and *GFI1B* (growth factor independent 1B), in GPS pathogenesis was recently reported. Patients with GPS present thrombocytopenia, a mild to severe propensity for bleeding, and they are prone to myelofibrosis and splenomegaly. Diagnosis of GPS is difficult and includes other, more frequent congenital platelet dysfunctions and acquired thrombocytopathies. This article presents the pathogenesis, with a molecular background, and the diagnostic criteria of gray platelet syndrome.

Key words: gray platelet syndrome, thrombocytopenia, pathogenesis

Hematologia 2014; 5, 2: 115–121

Adres do korespondencji: Anna Szumera-Ciećkiewicz, Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 65 00; faks: 22 349 64 94, e-mail: szumann@gmail.com

Wprowadzenie

W 1971 roku Giuseppe Raccuglia po raz pierwszy opisał przypadek nietypowego zaburzenia jakościowego płytek krwi (PLT, *platelets*), który określił mianem zespołu szarych płytek (GPS, *gray platelet syndrome*) [1]. Praca dotyczyła szczegółów budowy PLT zaobserwowanych w mikroskopie elektronowym, ocenianych z materiału pochodzącego od mężczyzny z małopłytkowością po splenektomii i leczonego kortykosteroidami. Stwierdzono podwyższony odsetek dużych płytek pozbawionych ziarnistości; ich charakterystyczny szary kolor był widoczny w barwieniu Wrighta w rozmazach krwi. Badania biochemiczne wykazały również obniżone stężenie płytkowego adenozyno-5'-trifosforanu (ATP, *adenosine triphosphate*) i brak fosfatydyloseryny. Kolejne badania pozwoliły na potwierdzenie ultrastruktury płytek, sformułowanie definicji i zaklasyfikowanie GPS do wrodzonych zaburzeń czynności płytek spowodowanych upośledzonym gromadzeniem ziarnistości α i ciałek gęstych [2–4]. Dotychczas opisano około 100 przypadków sporadycznego i rodzinnego występowania GPS, a w ostatnich 4 latach dokonano przełomowych odkryć dotyczących identyfikacji genów odpowiedzialnych za ten zespół [5–7].

Najczęstsze przyczyny zaburzonej czynności PLT mają podłoże nabyte i mogą obejmować zarówno niepożądane działania leków (np. niesteroidowe leki przeciwzapalne, leki przeciwhistaminowe, metyloksantyny, antagoniści wapnia, halotan, barbiturany, kwasy żółciowe i niektóre antybiotyki), jak i współistniejące choroby, między innymi przewlekłe uszkodzenie wątroby czy mocznicę [8]. Wrodzone zaburzenia PLT natomiast stanowią heterogenną grupę rzadkich chorób, obejmujące defekty ilościowe i jakościowe. Podział wyżej wymienionych chorób można przedstawić na różne sposoby, między innymi ze względu na: wielkość PLT, typ zaburzenia genetycznego i sposób dziedziczenia, zewnętrzny lub wewnętrzny defekt płytek, przebieg kliniczny i współistnienie małopłytkowości. Najbardziej czytelna wydaje się klasyfikacja obejmująca patogenezę tych chorób. Do głównych grup zalicza się choroby związane z obniżoną liczbą PLT, ich nieprawidłową czynnością, zaburzeniami sekrecji i/lub transdukcji sygnału i brakiem ziarnistości. W tabeli 1 przedstawiono niniejszy podział z uwzględnieniem podłoża genetycznego.

Patogeneza i genetyka

Na podstawie badań ultrastrukturalnych dowiedziono, że zaburzenia czynności PLT w GPS

