

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-27-34

Наблюдение функционирования гранулоцитов при тромбообразовании *ex vivo* у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией

Д.С. Морозова¹, А.А. Мартыанов^{1, 2, 3, 4}, М.А. Пантелеев^{1, 2, 4}, П.А. Жарков²,
Д.В. Федорова², А.Н. Свешникова^{1, 2, 4}

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

³ ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН, Москва

⁴ ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

ANKRD26-ассоциированная тромбоцитопения – это несиндромальная наследственная тромбоцитопения, для которой не существует формальных диагностических критериев по функциональным тестам. Известно, что при патогенетических вариантах в гене *ANKRD26* значительно возрастает вероятность миелоидных лейкозов, однако исследований функционирования гранулоцитов при этой патологии не проводили. Цель данного исследования – анализ функционирования гранулоцитов и тромбоцитов при тромбообразовании *ex vivo* у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией. В исследование были включены два пациента и 10 здоровых добровольцев. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Внутриклеточная сигнализация и функциональные ответы тромбоцитов наблюдались методом непрерывной проточной цитометрии; тромбообразование *ex vivo* и функционирование гранулоцитов – на флуоресцентном микроскопе в плоско-параллельных проточных камерах, содержащих фибриллярный коллаген. При физиологической (АДФ, аналог коллагена) активации тромбоцитов пациентов *in vitro* не отмечено значимых их отличий от тромбоцитов здоровых доноров. При этом наблюдаемый *ex vivo* размер тромбов был значительно снижен по сравнению со здоровыми донорами и литературными данными о пациентах с другими тромбоцитопениями. Наблюдаемое количество и активность (скорость перемещения) гранулоцитов пациентов были в пределах нормальных значений. Однако гранулоциты пациентов имели значительные морфологические отличия по сравнению с гранулоцитами здоровых доноров, а именно повышенную распластанность (в частности, большое количество тонких псевдоподий), а также повышенную кривизну траекторий движения. При *ex vivo* наблюдении тромбообразования у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией наблюдается значительно уменьшенный размер тромбов при нормальной активности тромбоцитов и повышенной изменчивости формы гранулоцитов.

Ключевые слова: гранулоциты, нейтрофилы, тромбоциты, *ANKRD26*, флуоресцентная микроскопия, проточная цитометрия

Морозова Д.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 27–34.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-27-34

Observation of granulocyte function during *ex vivo* thrombus formation for patients with *ANKRD26*-associated thrombocytopenia

D.S. Morozova¹, A.A. Martyanov^{1, 2, 3, 4}, M.A. Panteleev^{1, 2, 4}, P.A. Zharkov², D.V. Fedorova², A.N. Sveshnikova^{1, 2, 4}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow
² Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

³ Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

⁴ Centre for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology Russian Academy of Sciences, Moscow

ANKRD26-associated thrombocytopenia is a non-syndromic hereditary thrombocytopenia for which there are currently no formal diagnostic criteria. It is known that the probability of myeloid leukemia in patients with pathogenetic variants in the *ANKRD26* gene significantly increases, however, studies of the functioning of granulocytes in this pathology have not been conducted. Aims: Analysis of the functioning of granulocytes and platelets during *ex vivo* thrombosis in patients with *ANKRD26*-associated thrombocytopenia. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. Two patients and 10 healthy volunteers were included in the study. Intracellular signaling and platelet functional responses were observed by continuous flow cytometry. *Ex vivo* thrombus formation and granulocyte functioning were observed on a fluorescence microscope in parallel-plane flow chambers containing fibrillar collagen. Upon physiological activation (ADP, collagen) of patients' platelets *in vitro*, there were no significant differences between the platelets of patients and healthy donors. However, the observed *ex vivo* size of platelet aggregates was significantly reduced in comparison with healthy donors and published data on patients with other thrombocytopenias. The observed number and activity (movement velocity) of granulocytes of patients was within normal values. However, significant morphological differences were observed for granulocytes of patients compared with granulocytes of healthy donors: there was an increased spreading of granulocytes, in particular, expressed in a large number of thin pseudopodia, as well as an increased curvature of the motion trajectories of granulocytes. *Ex vivo* observation of thrombus formation in patients with *ANKRD26*-associated thrombocytopenia, a significantly reduced thrombus size is observed with normal platelet activity and increased variability in the shape of granulocytes.

Key words: granulocytes, neutrophils, platelets, *ANKRD26*, fluorescence microscopy, flow cytometry

Morozova D.S., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2020; 19 (1): 27–34.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-27-34

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 11.01.2020

Принята к печати 17.02.2020

Контактная информация:

Пантелеев Михаил Александрович, д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. лабораторией клеточного гемостаза и тромбоза НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,

ул. Саморы Mashela, 1

E-mail: mapanteleev@yandex.ru

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 11.01.2020

Accepted 17.02.2020

Correspondence:

Mikhail A. Panteleev, PhD, DSc, Head of the Laboratory of cellular hemostasis and thrombosis of Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation.

