

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 05.11.2019
Принята к печати 23.12.2019

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-100-107

Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта–Олдрича

А.А. Мартыанов^{1, 2, 3, 4}, Д.С. Морозова³, А.Л. Хорева², М.А. Пантелеев^{1, 2, 3, 5}
А.Ю. Щербина², А.Н. Свешникова^{1, 2, 3, 6}

¹ ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

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

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

⁴ ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН, Москва

⁵ ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт», Москва

⁶ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва

Контактная информация:

Пантелеев Михаил Александрович,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
зав. лабораторией клеточного
гемостаза и тромбоза НМИЦ детской
гематологии, онкологии и иммуноло-
гии им. Дмитрия Рогачева
Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

Одна из ключевых особенностей синдрома Вискотта–Олдрича (СВО), редкого X-сцепленного иммунодефицитного состояния, – микротромбоцитопения, приводящая к спонтанным/пост-травматическим кровотечениям. Причиной развития синдрома Вискотта–Олдрича является мутация в гене белка WASP, участвующего в поляризации актина и перестройке актинового цитоскелета. Механизм влияния данной мутации на внутриклеточную кальциевую сигнализацию, а также функциональные ответы тромбоцитов пациентов с СВО не уточнены. Цель исследования: анализ кальциевой сигнализации, изменения формы и связывания фибриногена тромбоцитами пациентов с СВО. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. В исследование были включены 3 пациента с СВО и 3 здоровых донора. Внутриклеточная кальциевая сигнализация и функциональные ответы тромбоцитов наблюдались на проточном цитометре *BD FACS Canto II*. Для измерения концентрации кальция в цитозоле тромбоцитов использовали флуорофор *Fura-Red*; изменение формы тромбоцитов при активации оценивали по боковому светорассеянию клеток на длине волны 488 нм; активацию тромбоцитарных интегринов – по связыванию флуоресцентно-меченного фибриногена. Во время активации концентрация тромбоцитов составляла 1000 клеток/мкл во избежание эффекта вторичной активации. В покое состоянии тромбоцитов наблюдалась повышенная концентрация кальция в цитозоле тромбоцитов пациентов по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров. В ответ на стимуляцию максимально достижимые концентрации кальция были сопоставимы в обоих случаях. Связывание фибриногена с тромбоцитами пациентов не было значимо изменено по сравнению со здоровыми донорами. С другой стороны, изменение формы клеток в ответ на активацию, выраженное в процентах, у пациентов оказалось более значимым, чем изменение формы тромбоцитов здоровых доноров. При схожих максимальных ответах на стимуляцию всеми агонистами концентрация кальция в покое тромбоцитах, а также изменение формы тромбоцитов у пациентов с СВО значимо выше, чем у тромбоцитов здоровых доноров. Данные результаты можно объяснить увеличенным отношением площади мембраны тромбоцитов к их объему.

Ключевые слова: тромбоциты, синдром Вискотта–Олдрича, кальциевая сигнализация, проточная цитометрия, орфанные заболевания

Мартыанов А.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 100–107.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-100-107

Specific features of intracellular calcium signalling, distinctive for Wiskott-Aldrich syndrome patients

A.A. Martynov^{1, 2, 3, 4}, D.S. Morozova³, A.L. Khoreva², M.A. Panteleev^{1, 2, 3, 5}
A.Yu. Shcherbina², A.N. Sveshnikova^{1, 2, 3, 6}

¹ Centre for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology Russian Academy of Sciences, Moscow

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

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow

⁴ Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

⁵ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow

⁶ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

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

Wiskott–Aldrich syndrome (WAS) is a rare X-linked immunodeficient disease accompanied by microthrombocytopenia, which leads to spontaneous/post-traumatic haemorrhages. It has been demonstrated that WAS is caused by gene mutation of WASP protein, which is participating in the processes of actin polarization and actin cytoskeleton re-organisation. It is yet unknown how this mutation affects intracellular signalling and functional responses of platelets of patients with WAS. Assessment of the intracellular calcium signalling, shape change and fibrinogen binding by the platelets of WAS patients. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. Three patients with WAS and three healthy volunteers were included in the study. Intracellular signaling and platelet functional responses were observed on a BD FACS Canto II flow cytometer. To measure the calcium concentration in the platelet cytosol, the Fura-Red fluorophore was used, platelet shape change upon activation was evaluated by side scattering of cells at a wavelength of 488 nm, platelet integrin activation was evaluated by binding of fluorescently-labeled fibrinogen. During activation, the platelet concentration was 1000 cells per μ l to avoid the effects of secondary activation. In quiescent state of platelets, an increased concentration of calcium in the cytosol of platelets of patients was observed compared with platelets of healthy donors. In response to stimulation, the highest achievable calcium concentrations were comparable in both cases. The binding of fibrinogen to platelets in patients was not significantly changed compared to healthy donors. On

the other hand, the change in the shape of the cells in response to activation, expressed as a percentage, was more significant in patients than the change in the shape of the platelets of healthy donors. With similar maximum responses to stimulation by all agonists, the concentration of calcium in resting platelets, as well as the change in the platelet shape of patients with WAS is significantly higher than that of healthy platelet donors. These results can be explained by the increased ratio of the platelet membrane area to their volume.