wynikają z braku lub zmniejszenia liczby ziarnistości α . Budowa pozostałych struktur płytek, takich jak: ciałka gęste, peroksysomy, lizosomy oraz liczba i budowa mitochondriów, jest zachowana. Ziarnistości α gromadzą substancje pierwotnie syntetyzowane w megakariocytach, takie jak: płytkowy czynnik 4, β -tromboglobulina, czynnik von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*), płytkopochodny czynnik wzrostu, transformujący czynnik wzrostu β_1 ; równocześnie mają one zdolność pobierania substancji z krwi na drodze biernej lub aktywnej endocytozy — w ten sposób zapewniany jest dostęp do czynnika V, fibrynogenu i immunoglobulin IgG [2, 4, 9, 10]. Patogeneza skazy krwotocznej w GPS jest złożona. U jej podstawy leży przede wszystkim niezdolność megakariocytów do efektywnego „zapakowywania” endogennie wytworzonych białek w prekursorowe ziarnistości α , natomiast niedobór wyżej wymienionych białek wpływa na upośledzenie prawidłowego przylegania płytek i zapewnienie hemostazy. Ponadto w GPS stwierdzono brak innych białek pomocniczych, między innymi osteonektyny, która jest związana z błoną komórkową płytki i odpowiada za uwalnianie trombiny, a także współdziała z trombospondyną 1 w agregacji płytek zależnej od wydzielania [11, 12]. Zaobserwowano również znaczne obniżenie stężenia inhibitora aktywatora plazminogenu 1 [13] oraz kininogenu o wysokiej masie cząsteczkowej [14]. Badania w GPS obejmują również zaburzenia uwalniania wapnia i jego udział w przekaznictwie sygnału komórkowego. W mikroskopie elektronowym widoczne jest istotne poszerzenie gęstego systemu kanalików (DTS, *dense tubular system*) oraz zmniejszenie liczby systemu kanalików otwartych (OCS, *open canalicular system*). Istnieją hipotezy dotyczące wpływu nieprawidłowej budowy DTS i OCS na możliwość szybkiej mobilizacji wapnia, koniecznej w procesie aktywacji adhezji płytek [15, 16].

W 2010 roku po raz pierwszy zmapowano *locus* odpowiedzialne za występowanie GPS; obejmuje ono duży fragment chromosomu 3p21.1-3p22.1 [5, 6]. Mutacje genu *NBEAL2* (*neurobeaching-like 2*) zidentyfikowały trzy niezależne zespoły badawcze [17–19] i obecnie znanych jest 35 różnych mutacji tego genu. Największe badanie objęło 27 niespokrewnionych członków rodzin z objawami i morfologicznie potwierdzonym GPS; mutacje dotyczyły zmiany sensu (*missense*), błędnego sensu (*nonsense, stop*), zmiany ramki odczytu (*frameshift*) lub składowania mRNA (*splicing*) i aż u 10 pacjentów były to mutacje złożone, heterozygotyczne [20]. Gen *NBEAL2* koduje białko zbudowane

Tabela 1. Podział wrodzonych zaburzeń płytek krwi na podstawie patogenezy i wielkość płytek (wielkość płytek krwi oznaczono następująco: na czerwono — wielkie, na szaro — prawidłowe, na jasnoczerwono — małe)

Table 1. Distribution of inherited platelet disorders on the basis of pathogenesis and size of platelets (following colors indicate the size of platelet: red — a large, gray — normal, bright red — small platelets)