Address: Russia 117997, Moscow,

Samory Mashela st., 1

E-mail: mapanteleev@yandex.ru

А *ANKRD26*-ассоциированная тромбоцитопения – это несиндромальная наследственная тромбоцитопения без патогномоничных признаков. На данный момент не существует формальных диагностических критериев данного заболевания по патогномоничным изменениям в функциональных тестах [1]. Для постановки данного диагноза необходимо проведение генетических тестов (наличие мутаций в 5'UTR области гена *ANKRD26*, выявление патогенных вариантов, проведение мультигенетической панели или использование одной из методик высокопроизводительного секвенирования) [2]. Уровень тромбоцитов при *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопении составляет обычно 50–150 тыс./мкл при отсутствии или незначительности клинически значимых проявлений кровоточивости [1, 3]. У лиц с патогенными вариантами в гене *ANKRD26* в 24 раза возрастает риск развития миелодиспластического синдрома (МДС), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и хронического миелоидного лейкоза по сравнению со здоровой популяцией [4].

Молекулярные механизмы предрасположенности к гематологическим злокачественным новообразованиям при *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопении не известны [3]. Считается, что они могут быть связаны с гиперчувствительностью клеток к тромбопоэтину, что ведет к увеличенной пролиферации клеток в связи с повышенной экспрессией *ANKRD26* [5]. Приобретенные соматические патогенетические варианты в эпигенетических регуляторах, транскрипционных факторах и регуляторах клеточного цикла были описаны в случаях миелоидной клональной эволюции [6].

В связи с нарушенным тромбоцитопоезом у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией в мегакариоцитах и тромбоцитах ведется поиск включений патологических белков. Так, богатые убиквитином и протеасомами цитоплазматические включения (PACs), обнаруженные ранее в ряде аденокарцином [7], были найдены также в тромбоцитах и мегакариоцитах пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией, однако ни в гранулоцитах, ни в лимфоцитах эти включения не найдены [7].

Изучение активности и функций тромбоцитов пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией методом проточной цитометрии показало сниженную экспрессию гликопротеина 1 α (GP1a), а посредством трансмиссионной электронной микроскопии показано снижение число α гранул и увеличение открытой канальцевой системы, при этом функциональных изменений тромбоцитов не обнаружено [1]. По данным *P. Noris, et al.* [8], значимого дефекта в агрегации тромбоцитов в ответ на различные концентрации коллагена, АДФ или ристо-

цитина при *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопении не наблюдалось.

Для пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией не характерны иммунодефицитные состояния. При мутациях в гене *ANKRD26* гранулоциты гистологически никак не отличаются от гранулоцитов здоровых доноров. Отсутствие различий в морфологии лейкоцитов, а также данных о нарушении их функции затрудняет определение механизмов влияния мутации гена *ANKRD26* на нарушение функции этих клеток [7, 9].

В связи с возрастающим количеством данных о двунаправленном влиянии гранулоцитов и тромбоцитов в различных патологических процессах, таких как атеросклероз, тромбоз глубоких вен, сепсис и др. [10], изучение функции обоих типов клеток при нарушениях в системах гемостаза и иммунитета представляет особый интерес. На данный момент клинических тестов для изучения влияния гранулоцитов на тромбообразование и, наоборот, степени активации тромбоцитов на активность лейкоцитов не существует.

В этой статье описаны результаты наблюдения функционирования гранулоцитов при тромбообразовании *ex vivo* и анализа функционирования тромбоцитов *in vitro* у педиатрических пациентов с подтвержденной *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией. Показано, что при нормальном функционировании одиночных тромбоцитов у пациентов наблюдается значительное снижение площади образующихся на коллагене тромбоцитарных агрегатов. При этом гранулоциты пациентов отличаются по морфологии от гранулоцитов здоровых доноров наличием большого количества псевдоподий и повышенной склонностью к изменению формы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. Использованы следующие материалы: флуорофор *Fura-Red-AM*, чувствительный к концентрации кальция, проникающий сквозь липидные мембраны клеток (*Molecular Probes*, Юджин, Орегон, США); DiOC₆, фукоидан из водорослей *Fucus Vesiculosus*, АДФ, EGTA, HEPES, бычий сывороточный альбумин, апираза (степень очистки VII), TRAP-6, антитело к CD66b конъюгированное с FITC, краситель *Alexa-647*, фибриноген человека, аннексин V (*Sigma-Aldrich*, Сент-Луис, Миссури, США), NaCl, Na₂HPO₄, KCl, NaHCO₃, MgCl₂, CaCl₂ (Агат-Мед, Москва, Россия), фибриллярный коллаген I типа (CHRONO-PAR®, *Havertown*, Пенсильвания, США).

Метод анализа функционирования гранулоцитов при тромбообразовании *ex vivo*. Кровь здоровых доноров и пациентов забирали из локтевой вены в вакуумные пробирки, содержащие гирудин (*Sarstedt Monovette*®). Кровь была окрашена флуоресцентными маркерами на цельные клеточные мембраны (DiOC6) и фосфатидилсерин-положительные клетки (связывание белка *Annexin V*, ассоциированного с флуорофором *Alexa-647*) в течение 3 мин при комнатной температуре. Тест проводят методом малоугловой флуоресцентной микроскопии (*Nikon Eclipse Ti-E*) при поочередном возбуждении флуоресценции образца лазерами 488 нм и 640 нм. Используется плоскопараллельная проточная камера с фиксированным размером канала: на покровное стекло наносят фибриллярный коллаген I типа. Кровь прокачивается через камеру при постоянной скорости сдвига (100 сек^{-1}) – таким образом симулируется кровоток в посткапиллярной веноле в условиях воспаления.