Key words: platelets, Wiskott-Aldrich Syndrome, calcium signalling, flow cytometry, orphan disease

Shamanskaya T.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 100–107.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-100-107

Синдром Вискотта–Олдрича (СВО) – редкое X-сцепленное иммунодефицитное состояние, характеризующееся тромбоцитопенией, восприимчивостью к инфекциям и такими осложнениями, как атопический дерматит, аутоиммунные и злокачественные заболевания [1, 2]. Этиология этого синдрома заключается в различных мутациях гена, кодирующего белок WASp [3]. Данный белок играет важную роль в полимеризации актина, перестройке цитоскелета гематопозитических клеток при активации [4], в том числе при формировании иммунологического синапса [5].

СВО характеризуется различной тяжестью и степенью выраженности симптомов. Однако тромбоцитопения, в отличие от остальных проявлений, – постоянный симптом этого заболевания, приводящий к спонтанным и/или посттравматическим эпизодам кровотечения. За редким исключением, маленький размер тромбоцитов является патогномоничным признаком СВО [6]. Механизмы возникновения тромбоцитопении изучены не до конца: исследования пациентов с данным синдромом и нокаутных по гену WASp мышей показывают как нарушение тромбопоэза в костном мозге [7], так и нормальную продукцию тромбоцитов [8]. Другие исследования объясняют тромбоцитопению усиленным фагоцитозом тромбоцитов макрофагами селезенки [9], возможно, в связи с увеличенным экспонированием фосфатидилсерина на их поверхности [10] или наличием антитромбоцитарных антител [11]. Несмотря на то что большая часть функций тромбоцитов при СВО сохранена, существуют работы, показывающие дефицит плотных гранул [12, 13], а также склонность к запланированной клеточной гибели в связи с малым количеством митохондрий в данных тромбоцитах [14].

Диагностика СВО проводится у мальчиков с изолированной тромбоцитопенией или тромбоцитопенией с сопутствующими дерматитом, рецидивирующими инфекциями, аутоиммунными и злокачественными заболеваниями. Однако количество тромбоцитов у разных пациентов сильно варьирует, что затрудняет лабораторную диагностику [15], поэтому необходимо также учитывать маленький размер тромбоцитов, высокий процент незрелых тромбоцитов [16], тромбоцитов с повышенным экспонированием фосфатидилсерина [17] и показатели

гемостатических тестов [18]. Окончательный диагноз может быть подтвержден при определении мутации гена WAS [19]. Использование проточной цитометрии – это метод, позволяющий быстро подтвердить диагноз при полном отсутствии или сниженной экспрессии WASp в лимфоцитах периферической крови пациентов, однако в редких случаях СВО экспрессия WASp остается нормальной [20].

Большинство сигнальных путей в тромбоцитах приводит к изменению концентрации свободных ионов кальция в цитозоле, которая, в свою очередь, запускает функциональные ответы тромбоцитов – изменение формы, проагрегантную и прокоагулянтную активность [17, 21]. Анализ кальциевой сигнализации в ответ на стимуляцию различными агонистами позволяет всесторонне оценить потенциальные функциональные нарушения в тромбоцитах, а также идентифицировать новые маркеры, специфичные для различных заболеваний, в данном случае – для синдрома Вискотта–Олдрича.

Цель исследования: анализ изменения концентрации кальция и функциональных ответов (изменения формы и связывания фибриногена) тромбоцитов здоровых доноров и пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича методом проточной цитометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Проанализированы образцы от трех пациентов в возрасте 8 мес., 10 мес. и 2 лет с тромбоцитопенией в составе синдрома Вискотта–Олдрича ($27\text{--}51 \times 10^9/\text{л}$ тромбоцитов), госпитализированных в НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России в 2019 году. Диагноз подтвержден выявлением мутаций гена WAS (таблица 1). На момент постановки эксперимента терапию агонистами ТПР не проводили. В качестве контроля использовали кровь здоровых молодых доноров (до 20 лет).

В исследовании были использованы следующие материалы: чувствительный к концентрации кальция, проникающий сквозь липидные мембраны клеток флуорофор *Fura-Red-AM* (*Molecular Probes, Eugene, Орегон, США*); фукоидан из водорослей

Таблица 1

Пациенты, включенные в исследование

Table 1

Patients, included in the study

Пациент Patient	Возраст Age	Мутация WAS WAS mutation	Экспрессия WASP WASP expression
Пациент 1 Patient 1	6 мес. 6 months	c.1058_1061delCACC	–
Пациент 2 Patient 2	1 год 6 мес. 1 year 6 months	c.775delG	–
Пациент 3 Patient 3	1 год 9 мес. 1 year 9 months	c.121C > T	–

Fucus Vesiculosus, АДФ, EGTA, HEPES, бычий сывороточный альбумин, апираза (степень очистки VII), TRAP-6 (*Sigma-Aldrich, St Louis, Миссури, США*); NaCl; Na₂HPO₄; KCl; NaHCO₃; MgCl₂; CaCl₂ (Агат-Мед, Москва, Россия).