Choroba	Nazwa angielska	Numer OMIM*	Nieprawidłowy gen	Lokalizacja na chromosomie	Sposób dziedziczenia
Zaburzenia przebiegające z małopłytkowością					
Zaburzenia związane z mutacją genu <i>MYH-9</i> #	<i>MYH-9-related platelet disorders</i>	Brak	<i>MYH-9</i>	22q12-13	AD
Wrodzona małopłytkowość wynikająca z braku megakariocytów	<i>Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia</i>	604498	<i>c-MPL</i>	1p34	AR
Małopłytkowość związana z defektami szkieletu:					
• małopłytkowość współistniejąca z kościozrostem promieniowo-łokciowym	<i>Thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis</i>	605432	<i>HOXA11</i>	7p15-p14.2	AD
• małopłytkowość współistniejąca z brakiem kości promieniowych	<i>Thrombocytopenia with absent radii</i>	274000	<i>RBM8A</i>	1q21.1	AR
• zespół DiGeorge'a/zespół podniebieno-sercowo-twarzowy	<i>DiGeorge/velocardiofacial syndrome</i>	188400/192430	<i>TBX1</i>	22q11.21	AD
Małopłytkowość sprzężona z chromosomem X współistniejąca z dyserytropoezą	<i>X-linked thrombocytopenia with dyserythropoiesis</i>	300367	<i>GATA1</i>	Xp11.23	XL+
Małopłytkowość współistniejąca z predyspozycją zachorowania na ostrą białaczkę szpikową	<i>Thrombocytopenia with predisposition to acute myelogenous leukemia</i>	601399	<i>CBFA2</i>	21q22	AD
Zespół płytek <i>Montreal</i>	<i>Montreal platelet syndrome</i>	Brak	Nieznany	Nieznany	AD
Makrotrombocytopenia śródziemnomorska	<i>Mediterranean macrothrombocytopenia</i>	210250	<i>ABCG5/ABCG8</i>	2p21	AR
Zaburzenia czynności płytek					
Choroba von Willebranda typ 2B	<i>Platelet-type von Willebrand disease</i>	177820	<i>GPIBA</i>	17p13	AD
Trombastenia Glanzmanna	<i>Glanzmann thrombosthenia</i>	273800	<i>ITGA2B/ITGB3</i>	17q21.31/17q21.32	AR
Zespół Bernarda-Souliera	<i>Bernard-Soulier syndrome</i>	231200	<i>GIBA/GIBB/GPIX</i>	17p13/22q11/3q21	AR
Zespół Wiskotta-Aldricha	<i>Wiskott-Aldrich syndrome</i>	301000	<i>WAS</i>	Xp11	XL
Zaburzenia sekrecji i/lub transdukcji sygnału					
Niedobór receptora TXA2	<i>TXA2 receptor deficiency</i>	614009	<i>TBXA2R</i>	19p13.3	AD
Niedobór receptora ADP	<i>ADP receptor deficiency</i>	600515	<i>P2Y12</i>	3q25.1	AR
Zaburzenia magazynowania ziarnistości					
Zaburzenia magazynowania ziarnistości δ:					
• idiopatyczne zaburzenie magazynowania ziarnistości δ	<i>Idiopathic δ-storage pool disease</i>	Brak	Nieznany	Nieznany	AR, AD
• zespół Chediaka-Higashiego	<i>Chediak-Higashi syndrome</i>	214500	<i>LYST</i>	1q42.3	AR
• zespół Hermansky'ego-Pudlaka	<i>Hermansky-Pudlak syndrome</i>	203300	<i>HPS1**</i>	10q24.2	AR
• zespół Griscelliego	<i>Griselli syndrome</i>	214450	<i>MYO5A++</i>	15q21.3	AR
Zaburzenia magazynowania ziarnistości α:					
zespół szarych płytek	<i>Gray platelet syndrome</i>	139090/187900	<i>NBEAL/GFI1B</i>	3p21.31/9q34.13	AR/AD
Zespół Paris-Trousseau/Jacobsena	<i>Paris-Trousseau/Jacobsen syndrome</i>	188025	<i>FLI1</i>	11q23	AD
Zespół Quebec	<i>Quebec syndrome</i>	601709	<i>PLAU</i>	10q22.2	AD
Inne					
Zespół Scotta	<i>Scott syndrome</i>	262890	<i>TMEM16F</i>	12q12	AR
Małopłytkowość sprzężona z chromosomem X	<i>X-linked thrombocytopenia</i>	313900	<i>WAS</i>	X11.23	XL
Makrotrombocytopenia związana z mutacją genu <i>TUBB1</i>	<i>Macrothrombocytopenia, TUBB1-related</i>	613112	<i>TUBB1</i>	20q13.32	AD

*OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) — baza danych o wszystkich chorobach uwarunkowanych genetycznie występujących u człowieka; #niejednorodna grupa dziedzicznych trombocytopatii w tym: anomalia May-Hegglina, Sebastian, Epstein, zespół Fechtnera; +choroba sprzężona z chromosomem X; **choroba może być uwarunkowana homozygotyczną mutacją genu *HPS1* lub heterozygotyczną mutacją różnych genów: *AP3B1* (5q14.1), *HPS3* (3q24), *HPS4* (22q11.2-q12), *HPS5* (11p14), *HPS6* (10q24), *DTNBP1* (6p22), *BLOC1S3* (19q13.32), *PLDN* (15q21.1); ++choroba może być również uwarunkowana mutacją genu *RAB27A* (15q21.3) lub *MLPH* (2q37.3); AR (*autosomal recessive*) — autosomalne recesywne; AD (*autosomal dominant*) — autosomalne dominujące; XL (*X-linked*) — sprzężone z chromosomem X

z 2754 aminokwasów, a jego rola nie jest w pełni jasna. Potwierdzono jego przynależność do rodziny białek ARM (*armadillo repeated proteins*), BEACH (*beige and Chediak-Higashi syndrome*) i domeny WD40. Funkcje białka NBEAL2 najprawdopodobniej obejmują interakcje białko-białko, tworzenie platform dla kompleksów białkowych, wpływ na dynamikę błon i pęcherzyków komórkowych [21]. Badania na modelach mysich pozwoliły zaobserwować następujące zależności: płytki u osobników *NBEAL2*^{-/-} wykazywały zwiększoną liczbę otoczonych błoną wakuoli pozbawionych zawartości; równocześnie stwierdzono zachowaną obecność P-selektyny wchodzącej w skład błon α -ziarnistości. Na tej podstawie uznano, że białko NBEAL2 jest niezbędne do pakowania i sortowania zawartości ziarnistości, ale nie wpływa na tworzenie błon komórkowych [22]. Drugim istotnym odkryciem był wpływ białka NBEAL2 na rozwój megakariocytów, zwłaszcza ich wzrost i różnicowanie. Morfologia komórek *NBEAL2*^{-/-} wskazuje na zahamowanie rozwoju na wczesnym etapie różnicowania [23].