В поле зрения наблюдается рост тромбов с течением времени, а также крупные, движущиеся между тромбами CD66b-положительные клетки – гранулоциты – с адгезированными к ним прокоагулянтными (*Annexin V*-положительными) тромбоцитами. Проводится характеристика гранулоцитов по количеству, морфологии и скорости движения. По морфологии: проводят разделение по равномерности окраски клеток DiOC6 (показатель целостности мембран). Равномерная окраска характеризует неактивированные или слабоактивированные клетки с неокрашенными ядрами; точечная окраска – сильноактивированные клетки, для которых DiOC6 сосредоточена в мембранах митохондрий.

Метод анализа активности тромбоцитов *in vitro*. Для анализа активности тромбоцитов забор крови доноров проводили в вакуумные пробирки с гирудином не ранее чем за 3 ч до эксперимента. К цельной крови добавляли чувствительный к внутриклеточной концентрации кальция флуорофор *Fura-Red* (2 μM) и апиразу (0,1 U/мл). После инкубации в течение 30 мин при 37 °C, при которой также происходит оседание эритроцитов, богатая тромбоцитами плазма была отобрана и разведена в буфере Тирода (134 mM NaCl; 0,34 mM Na_2HPO_4 ; 2,9 mM KCl; 12 mM NaHCO_3 ; 20 mM HEPES; 5 mM глюкозы; 1 mM MgCl_2 ; 2 mM CaCl_2 , БСА 2% по массе; pH 7.3) до концентрации тромбоцитов, равной 1×10^5 тромбоцитов/мл. Анализ активации тромбоцитов проводили на проточном цитометре BD FACS *Canto II* по методике, описанной ранее [11].

В данное исследование включили двух пациентов-сиблингов, 5 и 8 лет, наблюдающихся у гематолога в консультативном отделении НМИЦ детской

гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (НМИЦ ДГОИ).

У пациентки И. (2011 г. р.) с возраста 4 лет наблюдались проявления геморрагического синдрома в виде множественных крупных экхимозов на ногах; в то же время была впервые выявлена тромбоцитопения ($58 \times 10^9/\text{л}$). Умеренная тромбоцитопения ($44\text{--}79 \times 10^9/\text{л}$), умеренный кожный геморрагический синдром (единичные посттравматические экхимозы на конечностях и петехиальные элементы на коже туловища), редкие носовые кровотечения сохранялись на протяжении года – до обращения в консультативное отделение НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (далее – НМИЦ ДГОИ). По результатам обследования в общем анализе крови имела место тромбоцитопения – до $46 \times 10^9/\text{л}$; легкая гипохромия и микроцитоз эритроцитов с нормальной концентрацией гемоглобина. Дополнительные исследования тромбоцитов показали повышенное количество микроформ; анализ функциональной активности тромбоцитов (ФАТ) не выявил отличий от здоровых доноров. Результаты миелограммы из двух точек показали сниженную клеточность, полиморфность костного мозга, расширение мегакариоцитарного ростка, скудную отшнуровку тромбоцитов (в 3–5% мегакариоцитов), сохранность других ростков кроветворения. Цитогенетических нарушений в клетках костного мозга не выявлено.

У пациентки И. есть два младших брата – разнояйцевые близнецы; один из них здоров, второй – пациент М., 2014 года рождения, – имеет тромбоцитопению в анамнезе с возраста 1,5 года (от $30 \times 10^9/\text{л}$ до $52 \times 10^9/\text{л}$ к 5 годам), отмечены также проявления экхимозов, периодические носовые кровотечения, однократное субконъюнктивальное кровоизлияние. По результатам обследований в НМИЦ ДГОИ обнаружена тромбоцитопения – до $52 \times 10^9/\text{л}$; изменений морфологии или функциональной активности тромбоцитов не выявлено.

У пациентки И. и пациента М. имеетсяотягощенный семейный анамнез: отец наблюдается у гематолога с 18 лет (ранее исследований не проводили) в связи с гормонрезистентной формой хронической ИТП с тромбоцитопенией до $30 \times 10^9/\text{л}$, периодически возникающими носовыми кровотечениями, длительными кровотечениями после удаления зубов. У бабушки пациентов тромбоцитопения до $58 \times 10^9/\text{л}$ обнаружена в зрелом возрасте (ранее исследований также не проводили). Случаи ОМЛ, МДС и других злокачественных гематологических заболеваний в семье не наблюдались.

Учитывая геморрагический синдром, результаты лабораторных исследований и отягощенный

семейный анамнез, пациентке И. и пациенту М. методом высокопроизводительного секвенирования ДНК из клеток периферической крови был произведен поиск патогенных мутаций, ассоциированных с тромбоцитопениями, тромбоцитопатиями, коагулопатиями (таргетная панель высокопроизводительного секвенирования «Тромбоцитопении, тромбоцитопатии»). В гене *ANKRD26* в 5'-нетранслируемой области обнаружена замена одного нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.-118С > А, описанная в литературе как патогенная при *ANKRD26*-связанной тромбоцитопении. Такая же мутация была обнаружена у отца пациентов.