Кровь здоровых доноров и пациентов с СВО забирали из локтевой вены в вакуумные пробирки, содержащие гирудин (*Sarstedt Monovette*®). Кровь была окрашена кальций-чувствительным флуорофором *Fura-Red* в концентрации 2 мкМ в присутствии 0,1 ед/мл апиразы в течение 35 мин при 37°C. По истечении 35 мин отбирали богатую тромбоцитами плазму, образованную при осаждении эритроцитов, и разводили буфером Тирода (134 мМ NaCl; 0,34 мМ Na₂HPO₄; 2,9 мМ KCl; 12 мМ NaHCO₃; 20 мМ HEPES; 5 мМ глюкозы; 1 мМ MgCl₂; 2 мМ CaCl₂; БСА 2% по массе; pH 7,3) до концентрации тромбоцитов 1×10^3 в мл.

Исследование проведено посредством проточного цитометра BD FACS *Canto II*. К пробам добавляли флуоресцентно-меченный фибриноген человека в концентрации 100 мкг/мл. После этого пробы анализировали в кинетическом режиме. Через 60 сек от начала исследования к пробам добавляли активаторы (2 мкМ АДФ; 2,5 мкМ TRAP-6; 5 мкг/мл CRP; 100 мкг/мл фукоидан). Для пересчета флуоресценции *Fura-Red* в концентрации кальция последовательно добавляли 1 мкМ иономицина и 10 мМ EGTA. Пересчет производили по формуле Гринкевича [22]. Дополнительно проводили нормировку на теоретически рассчитанную концентрацию кальция в присутствии 10 мМ EGTA на основе [23]. Связывание фибриногена считали максимальным после инкубации пробы с 1 мкМ иономицина в течение 3 мин.

Статистический анализ результатов проточной цитометрии выполнен с применением *Python 3.7*. Для оценки статистической значимости использовали критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характерная особенность тромбоцитов у пациентов с СВО – меньший их размер по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров [14]. С помощью метода проточной цитометрии подтверждено, что тромбоциты пациентов с СВО обладают меньшим прямым светорассеянием (FSC, *рисунк 1 А*), чем тромбоциты здоровых доноров (*рисунк 1 Б*). При активации тромбоцитов происходит изменение их формы с дискоидной на сферическую, что приводит к уменьшению бокового светорассеяния на проточном цитометре. Данное явление наблюдалось и при исследовании тромбоцитов пациента с СВО (*рисунк 2 В*), и тромбоцитов здорового донора (*рисунк 2 Г*). Было также показано, что относительное изменение формы тромбоцитов пациентов с СВО при активации всеми агонистами происходило сильнее, чем у тромбоцитов здоровых доноров (*таблица 2*).

Определение концентрации свободных ионов кальция в цитозоле тромбоцитов у пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича. В покоящихся тромбоцитах здоровых доноров концентрация кальция постоянна и редко превышает 20 нМ (*рисунк 2 Б*). Однако при активации в тромбоцитах начинается кальциевый спайкинг – кратковременное многократное увеличение концентрации кальция в несколько раз, вплоть до 1 мкМ в максимуме, с последующей релаксацией до базового уровня. Кальциевые спайки хорошо наблюдаемы в экспериментах по микроскопии отдельных тромбоцитов [24]. Однако при анализе суспензии тромбоцитов с помощью проточной цитометрии происходит усреднение спайков по времени, что приводит к наблюдаемому постепенному увеличению концентрации кальция в целом по суспензии.

Сравнение концентрации кальция в цитозоле тромбоцитов пациентов с СВО (*рисунк 2 А*) и тромбоцитах здоровых доноров (*рисунк 2 Б*) показало, что в покое концентрация кальция в тромбоцитах пациента составляет 35–65 нМ; у здоровых доноров – 5–15 нМ, то есть в 2–4 раза выше. Мы обнаружили также, что после перемешивания в результате пипетирования концентрация кальция в тромбоцитах пациентов возрастает с последующим снижением до базового уровня, а в тромбоцитах здоровых доноров сохраняет стабильность вне зависимости от перемешивания (*рисунк 2 А, Б*).

Максимальная концентрация свободных ионов кальция и максимальное связывание фибриногена совпадают у тромбоцитов здоровых доноров и пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича. Качественное (*рисунк 2*) и количественное (*рисунк 3*) сравнение изменения концентрации кальция и связывания фибриногена тромбоцитами пациентов с СВО

Рисунок 1

Сравнение размера (FSC) и формы (SSC) тромбоцитов пациента с синдромом Вискотта–Олдрича и здорового донора: тромбоцитарная область зависимости бокового светорассеяния (SSC) от прямого светорассеяния на точечных диаграммах (FSC, указано напряжение на детекторах) для пациента (А) и здорового донора (Б); изменение бокового светорассеяния (SSC-H) при активации тромбоцитов пациента (В) и здорового донора (Г)