W 2014 roku zespół badaczy holenderskich na łamach „New England Journal of Medicine” opublikował wpływ mutacji błędnego sensu genu *GFI1B* (*growth factor independent 1B*) na występowanie GPS dziedzicznego automalnie dominująco [7]. Białko kodowane przez niniejszy gen należy do transkrypcyjnych białek represorowych wpływających na hematopoezę i powstawanie megakariocytów [24–26]. Wyłącznie całkowite zablokowanie obu alleli *GFI1B* prowadzi do występowania dysplastycznych megakariocytów i zaburzenia czynności PLT [25]. Niewątpliwie, coraz większe upowszechnienie dostępności do sekwencjonowania nowej generacji stwarza możliwość przebadania nie tylko pojedynczych pacjentów, ale także zebrania danych pochodzących od grup chorych.

Prezentacja kliniczna

U większości pacjentów z GPS występują krwawienia o umiarkowanym lub łagodnym nasileniu. Na podstawie badania kohortowego, które objęło 21 pacjentów z GPS, stwierdzono, że odsetki łagodnych, umiarkowanych i ciężkich krwawień wynosiły, odpowiednio, 37%, 21% i 42% [6]. Spośród 8 pacjentów z ciężkimi krwawieniami większość stanowiły kobiety z nadmiernymi krwawieniami miesięczkowymi, głęboką niedokrwistością i wymagającą powtarzalnych przetoczeń koncentratu krwinek czerwonych (kkcz). Obserwowano również sporadyczne przypadki

chorych bez objawów krwawienia bądź z bardzo łagodnymi objawami (krwawienia z nosa i błon śluzowych, łatwe siniaczenie). Większość pacjentów wymagała suplementacji żelaza, okołoperacyjnego lub okołoporodowego podawania desmopresyny (DDVAP, *1-desamino-8-D-arginine vasopressin*) [6, 27]. Stopień nasilenia małopłytkowości jest zmienny i wydaje się odwrotnie korelować z wiekiem. W progresji choroby dochodzi do włóknienia szpiku i wtórnej splenomegalii. U części pacjentów stwierdzano również niedokrwistość z niedoboru żelaza. Średnie stężenia hemoglobiny u mężczyzn i kobiet wynosiły, odpowiednio, $13,2 \pm 0,7$ g/dl i $11,1 \pm 1,7$ g/dl. Stwierdzono również znacznie podwyższone stężenie osoczowej witaminy B₁₂ (średnia wartość 2608 ± 1590 pg/ml) [6, 27]. Nie zaobserwowano odchyień w badaniach czasu protrombinowego i kaolinowo-protrombinowego ani czynności nerek, wątroby i tarczycy.

Diagnostyka i kryteria rozpoznania

Wrodzone zaburzenia czynności PLT należą do rzadkich przyczyn skaz krwotocznych i dlatego ich diagnostyka powinna być przeprowadzona po wykluczeniu częstszych defektów hemostazy pierwotnej, takich jak choroba von Willebranda czy nabyte trombocytopatie. Występowanie wielu różnych zaburzeń PLT powoduje, że ich diagnostyka laboratoryjna i genetyczna jest bardzo trudna, pracochłonna i kosztowna. Większość opisanych wrodzonych trombocytopatii to choroby bardzo rzadkie, wymagające dużego doświadczenia w dostosowaniu diagnostyki i dalszego leczenia. W związku z tym prowadzenie pacjentów obciążonych tą grupą chorób powinno należeć do wybranych ośrodków w kraju o najwyższym stopniu referencyjności, zapewniających dostęp do całościowej diagnostyki i doświadczonej kadry lekarzy. Należy także pamiętać, że obecnie nie ma możliwości przeprowadzania każdorazowo diagnostyki molekularnej, obejmującej podłoże genetyczne GPS (geny *NBEAL2* i *GFI1B*), natomiast zawsze jest konieczne zebranie szczegółowego wywiadu od pacjenta i członków jego rodziny w celu doprecyzowania sposobu dziedziczenia.