На основании полученных данных пациентам поставлен диагноз: «семейная (наследственная) *ANKRD26*-связанная тромбоцитопения». Родителям даны общие рекомендации по профилактике и оста-

новке кровотечений, рекомендовано динамическое наблюдение у педиатра и гематолога. Оптимальный подход к наблюдению пациентов с наследственными тромбоцитопениями, ассоциированными с риском гемобластозов, не определен; на сегодняшний день принята наблюдательная тактика с контролем гемограммы без каких-либо превентивных вмешательств [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ex vivo у пациентов наблюдается сниженное тромбообразование при нормальной активности тромбоцитов *in vitro*. В первую очередь у пациентов было проведено исследование активации одиночных тромбоцитов аналогом коллагена (рисунк 1). Установлено, что внутриклеточная сигнализация (изменение концентрации кальция) и функцио-

Рисунок 1

Активность тромбоцитов в ответ на физиологическую активацию *in vitro*: средние изменения внутриклеточной концентрации кальция (А, В) и связывания фибриногена (Б, Г) при стимуляции 2 μ М АДФ (А, Б) или 5 μ г/мл CRP (collagen-related peptide – аналог коллагена) (В, Г) тромбоцитов пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией и тромбоцитов здоровых доноров

Figure 1
Analysis of the platelet response to physiological activation *in vitro*. Mean intracellular calcium change (А, В) and fibrinogen binding (Б, Г) upon stimulation by 2 μ М of ADP (А, Б) or 5 μ г/мл of CRP (collagen related peptide, collagen mimetic) (В, Г) of platelets of patients with *ANKRD26*-associated thrombocytopenia or platelets of healthy donors