Figure 1

Comparison of the size (FSC) and shape (SSC) of platelets of WAS patients and platelets of healthy donors: platelet area on the dotplots of side scattering (SSC) vs forward scattering (FSC, detector voltages are given) for WAS patient (A) and healthy donors (B); change of the side scattering (SSC-H) upon activation of platelets of patients (B) and healthy donors (Г)

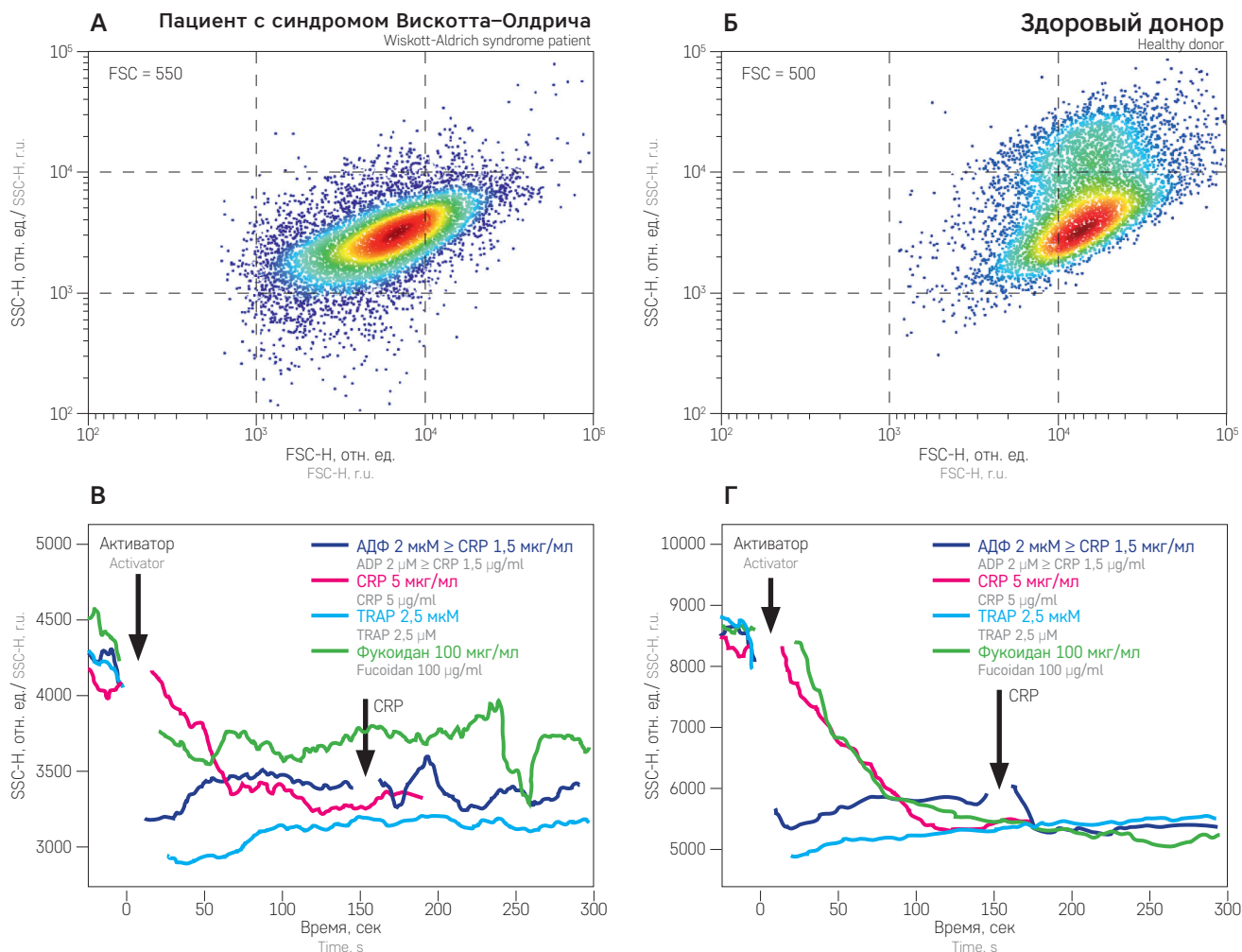


Таблица 2

Количественное значение характеристик активации тромбоцитов
(выделены статистически значимо различающиеся результаты; $p < 0,01$)

Table 2

Averaged values of the platelet activation parameters (significantly different values are given in bold; $p < 0.01$)

Активатор Activator	WAS WAS			Здоровые доноры Healthy donors		
	Кальций, нМ Calcium, nM	Фибриноген, отн. ед. Fibrinogen, r.u.	Изменение формы, % SSC Change, %	Кальций, нМ Calcium, nM	Фибриноген, отн. ед. Fibrinogen, r.u.	Изменение формы, % SSC Change, %
Покой Resting	56 ± 17	—	—	9 ± 6	—	—
Некор. АДФ Non-dyed ADP	—	17 ± 4	63 ± 7	—	20 ± 2	49 ± 6
АДФ ADP	117 ± 12	17 ± 4	67 ± 7	97 ± 26	15 ± 6	48 ± 3
TRAP-6 TRAP-6	165 ± 15	19 ± 4	67 ± 17	208 ± 40	16 ± 5	46 ± 9
CRP CRP	75 ± 15	7 ± 3	60 ± 3	77 ± 45	8 ± 4	40 ± 6
Фукоидан Fucoidan	—	5 ± 1	63 ± 4	—	9 ± 5	46 ± 7