Wykonywanie badań warto podzielić na trzy etapy. W pierwszym etapie powinno się dążyć do zawężenia kręgu różnicowego, następnie, w kolejnym etapie należy wykonać badania pozwalające na potwierdzenie wstępnego rozpoznania — rozpoznanie to należy potwierdzić w badaniach specjalistycznych w ostatnim, trzecim etapie.

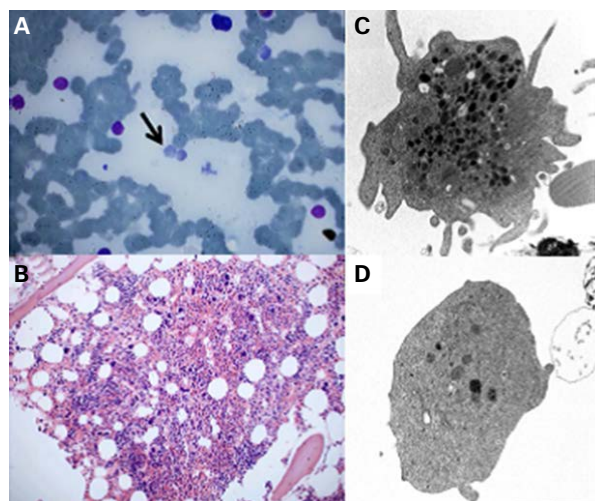
Badania laboratoryjne

Oprócz rutynowych badań laboratoryjnych, takich jak: morfologia krwi z rozmazem, koagulogram, wykluczenie niedoborów (stężenia żelaza/ferrytyny, witaminy B₁₂, kwasu foliowego), ocena czynności wątroby (enzymy wątrobowe, bilirubina, wirusy wątroby typu B i C, cholinesteraza, dehydrogenaza mleczanowa, proteinogram), nerek (mocznik, kreatynina, badanie ogólne moczu, stężenia jonów: sodu, potasu, wapnia), tarczycy (stężenia hormonów: wolnej tyroksyny 3, wolnej tyroksyny 4, tyreotropowego, obecność autoprzeciwciał), wykonuje się również tak zwane testy przesiewowe w kierunku określenia czynności PLT. Należą do nich czas krwawienia (*bleeding time*) i czas okluzji (*occlusion time*), które są badane na aparacie PFA-100 (*platelet function analyzer*, DadeBehring, Niemcy). W przypadkach, w których nie jest dostępny materiał pochodzący ze szpiku kostnego (trepanobiopsja i rozmaz), na kolejnym etapie oceny laboratoryjnej bada się zdolność agregacji PLT z panelem agonistów adenosyno-5-difosforanem (ADP, *adenosine diphosphate*), kolagenem, adrenaliną, kwasem arachidonowym i rystocetyną oraz zdolność wydzielania płytkowego ATP. W ostatnim etapie, w cytometrii przepływowej, można określić gęstość receptorów GPIIb α (diagnostyka różnicowa z trombastenią Glanzmanna, zespołem Bernarda-Souliera oraz zespołem Scotta). Obecnie możliwe jest wykonanie badań molekularnych pozwalających na potwierdzenie trombastenii Glanzmanna, zespołu Wiskotta-Aldricha i zaburzeń związanych z mutacją genu *MYH9* [28, 29].

Biopsja aspiracyjna szpiku i mikroskopowa ocena trepanobiopsji

W rozmazach krwi obwodowej barwionych klasyczną techniką Wrighta [30] widoczne są duże, pozbawione ziarnistości płytki. Równocześnie morfologia pozostałych linii komórkowych pozostaje w granicach normy. W sporadycznych przypadkach odnotowano obecność neutrofilów o obniżonej zawartości ziarnistości.