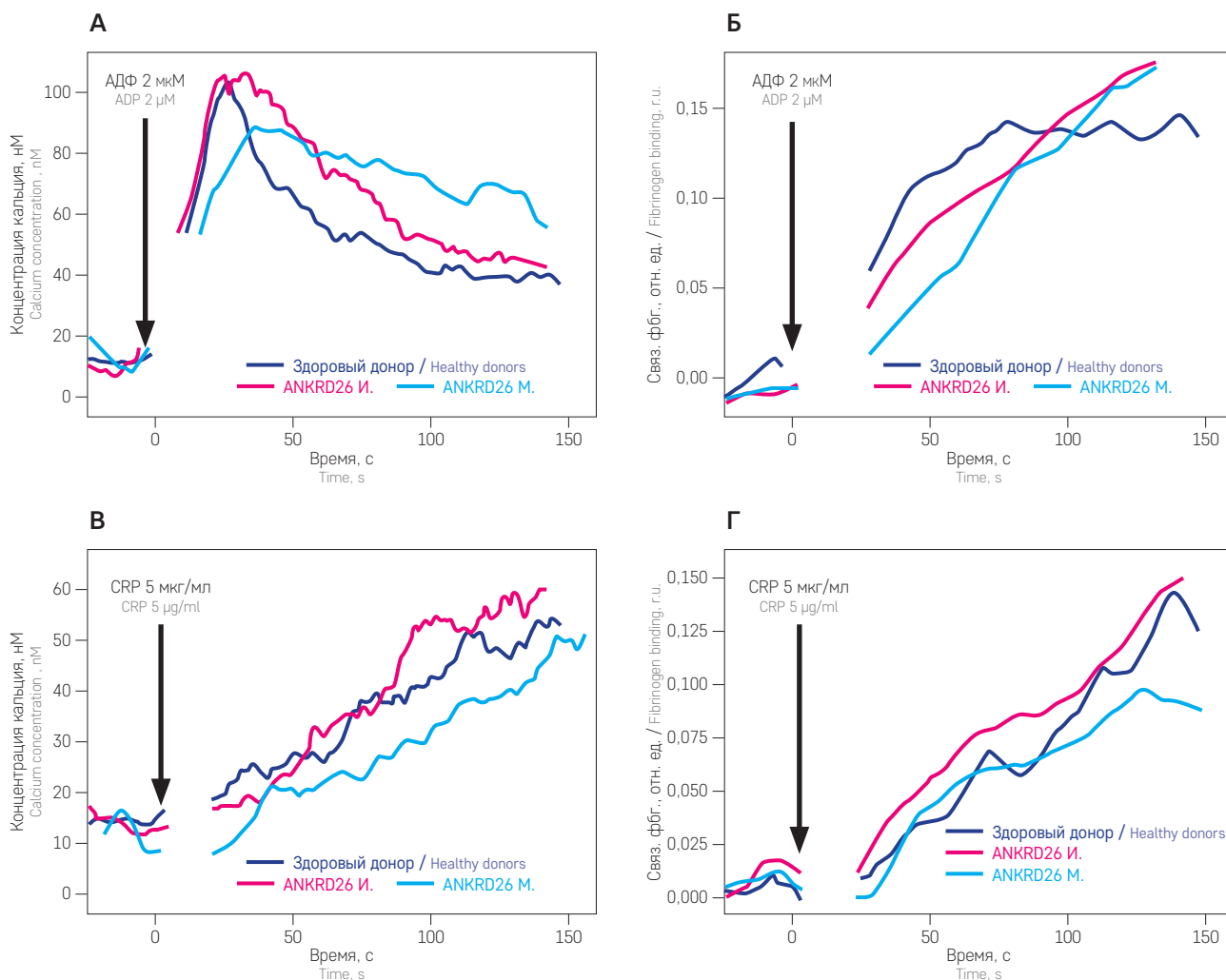
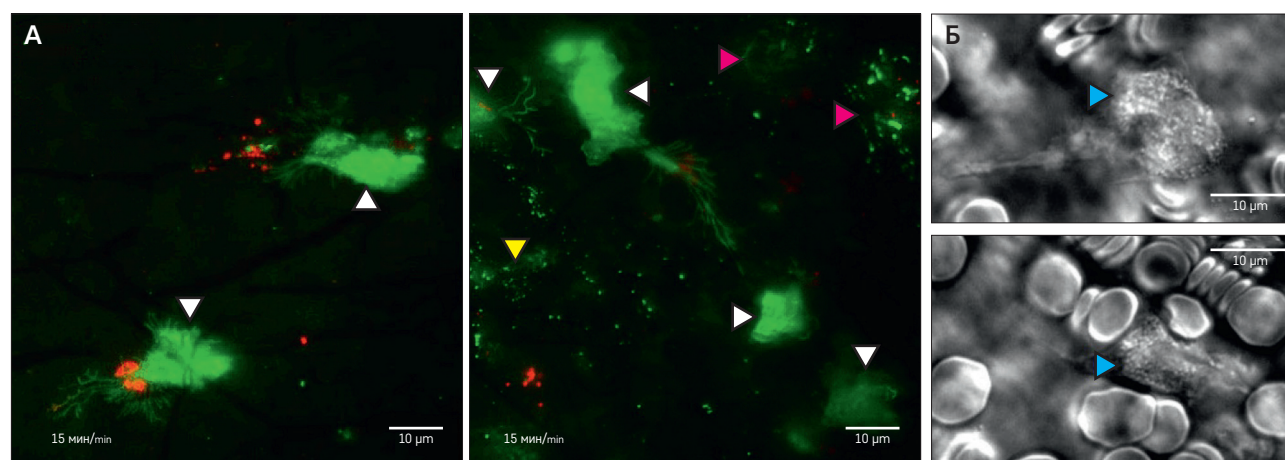
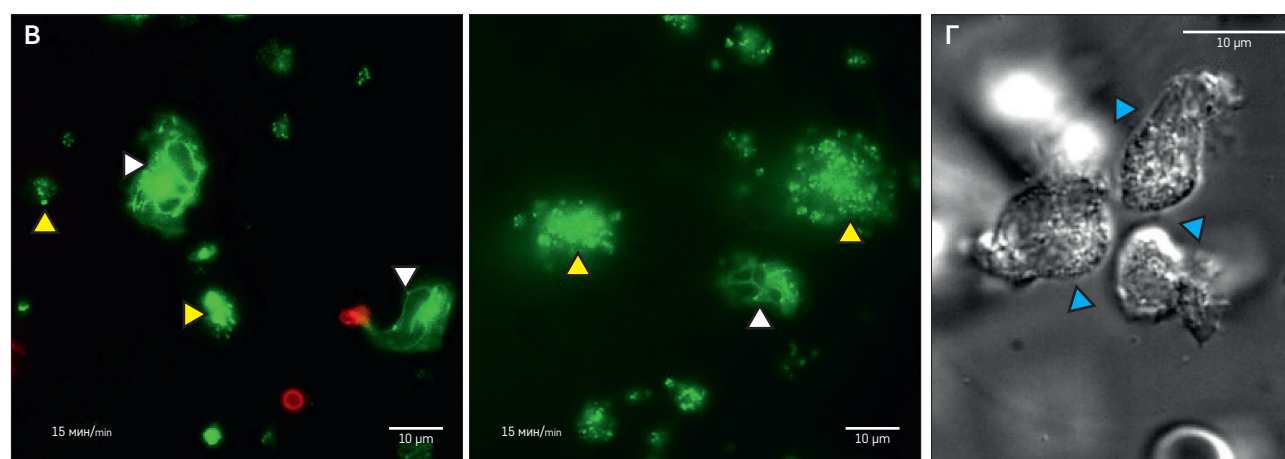


Рисунок 2

Морфология гранулоцитов и размер тромбов у пациентов (А, Б) и здоровых доноров (В, Г)

Figure 2

Granulocyte morphology and thrombus size of patients (A, B) and healthy donors (B, Г)

Типичные поля зрения для пациентов/Typical fields of view of patients**Типичные поля зрения для здоровых доноров/Typical fields of view of healthy donors**

Подвижный гранулоцит
Moving granulocyte
 Распластанный гранулоцит
Spread granulocyte
 Агрегат тромбоцитов
Platelet aggregate

Подвижный гранулоцит
Moving granulocyte

В исследовании использовали цельную кровь двух пациентов с диагнозом «наследственная тромбоцитопения», ассоциированная с мутацией в гене *ANKRD26*, и 10 здоровых педиатрических доноров. Образец инкубировали с флуоресцентными маркерами на клеточные мембраны (DiOC6, зеленый) и фосфатидилсерин (Annexin V, красный). Образцы крови пропускали через проточную камеру над фибриллярным коллагеном I типа со скоростью сдвига 100 s^{-1} . Наблюдения проводили в малоугловом режиме флуоресцентной микроскопии (А, В) и в режиме дифференциально-интерференционного контраста (Б, Г) (*Nikon Eclipse Ti-E*). Представлены типичные поля зрения на 15-й минуте эксперимента.