Рисунок 2

Качественное сравнение активации тромбоцитов пациента с синдромом Вискотта–Олдрича и здорового донора: зависимость концентрации свободных ионов кальция в цитозоле тромбоцитов пациента (А) и здорового донора (Б) при активации; связывание фибриногена тромбоцитами пациента (В) и здорового донора (Г) при активации; Д – изменение концентрации свободных ионов кальция в цитозоле (сплошные линии) и связывание фибриногена (пунктир) тромбоцитами пациента (синяя линия) и здорового донора (красная линия) при последовательной активации фукоиданом и АДФ с интервалом в 5 мин

Figure 2

Qualitative comparison of the activation of platelets of Wiskott-Aldrich patients and healthy donors (А, Б) – dynamics of free calcium ions concentration in the platelet cytosol of WAS patients (А) and healthy donors (Б) upon activation. (В, Г) – fibrinogen binding by platelets of patient (В) and healthy donor (Г) upon activation; Д – cytosolic calcium concentration (solid lines) and fibrinogen binding (dotted lines) by platelets of WAS patients (black) and healthy donor (red) upon sequential activation by fucoidan and ADP delayed by 5 minutes

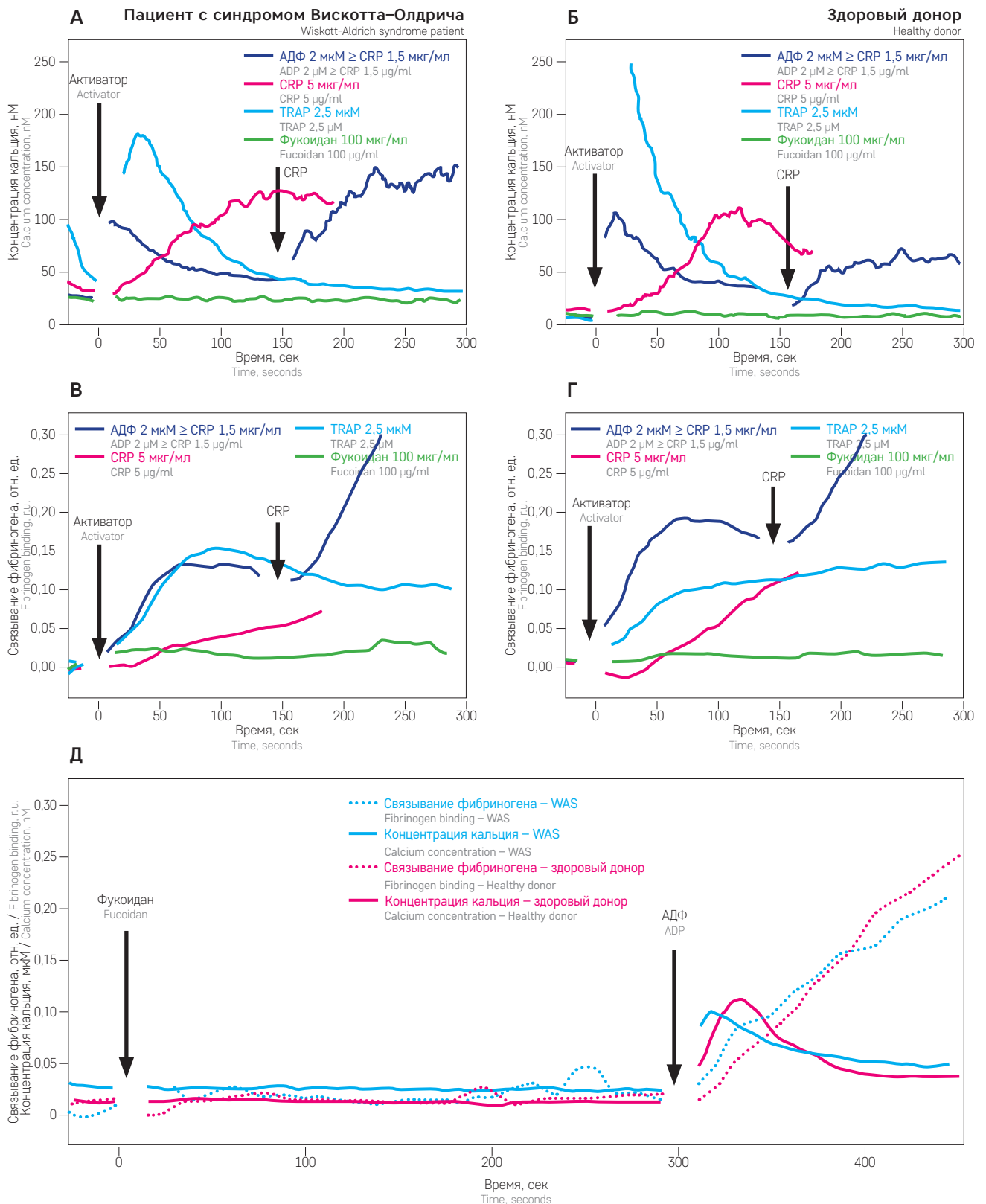
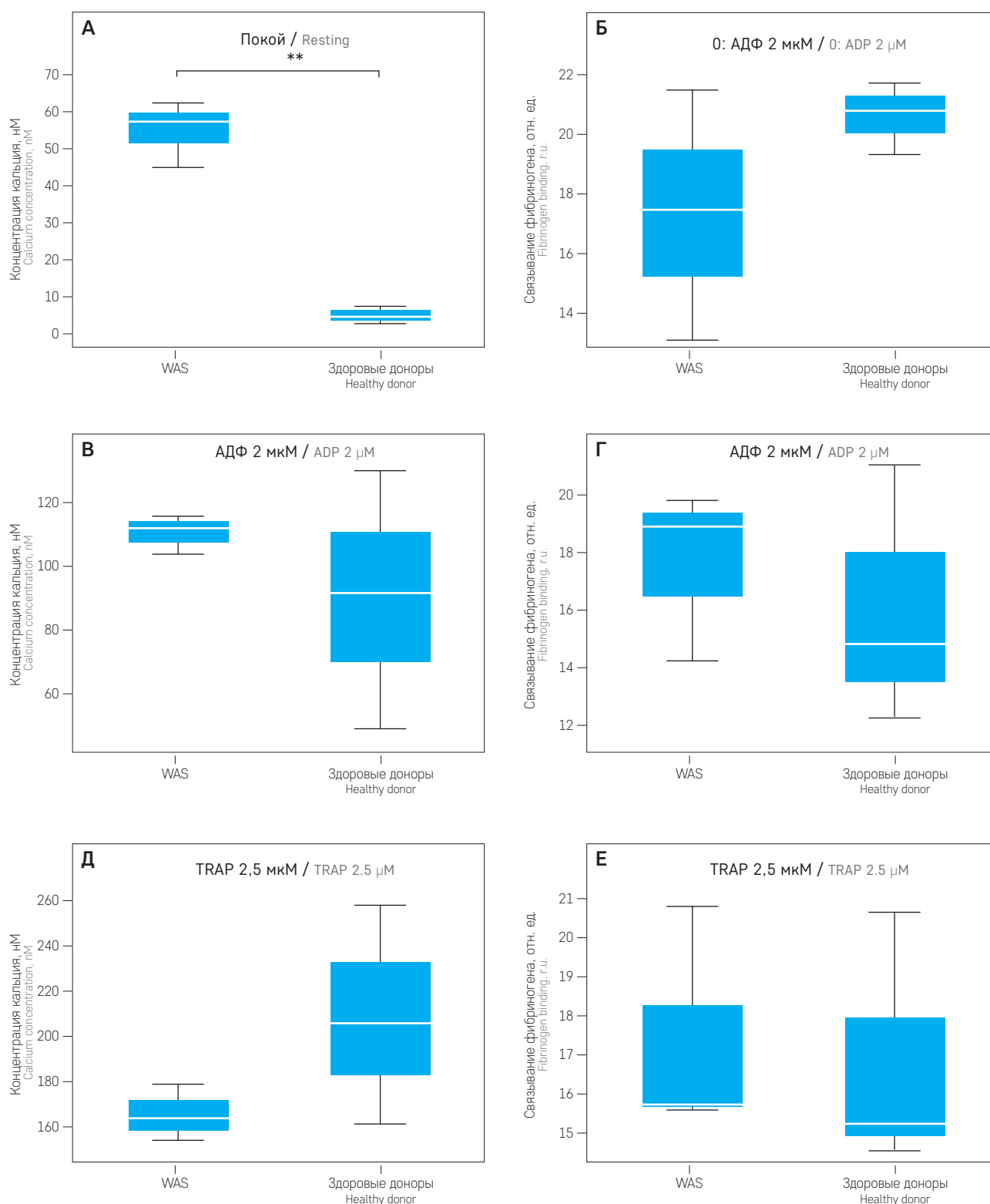


Рисунок 3

Количественное сравнение маркеров активации тромбоцитов пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича и здоровых доноров: **А** – концентрация кальция в поющих тромбоцитах; **Б** – связывание фибриногена неокрашенными тромбоцитами при стимуляции 2 мкМ АДФ; максимально достижимая концентрация свободных ионов кальция (**В**) и максимальное связывание фибриногена (**Г**) при стимуляции 2 мкМ АДФ окрашенных *Fura-Red* тромбоцитов (**Г**); максимально достижимая концентрация свободных ионов кальция (**Д**) и максимальное связывание фибриногена (**Е**) при стимуляции 2,5 мкМ TRAP окрашенных *Fura-Red* тромбоцитов (исследованы 3 пациента и 3 здоровых донора)