Trepanobiopsjat jest zwykle bogatokomórkowy w stosunku do wieku. Zwraca uwagę zwiększona liczba polimorficznych megakariocytów; wykazują one dodatnią reakcję immunohistochemiczną z β_3 -integryną — CD61 oraz z CD34, który jest markerem komórek macierzystych i progenitorowych [7, 31, 32]. Ponadto w szpiku często obserwuje się włóknienie już na samym początku diagnostyki lub widoczna jest jego progresja w czasie obserwacji



Rycina 1. Zespół szarych płytek (GPS): **A.** Rozmaz krwi obwodowej, strzałką zaznaczono „szare” płytki (barwienie metodą Wrighta-Giemsy, 60 \times); **B.** Trepanobiopsjat, liczne polimorficzne megakariocyty (barwienie hematoxyliną i eozyną, 10 \times); mikroskopia elektronowa: **C.** Prawidłowa płytka krwi, liczne ziarnistości α oraz ciała gęste; **D.** Płytką krwi pozbawioną ziarnistości α od pacjenta z GPS

Figure 1. Gray platelet syndrome: **A.** Blood smear, arrow — gray platelets (Wright-Giemsa staining, 60 \times); **B.** Bone marrow, numerous polymorphic megakaryocytes (hematoxylin and eosin staining, 10 \times); electron microscopy: **C.** Normal platelet with α granules and dense bodies; **D.** Platelet without α granules from GPS patient

chorego. Dotychczas nie uzyskano jednoznacznego wytłumaczenia procesu włóknienia w GPS, jednak prawdopodobna wydaje się teza o nadmiernym uwalnianiu czynników wzrostu fibroblastów przez megakariocyty [33]. Inny możliwy mechanizm obejmuje nadmierne gromadzenie P-selektyny na powierzchni błon komórkowych megakariocytów [34]. W przebiegu idiopatycznej mielofibrozy stwierdzono również podobne zaburzenia zwiększonego i nieprawidłowego rozmieszczenia P-selektyny. Zjawisku temu towarzyszy także emperipoleza, czyli przenikanie elementów krwi (zazwyczaj neutrofilów, które wykazują ekspresję ligandów dla P-selektyny) poprzez oddzielanie fragmentów błon komórkowych megakariocytów. Nadal pozostaje aktualna hipoteza, zgodnie z którą „uwięzione” neutrofile wydzielają mieloperoksydazę, która „trawi” megakariocyty i prowadzi do uwolnienia czynników wzrostu fibroblastów [35, 36]. Na rycinie 1A, B przedstawiono obraz mikroskopowy rozmazu szpiku i trepanobiopsji pacjenta z GPS diagnozowanego i leczonego w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii.

Ocena ultrastruktury płytek w mikroskopii elektronowej

Mikroskopia elektronowa (EM, *electron microscopy*) pozostaje niezastąpionym narzędziem w ocenie charakterystycznych cech PLT oraz w potwierdzeniu rozpoznania GPS. Wykazano, że w GPS płytki zachowują liczbę mitochondriów, ciałek gęstych, peroksosomów i lizosomów, widoczne są natomiast wyłącznie pojedyncze ziarnistości α lub w ogóle nie występują [3, 4, 9]. Wielkość płytek może być zmienna — część zachowuje podłużny kształt, natomiast te bardziej zwakuolizowane są zazwyczaj większe i bardziej okrągłe. Ponadto obserwuje się rozbudowany system kanalików gęstych i często skąpy system kanalików otwartych. W celu wykonania oceny w EM konieczne jest uzyskanie koncentratu bogatopłytkowego (PRP, *platelet-rich plasma*) i jego natychmiastowe utwalenie w 3-procentowym glutaraldehydzie, a następnie poddanie rutynowym procedurom EM. Zwykle w transmisyjnym mikroskopie elektronowym uzyskuje się powiększenia kilkunastu- lub kilkudziesięciokrotne. W celu zobrazowania głównych cech ultrastruktury GPS na rycinie 1C, D przedstawiono prawidłową płytkę krwi oraz płytkę pochodzącą od pacjenta obciążonego opisywanym zespołem.

Leczenie i rokowanie

Krwawienia w GPS zwykle mają łagodny i umiarkowany przebieg, choć opisywano także ciężkie wewnątrzczaszkowe krwotoki na skutek urazu [37]. Większość dorosłych chorych jest narażona na zwiększone, okołoperacyjne i okołoporodowe ryzyko wystąpienia skazy krwotocznej. Standardowe leczenie obejmuje przetoczenia koncentratów krwinek płytkowych (kkp). Zastosowanie DDAVP skraca czas krwawienia u pacjentów z GPS, u których nie wykrywa się płytkowego vWF, natomiast jego stężenie w osoczu pozostaje prawidłowe [38]. Stężenie vWF zwiększa się dzięki uwolnieniu z zapasów nagromadzonych w komórkach śródbłonna. Zaleca się podawanie DDVAP w przygotowaniu do ekstrakcji zębów [39]. Opisano przebieg porodu siłami natury bez zwiększonego krwawienia okołoporodowego u pacjentki z GPS, której zapewniono przetoczenie kkp [39]. Doświadczenie w leczeniu pojedynczych chorych obejmuje niewielki korzystny wpływ kortykosteroidów oraz splenektomii na korektę małopłytkowości. W związku z faktem, że GPS należy do rzadkich trombocytopatii, nie jest możliwe doprecyzowanie zaleceń i standardów leczenia. Terapia powinna być

dostosowana indywidualnie do każdego chorego zależnie od wieku, nasilenia objawów i aktualnego stanu.