Whole blood of two patients diagnosed with hereditary *ANKRD26*-linked thrombocytopenia and 10 healthy pediatric donors. Samples were incubated with fluorescent membrane marker (DiOC6, green) and phosphatidylserine sensitive marker (AnnexinV, red). Blood samples were perfused through the flow chamber over the fibrillar collagen (I type) at 100 s^{-1} shear-rate. Samples were observed at low angle fluorescent mode (A, B) or in DIC (Б, Г) (*Nikon Eclipse Ti-E*). Typical fields of view at 15 minutes from the start of the experiment are given.

нальные ответы (связывание фибриногена) при активации тромбоцитов АДФ/CRP у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией не отличались от ответов тромбоцитов здоровых доноров.

После этого провели исследование функционирования гранулоцитов одновременно с исследованием тромбообразования на коллагене. Как и у других пациентов со сниженной концентрацией тромбоцитов, наблюдаемая площадь тромбов оказа-

лась значительно меньше, чем у здоровых доноров (рисунки 2). У здоровых доноров через 30 мин эксперимента относительное покрытие области наблюдения тромбами составляет 18–21%; у пациента И. – 8%, а у пациента М. – менее 1%.

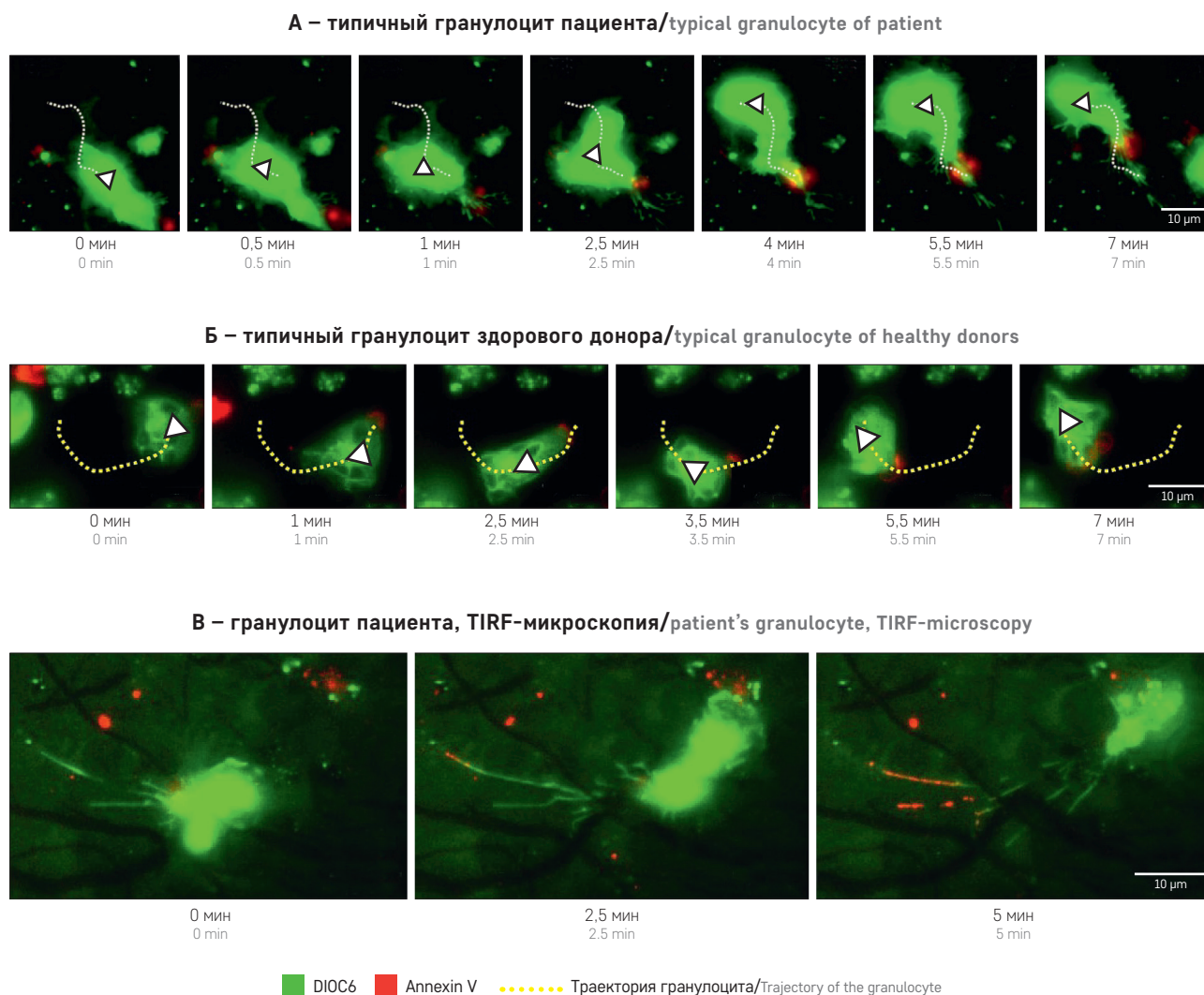
Наблюдаемая морфология гранулоцитов различна у пациентов и здоровых доноров. При исследовании образцов крови пациентов И. и М. методом анализа функционирования гранулоцитов замечены значительные отличия в морфо-