Figure 3

Quantitative comparison of the platelet activation parameters of WAS patients and healthy donors: **A** – cytosolic calcium concentration in the resting platelets; **Б** – fibrinogen binding by non-dyed platelets upon stimulation by ADP 2 μ M; **В, Г** – maximally achieved concentration of free calcium ions (**В**) and maximally achieved fibrinogen binding (**Г**) of *Fura-Red* loaded platelets upon activation by 2 μ M of ADP; **Д, Е** – maximally achieved concentration of free calcium ions (**В**) and maximally achieved fibrinogen binding (**Г**) of *Fura-Red* loaded platelets upon activation by 2.5 μ M of TRAP (3 patients and 3 healthy donors were included in the study)



показало, что, несмотря на увеличенную концентрацию кальция в покое (*рисунок 3 А*), при активации всеми видами активаторов максимальные концентрации кальция совпадают с таковыми у здоровых доноров (*рисунок 3 В, Д*). Было также отмечено, что связывание фибриногена при качественной и количественной оценках не отличается (*рисунки 2 В, Г и 3 Б, Г, Д*). Получено сходство и при последовательной активации CRP через 150 сек после стимуляции АДФ (*рисунок 2 А–Г*), индуцирующим различные ветви сигнализации в тромбоцитах (CRP индуцирует тирозинкиназную сигнализацию, АДФ – GPCR-сигнализацию), а также АДФ через 300 сек после активации фукоиданом, запускающим тирозинкиназную сигнализацию (*рисунок 2 Д*). Количественное сравнение характеристик активации тромбоцитов пациентов и здоровых доноров представлено в *таблице 2*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование внутриклеточной сигнализации и функциональной активности тромбоцитов при синдроме Вискотта–Олдрича было направлено как на выявление патофизиологических механизмов заболевания, так и на определение характерных черт, важных для диагностики данного заболевания. Методом проточной цитометрии проведен анализ внутриклеточной кальциевой сигнализации, а также изменения формы тромбоцитов и связывания фибриногена тромбоцитами у пациентов с СВ0 и здоровых доноров при активации различными агонистами.

Нами было показано, что для тромбоцитов пациентов с СВ0 характерна повышенная цитозольная концентрация кальция в состоянии покоя (см. *рисунки 2, 3, таблицу 2*). Это хорошо согласуется с данными опубликованного исследования [10]. С другой стороны, максимально достижимые концентрации кальция в ответ на индукторы как G-белковой, так и тирозинкиназной сигнализации не отличаются достоверно от таковых у здоровых доноров (см. *рисунок 3, таблицу 2*), что также согласуется с ранее опубликованными исследованиями [10], где использовалась стимуляция TRAP (активация ассоциированного с G-белком рецептора к тромбину PAR1). Данные по стимуляции аналогом коллагена (активация рецептора GPVI, действующего тирозинкиназную сигнализацию) позволяют предположить, что концентрация кальция у пациентов с СВ0 нарастает быстрее, чем у здоровых доноров.

Уменьшенный объем тромбоцитов у пациентов с СВ0 может быть одной из причин повышенной концентрации кальция в состоянии покоя по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров [6]. С другой стороны, более сильное изменение формы тромбоцитов у пациентов с синдромом Вискотта–

Олдрича может потенциально компенсировать изначальное различие в размерах. Данный результат, возможно, объясняет сходство максимально достижимых концентраций кальция при активации тромбоцитов пациентов и здоровых доноров, но для установления природы этого явления необходимы дополнительные исследования.

Известно, что, несмотря на уменьшенный размер, количество ключевых сигнальных и цитоскелетных белков в тромбоцитах пациентов с СВ0 и здоровых доноров совпадает [14]. Более сильное изменение формы тромбоцитов у пациентов может быть обусловлено большим значением отношения площади мембраны к объему цитозоля для тромбоцитов пациентов, предсказанным посредством компьютерного моделирования в ранее опубликованных работах [14]. Большее отношение площади мембраны к объему тромбоцита также предполагает усложненную открытую канальцевую систему.

Увеличение площади мембраны может быть одним из следствий нарушенного механизма тромбопоэза у пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича, в частности, нарушения процесса отшнуровывания протромбоцитов от мегакариоцитов, при котором важную роль выполняет белок WASp [25]. С другой стороны, измененное отношение площади мембраны к объему [14] может приводить к нестабильности открытой канальцевой системы тромбоцитов, что, в свою очередь, ведет к повышенной чувствительности тромбоцитов к сдвиговым стрессам и, возможно, их быстрой гибели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышенная концентрация кальция, а также более значимое изменение формы тромбоцитов при активации – характерные проявления синдрома Вискотта–Олдрича, которые можно использовать как дополнительные лабораторные маркеры при диагностике СВ0.