Podsumowanie

Zespół szarych płytek należy do rzadkich uwarunkowanych genetycznie trombocytopatii. Ostatnio wyjaśniono podłoże genetyczne choroby obejmujące mutacje genu *NBEAL2* i mutacje błędnego sensu genu *GFI1B*. Odkrycia te pozwalają również na zrozumienie patogenetycznej choroby, ponieważ białka kodowane przez wyżej wymienione geny wpływają na rozwój megakariocytów, zwłaszcza ich wzrost i różnicowanie. Diagnostyka laboratoryjna i genetyczna GPS jest trudna, ponieważ obejmuje inne, również rzadkie, wrodzone zaburzenia czynności PLT. W przypadkach niewyjaśnionych małopłytkowości występujących rodzinnie zaleca się dokładne zbadanie rozmazu krwi obwodowej i poszukiwanie szarych płytek.

Piśmiennictwo

1. Raccuglia G. Gray platelet syndrome. A variety of qualitative platelet disorder. *Am. J. Med.* 1971; 51: 818–828.
2. Gerrard J.M., Phillips D.R., Rao G.H. i wsp. Biochemical studies of two patients with the gray platelet syndrome. Selective deficiency of platelet alpha granules. *J. Clin. Invest.* 1980; 66: 102–109.
3. White J.G. Interaction of membrane systems in blood platelets. *Am. J. Pathol.* 1972; 66: 295–312.
4. White J.G. Ultrastructural studies of the gray platelet syndrome. *Am. J. Pathol.* 1979; 95: 445–462.
5. Fabbro S., Kahr W.H., Hinckley J. i wsp. Homozygosity mapping with SNP arrays confirms 3p21 as a recessive locus for gray platelet syndrome and narrows the interval significantly. *Blood* 2011; 117: 3430–3434.
6. Gunay-Aygun M., Zivony-Elboun Y., Gumruk F. i wsp. Gray platelet syndrome: natural history of a large patient cohort and locus assignment to chromosome 3p. *Blood* 2010; 116: 4990–5001.
7. Monteferrario D., Bolar N.A., Marneth A.E. i wsp. A dominant-negative *GFI1B* mutation in the gray platelet syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370: 245–253.
8. Zuern C.S., Schwab M., Gawaz M. i wsp. Platelet pharmacogenomics. *J. Thromb. Haemost.* 2010; 8: 1147–1158.
9. Breton-Gorius J., Vainchenker W., Nurden A. i wsp. Defective alpha-granule production in megakaryocytes from gray platelet syndrome: ultrastructural studies of bone marrow cells and megakaryocytes growing in culture from blood precursors. *Am. J. Pathol.* 1981; 102: 10–19.
10. Levy-Toledano S., Caen J.P., Breton-Gorius J. i wsp. Gray platelet syndrome: alpha-granule deficiency. Its influence on platelet function. *J. Lab. Clin. Med.* 1981; 98: 831–848.
11. Breton-Gorius J., Clezardin P., Guichard J. i wsp. Localization of platelet osteonectin at the internal face of the alpha-granule membranes in platelets and megakaryocytes. *Blood* 1992; 79: 936–941.