Рисунок 3

Движение гранулоцита в окрестности тромба: представлены типичные траектории и времена движения гранулоцита пациента (А) и здорового донора (Б) через 30 мин эксперимента (условия эксперимента описаны на рисунках 2 А, Б); режим TIRF-микроскопии (200 нм т поверхности); наблюдается гибель псевдоподий (появление окраски Annexin V и исчезновение окраски DiOC6) при их отделении от клетки (В)

Figure 3

Granulocyte crawling among thrombi: typical trajectories of the granulocyte crawling of patient (А) and healthy donors (Б) at 30 minutes from the start of the experiment (experiment conditions are given at fig. 2 А, В). TIRF-microscopy (200 nm above the surface) field of view. Death of the pseudopodia (AnnexinV binding and DiOC6 fluorescence decrease) is observed upon their detachment from the cell (В)



логии их лейкоцитов и лейкоцитов здоровых доноров (рисунки 2). На всех стадиях эксперимента гранулоциты пациентов были окрашены равномернее (без четко выделяемых структур – ядра или митохондрии) (рисунки 2 А), чем гранулоциты здоровых доноров (их типичный вид представлен на рисунке 2 В). В режиме дифференциально-интерференционного контраста подвижные гранулоциты здоровых доноров (рисунки 2 Г) наблюдались как дископодобные клетки с четкими внутренними и внешними границами, а гранулоциты пациентов (рисунки 2 Б) имели менее четко выраженные границы и гранулярность. Кроме того, при движении гранулоцитов пациентов наблюдалось множество (10–20) тонких псевдоподий (поперечный размер – 100–200 нм), окрашиваемых по DiOC6 (рисунки 3). Такое явление

ранее не наблюдалось в данном тесте ни у здоровых доноров, ни у пациентов с другими наследственными тромбоцитопатиями [12]. У пациентов И. и М. в ходе эксперимента отмечена также сниженная активация гранулоцитов: у здоровых доноров в первые 30 мин эксперимента 20–25% гранулоцитов находятся в распластанном состоянии, а у пациентов все наблюдаемые гранулоциты были в состоянии движения (рисунки 3).

Для гранулоцитов пациентов характерна нормальная скорость при большей кривизне траекторий движения. При автоматическом расчете скоростей движения гранулоцитов по смещению центра масс наблюдалось незначительное снижение скорости движения гранулоцитов пациентов (69 нм/с – для И. и 65 нм/с – для М.) по сравнению с грануло-

цитами здоровых доноров (68–78 нм/с). Однако при ручной обработке данных замечено, что для движения гранулоцитов пациентов характерна более изогнутая траектория (рисунки 3 а), чем у гранулоцитов здоровых доноров. Наблюдаемые при этом мгновенные скорости соответствуют таковым у здоровых доноров (0–400 нм/с). Вторая отличительная особенность движения гранулоцитов пациентов – их неустойчивость (рисунки 3 б). При смещении гранулоцита происходит отрыв и гибель некоторых из псевдоподий. Все эти наблюдения свидетельствуют об изменениях в актиновом цитоскелете гранулоцитов пациентов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы провели *ex vivo* исследование функционирования гранулоцитов (преимущественно нейтрофилов) пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией при образовании тромбов в проточных камерах при активации фибриллярным коллагеном в цельной крови, антикоагулированной гирудином (модель повреждения посткапиллярной вены). Результаты исследования показали, что у пациентов наблюдается значительно сниженный размер тромбов по сравнению со здоровыми педиатрическими донорами. При этом у пациентов наблюдаются нормальная активность тромбоцитов в ответ на стимуляцию АДФ/коллагеном и нормальная скорость движения гранулоцитов. Наблюдается также значительное изменение формы гранулоцитов пациентов при движении по сравнению с гранулоцитами здоровых доноров.

ANKRD26 экспрессируется в клетках головного мозга, желудочно-кишечного тракта, печени, жировой ткани, гематопозитических клетках и др. Несмотря на то что точная функция этого белка в клетках неизвестна, считается, что он может принимать участие в белок-белковых взаимодействиях, в том числе с цитоскелетом [1]. Таким образом, наблюдаемые в нашем исследовании отличия формы гранулоцитов (искривленная траектория движения; см. рисунок 3), большое количество тонких псевдоподий (рисунки 2, 3), а также разрыв псевдоподий, отмеченный в процессе движения (рисунки 3), могут свидетель-