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», грантами РФФИ 17-00-00141 (17-00-00140/17-00-00138) и 18-34-20026.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Martyanov A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0211-6325>
Morozova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1443-4902>
Khareva A.L. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7684-9188>
Panteleev M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>
Shcherbina A.Yu. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3113-4939>
Sveshnikova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

Литература

1. Candotti F. Clinical Manifestations and Pathophysiological Mechanisms of the Wiskott–Aldrich Syndrome. *J Clin Immunol* 2018; 38 (1): 13–27.
2. Perry G.S. 3rd, Spector B.D., Schuman L.M., Mandel J.S., Anderson V.E., McHugh R.B., et al. The Wiskott–Aldrich syndrome in the United States and Canada (1892–1979). *J Pediatr* 1980; 97: 72–8.
3. Moratto D., Giliani S., Notarangelo L.D., Mazza C., Mazzolari E., Notarangelo L.D. The Wiskott–Aldrich syndrome: from genotype–phenotype correlation to treatment. *Expert Rev. Clin Immunol* 2007; 3: 813–24.
4. Rivers E., Thrasher A.J. Wiskott–Aldrich syndrome protein: Emerging mechanisms in immunity. *Eur J Immunol* 2017; 47: 1857–66.
5. Taylor M.D., Sadhukhan S., Kottangada P., Ramgopal A., Sarkar K., D'Silva S., et al. Nuclear Role of WASp in the Pathogenesis of Dysregulated TH1 Immunity in Human Wiskott–Aldrich Syndrome. *Sci Transl Med* 2010; 2: 37ra44 LP-37ra44.
6. Patel P.D., Samanich J.M., Mitchell W.B., Manwani D. A unique presentation of Wiskott–Aldrich syndrome in relation to platelet size. *Pediatr. Blood Cancer* 2011; 56: 1127–9.
7. Ochs H.D., Slichter S.J., Harker L.A., Von Behrens W.E., Clark R.A., Wedgwood R.J. The Wiskott–Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood* 1980; 55: 243–52.
8. Haddad E., Cramer E., Riviere C., Rambeau P., Louache F., Guichard J., et al. The thrombocytopenia of Wiskott Aldrich syndrome is not related to a defect in proplatelet formation. *Blood* 1999; 94: 509–18.
9. Prisolovsky A., Zeng X., Sokolic R.A., Garabedian E.N., Anur P., Candotti F., Strom T.S. Platelets from WAS patients show an increased susceptibility to ex vivo phagocytosis. *Platelets* 2013; 24: 288–96.
10. Shcherbina A., Rosen F.S., Remold-O'Donnell E. Pathological events in platelets of Wiskott–Aldrich syndrome patients. *Br J Haematol* 1999; 106: 875–83.
11. Mahlaoui N., Pellier I., Mignot C., Jais J.-P., Bilhou-Nabera C., Moshous D., et al. Characteristics and outcome of early-onset, severe forms of Wiskott–Aldrich syndrome. *Blood* 2013; 121: 1510–6.
12. Sandrock K., Zieger B. Current Strategies in Diagnosis of Inherited Storage Pool Defects. *Transfus Med Hemother* 2010; 37: 248–58.
13. Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Polokhov D.M., Suntsova E.V., Zharkov P.A., Fedorova D.V., et al. Flow cytometry for pediatric platelets. *Platelets* 2019; 30 (4): 428–37.
14. Obydenyi S.I., Artemenko E.O., Sveshnikova A.N., Ignatova A.A., Varlamova T.V., Gambaryan S., et al. Mechanisms of increased mitochondria-dependent necrosis in Wiskott–Aldrich syndrome platelets. *Haematologica* 2019. DOI: 10.3324/haematol.2018.214460 [Epub ahead of print].
15. Medina S.S., Siqueira L.H., Colella M.P., Yamaguti-Hayakawa G.G., Duarte B.K.L., Dos Santos Vilela M.M., Ozelo M.C. Intermittent low platelet counts hampering diagnosis of X-linked thrombocytopenia in children: report of two unrelated cases and a novel mutation in the gene coding for the Wiskott–Aldrich syndrome protein. *BMC Pediatr* 2017; 17: 151.
16. Sokolic R., Oden N., Candotti F. Assessment of Immature Platelet Fraction in the Diagnosis of Wiskott–Aldrich Syndrome. *Front Pediatr* 2015; 3: 49.
17. Obydenyi S.I., Sveshnikova A.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 1867–81.
18. Fischer A. Platelets are the Achilles' heel of Wiskott–Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2019; 144: 668–70.
19. Kwan A., Abraham R.S., Currier R., Brower A., Andruszewski K., Abbott J.K., et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA* 2014; 312: 729–38.
20. Chiang S. Screening for Wiskott–Aldrich syndrome by flow cytometry. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142: 333–5.
21. Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., et al. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 2045–57.
22. Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440–50.
23. Schoenmakers T.J., Visser G.J., Flik G., Theuvsen A.P. CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Biotechniques* 1992; 12: 870–9.
24. Heemskerk J.W.M., Hoyland J., Mansont W.T., Sage S. Spiking in cytosolic calcium concentration in single fibrinogen-bound fura-2-loaded human platelets. *Biochem J* 1992; 283: 379–83.
25. Poulter N.S., Pollitt A.Y., Davies A., Malinova D., Nash G.B., Hannon M.J., et al. Platelet actin nodules are podosome-like structures dependent on Wiskott–Aldrich syndrome protein and ARP2/3 complex. *Nat Commun* 2015; 6: 7254.