12. Clezardin P, Malaval L, Morel M.C. i wsp. Osteonectin is an alpha-granule component involved with thrombospondin in platelet aggregation. *J. Bone Miner. Res.* 1991; 6: 1059–1070.
13. Vermynen C., Vermynen J., Hoet B. i wsp. Grey platelet syndrome: evidence for alpha-granule localization of the platelet plasminogen activator inhibitor-1 pool. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 1991; 8: 111–120.
14. Schmaier A.H., Smith P.M., Purdon A.D. i wsp. High molecular weight kininogen: localization in the unstimulated and activated platelet and activation by a platelet calpain(s). *Blood* 1986; 67: 119–130.
15. Lages B., Sussman I.L., Levine S.P. i wsp. Platelet alpha granule deficiency associated with decreased P-selectin and selective impairment of thrombin-induced activation in a new patient with gray platelet syndrome (alpha-storage pool deficiency). *J. Lab. Clin. Med.* 1997; 129: 364–375.
16. Mori K., Suzuki S., Sugai K. i wsp. Morphological changes of platelets during the process of platelet aggregation in gray platelet syndrome. *Tohoku J. Exp. Med.* 1986; 149: 425–436.
17. Albers C.A., Cvejic A., Favier R. i wsp. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat. Genet.* 2011; 43: 735–737.
18. Gunay-Aygun M., Falik-Zaccari T.C., Vilboux T. i wsp. NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules. *Nat. Genet.* 2011; 43: 732–734.
19. Kahr W.H., Hinckley J., Li L. i wsp. Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat. Genet.* 2011; 43: 738–740.
20. Bottega R., Pecci A., De Candia E. i wsp. Correlation between platelet phenotype and NBEAL2 genotype in patients with congenital thrombocytopenia and alpha-granule deficiency. *Haematologica* 2013; 98: 868–874.
21. Cullinane A.R., Schaffer A.A., Huizing M. The BEACH is hot: a LYST of emerging roles for BEACH-domain containing proteins in human disease. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2013; 14: 749–766.
22. Deppermann C., Cherpokova D., Nurden P. i wsp. Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 3331–3342.
23. Kahr W.H., Lo R.W., Li L. i wsp. Abnormal megakaryocyte development and platelet function in Nbeal2(-/-) mice. *Blood* 2013; 122: 3349–3358.
24. van der Meer L.T., Jansen J.H., van der Reijden B.A. Gfi1 and Gfi1b: key regulators of hematopoiesis. *Leukemia* 2010; 24: 1834–1843.
25. Saleque S., Cameron S., Orkin S.H. The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev.* 2002; 16: 301–306.
26. Randrianarison-Huetz V., Laurent B., Bardet V. i wsp. Gfi-1B controls human erythroid and megakaryocytic differentiation by regulating TGF-beta signaling at the bipotent erythro-megakaryocytic progenitor stage. *Blood* 2010; 115: 2784–2795.
27. Nurden A.T., Nurden P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood Rev.* 2007; 21: 21–36.
28. Hayward C.P. Diagnostic approach to platelet function disorders. *Transfus. Apher. Sci.* 2008; 38: 65–76.
29. Hayward C.P., Moffat K.A., Pai M. i wsp. An evaluation of methods for determining reference intervals for light transmission platelet aggregation tests on samples with normal or reduced platelet counts. *Thromb. Haemost.* 2008; 100: 134–145.
30. Dhurandhar N.R., Zorrilla O. Special stains in cytology: a technique using one half of a previously stained slide. *Diagn. Cytopathol.* 1988; 4: 347–351.
31. Drouin A., Favier R., Masse J.M. i wsp. Newly recognized cellular abnormalities in the gray platelet syndrome. *Blood* 2001; 98: 1382–1391.
32. Islam M.S., Alamelu J. Morphological and electron microscopic characteristics of grey platelet syndrome. *Br. J. Haematol.* 2011; 152: 1.
33. Caen J.P., Deschamps J.F., Bodevin E. i wsp. Megakaryocytes and myelofibrosis in gray platelet syndrome. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 1987; 29: 109–114.
34. Falik-Zaccari T.C., Anikster Y., Rivera C.E. i wsp. A new genetic isolate of gray platelet syndrome (GPS): clinical, cellular, and hematologic characteristics. *Mol. Genet. Metabol.* 2001; 74: 303–313.
35. Larsen T.E. Emperipolesis of granular leukocytes within megakaryocytes in human hemopoietic bone marrow. *Am. J. Clin. Pathol.* 1970; 53: 485–489.
36. Breton-Gorius J. On the alleged phagocytosis by megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* 1981; 47: 635–636.
37. Gootenberg J.E., Buchanan G.R., Holtkamp C.A. i wsp. Severe hemorrhage in a patient with gray platelet syndrome. *J. Pediatr.* 1986; 109: 1017–1019.
38. Pfueller S.L., Howard M.A., White J.G. i wsp. Shortening of bleeding time by 1-deamino-8-arginine vasopressin (DDAVP) in the absence of platelet von Willebrand factor in gray platelet syndrome. *Thromb. Haemost.* 1987; 58: 1060–1063.
39. Kohler M., Hellstern P., Morgenstern E. i wsp. Gray platelet syndrome: selective alpha-granule deficiency and thrombocytopenia due to increased platelet turnover. *Blood* 1985; 50: 331–340.