ствовать о нестабильности актинового цитоскелета или актин-миозинового взаимодействия в гранулоцитах пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патогенетические варианты в 5'UTR гена *ANKRD26* приводят к нарушению связи транскрипционных факторов RUNX1 и FLI1 (фактор интеграции лейкемии Френда). В процессе нормального мегакариопоэза RUNX1 и FLI1 даунрегулируют экспрессию *ANKRD26*. Нарушение связывания данных факторов приводит к оверэкспрессии *ANKRD26* в мегакариоцитах и дефективной продукции тромбоцитов. Накопление *ANKRD26* в мегакариоцитах усиливает сигнализацию через TPO/MPL (миелолипролиферативный лейкоэмический вирусный онкоген), MAPK/ERK и mTOR [13] сигнальные пути, что могло бы объяснить увеличенный риск миелоидной трансформации [14]. Наблюдаемую в данном исследовании повышенную активность гранулоцитов можно также объяснить патологическим задействованием сигнального каскада MAPK/ERK при активации гранулоцитов, поскольку известно, что он участвует в хемотаксисе нейтрофилов [15]. Однако для лучшего понимания молекулярных механизмов, определяющих наблюдаемые изменения морфологии гранулоцитов, требуются дальнейшие исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана стипендией Президента РФ СП-2675. 2019.4., грантом Фонда поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «Наука – детям» и грантом РФФИ 18-34-20026.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Morozova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1443-4902>
Martyanov A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0211-6325>
Panteleev M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>
Zharkov P.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4384-6754>
Fedorova D.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4567-1871>
Sveshnikova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

Литература

1. Perez Botero J.P., Dugan S.N., Anderson M.W. *ANKRD26*-Related Thrombocytopenia, in: E. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (Ed.), *GeneReviews*, Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2018: p. 2018 Jun 21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507664/>
2. Averina M., Jensvoll H., Strand H., Sovershaev M. A novel *ANKRD26* gene variant causing inherited thrombocytopenia in a family of Finnish origin: Another brick in the wall? *Thromb Res* 2017; 151: 41–3. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.01.001
3. Ердмаева Я.А., Федорова Д.В., Жарков П.А., Курникова М.А., Манн С.Г., Райкина Е.В. *ANKRD26*-связанная тромбоцитопения как частный слу-

- чай наследственной тромбоцитопении с предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2019; 18:54–61. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-54-61
4. Noris P., Favier R., Alessi M.C., Geddis A.E., Kunishima S., Heller P.G., et al. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood* 2013; 122: 1987–9. DOI: 10.1182/blood-2013-04-499319
 5. Balduini A., Raslova H., Di Buduo C.A., Donada A., Ballmaier M., Germeshausen M., Balduini C.L. Clinic, pathogenic mechanisms and drug testing of two inherited thrombocytopenias, ANKRD26-related Thrombocytopenia and MYH9-related diseases. *Eur J Med Genet* 2018; 61: 715–22. DOI: 10.1016/j.ejmg.2018.01.014
 6. Perez Botero J., Ho T.P., Hogan W.J., Kenderian S., Gangat N., Tefferi A., et al. Clinical spectrum and clonal evolution in germline syndromes with predisposition to myeloid neoplasms. *Br J Haematol* 2018; 182: 141–5. DOI: 10.1111/bjh.14746
 7. Necchi V., Sommi P., Vanoli A., Manca R., Ricci V., Solcia E. Proteasome particle-rich structures are widely present in human epithelial neoplasms: correlative light, confocal and electron microscopy study. *PLoS One* 2011; 6: e21317. DOI: 10.1371/journal.pone.0021317
 8. Noris P., Perrotta S., Seri M., Pecci A., Gnan C., Loffredo G., et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: Analysis of 78 patients from 21 families. *Blood* 2011; 117: 6673–80. DOI: 10.1182/blood-2011-02-336537
 9. Necchi V., Balduini A., Noris P., Barozzi S., Sommi P., di Buduo C., et al. Ubiquitin/proteasome-rich particulate cytoplasmic structures (PaCSs) in the platelets and megakaryocytes of ANKRD26-related thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2013; 109: 263–71. DOI: 10.1160/TH12-07-0497
 10. Rayes J., Watson S.P., Bourne J.H., Brill A. The dual role of platelet – innate immune cell interactions in thromboinflammation, 2019; 1–13. DOI: 10.1002/rth2.12266
 11. Мартыанов А.А., Морозова Д.С., Хорева А.Л., Пантелеев М.А., Щербина А.Ю., Свешникова А.Н. Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта–Олдрича. *Вопросы онкологии/гематологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 1.
 12. Morozova D.S., Martyanov A.A., Korobkina J.-J.D., Sokolov A.V., Shamova E.V., Gorudko I.V., Obyednyy S.I., Sveshnikova A.N. Granulocytes role in thrombus formation under low shear rate flow conditions as procoagulant platelet scavengers. In submission, 2020.
 13. Raciti G.A., Bera T.K., Gavrilova O., Pastan I. Partial inactivation of Ankrd26 causes diabetes with enhanced insulin responsiveness of adipose tissue in mice. *Diabetologia* 2011; 54: 2911–22. DOI: 10.1007/s00125-011-2263-9
 14. Bluteau D., Balduini A., Balayn N., Currao M., Nurden P., Deswarte C., et al. Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J Clin Invest* 2014; 124: 580–91. DOI: 10.1172/JCI71861
 15. Aomatsu K., Kato T., Fujita H., Hato F., Oshitani N., Kamata N., et al. Toll-like receptor agonists stimulate human neutrophil migration via activation of mitogen-activated protein kinases. *Immunology* 2008; 123: 171–80. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02684.x