

10.24287/1726-1708-2021-20-2-65-73

# Особенности фенотипа тромбоцитов у детей с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией

Д.М. Полохов<sup>1</sup>, Д.В. Федорова<sup>1</sup>, А.В. Пшонкин<sup>1</sup>, А.А. Игнатова<sup>1</sup>, Е.А. Пономаренко<sup>1</sup>, М.Ю. Алексенко<sup>1</sup>, И.В. Мерсиянова<sup>1</sup>, Е.А. Серегина<sup>1</sup>, К.А. Воронин<sup>1</sup>, А.В. Полетаев<sup>1</sup>, Е.В. Райкина<sup>1</sup>, М.А. Пантелеев<sup>1-4</sup>, П.А. Жарков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup>ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

<sup>4</sup>ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный

Механизмы геморрагических проявлений у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией (*ANKRD26*-АТ) плохо изучены. Цель работы: провести поиск возможных морфофункциональных нарушений тромбоцитов у пациентов с мутациями в гене *ANKRD26* методом проточной цитометрии с активацией. Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Обследованы 8 детей в возрасте от 1,5 до 15 лет. Количество тромбоцитов варьировало от 29 до 172 тыс/мкл, медиана 60 тыс/мкл. Тяжесть геморрагических проявлений оценивали по стандартизированной шкале Pediatric Bleeding Questionnaire (PBQ) и она варьировала от 0 до 5 баллов, медиана 3,5 балла. Активация тромбоцитов производилась смесью CRP + TRAP. Сравнение проводили с результатами обследования 26 условно здоровых детей (контрольная группа, КГ) в возрасте от 2 до 15 лет. При сравнении с КГ у пациентов отмечалось увеличение размера (FSC;  $p = 0,018$ ) и гранулярности (SSC;  $p < 0,001$ ) тромбоцитов после активации. В отличие от КГ корреляционная связь между FSC и SSC тромбоцитов пациентов была недостоверной (корреляция 0,55;  $p = 0,15$ ). У пациентов наблюдалась высокая достоверная связь между количеством и FSC тромбоцитов (корреляция  $-0,93$ ;  $p < 0,001$ ), а также повышенная плотность CD42b ( $p < 0,001$ ) и снижение доли прокоагулянтных тромбоцитов ( $p = 0,01$ ) после активации. Выявленные изменения указывают на нарушения механизмов активации и изменения формы тромбоцитов у пациентов с *ANKRD26*-АТ. **Ключевые слова:** наследственная тромбоцитопения, дети, *ANKRD26*, проточная цитометрия, геморрагический синдром

Полохов Д.М. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2021; 20 (2): 65–73. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-65-73

## Platelet phenotype in children with *ANKRD26*-related thrombocytopenia

D.M. Polokhov<sup>1</sup>, D.V. Fedorova<sup>1</sup>, A.V. Pshonkin<sup>1</sup>, A.A. Ignatova<sup>1</sup>, E.A. Ponomarenko<sup>1</sup>, M.Yu. Aleksenko<sup>1</sup>, I.V. Mersyanova<sup>1</sup>, E.A. Seregina<sup>1</sup>, K.A. Voronin<sup>1</sup>, A.V. Poletaev<sup>1</sup>, E.V. Raykina<sup>1</sup>, M.A. Panteleev<sup>1-4</sup>, P.A. Zharkov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

<sup>2</sup>Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow

<sup>4</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

The mechanisms of hemorrhagic manifestations in patients with *ANKRD26* associated thrombocytopenia (*ANKRD26*-АТ) are poorly understood. The aim of this work is to detect possible morpho-functional disorders of platelets in patients with mutations in the *ANKRD26* gene by flow cytometry with activation. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. 8 children aged from 1.5 to 15 years were examined. The platelet count ranged from 29 to 172 thousand/ $\mu$ l, with a median of 60 thousand/ $\mu$ l. The severity of hemorrhagic manifestations was assessed on a standardized scale (Pediatric Bleeding Questionnaire, PBQ) and it ranged from 0 to 5 points, with a median of 3.5 points. Platelet activation was performed with a CRP + TRAP mixture. Comparison was carried out with the results of examination of 26 apparently healthy children (control group, CG) aged 2 to 15 years. When compared with CG, patients showed an increase in platelet size (FSC;  $p = 0.018$ ) and granularity (SSC;  $p < 0.001$ ) after activation. In contrast to the CG, the correlation between FSC and SSC of platelets in patients was not significant ( $\text{cor.} = 0.55$ ;  $p = 0.15$ ). Patients showed a high, significant relationship between the number and FSC of platelets ( $\text{cor.} = -0.93$ ;  $p < 0.001$ ), as well as an increased density of CD42b ( $p < 0.001$ ) and a decrease in the proportion of procoagulant platelets ( $p = 0.01$ ) after activation. The revealed changes indicate violations of the mechanisms of activation and shape changes of platelets in patients with *ANKRD26*-АТ.

**Key words:** hereditary thrombocytopenia, children, *ANKRD26*, flow cytometry, hemorrhagic syndrome

Polokhov D.M., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2021; 20 (2): 65–73. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-65-73

© 2021 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 22.12.2020

Принята к печати 02.02.2021

### Контактная информация:

Полохов Дмитрий Михайлович, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинического гемостаза ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России  
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1  
E-mail: dmitrii.polokhov@gmail.com

© 2021 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 22.12.2020

Accepted 02.02.2021

### Correspondence:

Dmitry M. Polokhov, pathologist, laboratory of clinical hemostasis, Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation  
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia  
E-mail: dmitrii.polokhov@gmail.com

**Т**ромбоцитопения, связанная с мутациями в гене *ANKRD26*, характеризуется снижением количества тромбоцитов легкой или средней степени, нормальным размером тромбоцитов и предрасположенностью к развитию миелоидного лейкоза на протяжении жизни. Для данного заболевания не характерно наличие сопутствующей синдромальной патологии, у большинства пациентов геморрагические проявления представлены умеренной кровоточивостью или отсутствием таковой. У некоторых пациентов могут наблюдаться сопутствующие эритроцитоз и лейкоцитоз, дисмегакариоцитопоз, повышенный риск возникновения миелоидных злокачественных новообразований [1]. Патогенетический механизм развития тромбоцитопении заключается в нарушении регуляции экспрессии гена *ANKRD26* во время созревания мегакариоцитов: в норме экспрессия данного гена в зрелых мегакариоцитах снижается, однако при наличии мутаций в 5'-нетранслируемой регуляторной области (5'UTR) этого не происходит, что ведет к стойкой активации сигнального пути *TNPO/MPL*, дисмегакариопозу и нарушению образования протромбоцитов [2–4]. Точная распространенность заболевания неизвестна, так как постановка диагноза требует дифференциальной диагностики с другими врожденными тромбоцитопениями и иммунной тромбоцитопенией. Окончательный диагноз может быть поставлен путем секвенирования гена *ANKRD26*, при этом в первую очередь необходимо исследование именно регуляторного региона (5'UTR) [5, 6].

Функциональная активность тромбоцитов у пациентов с *ANKRD26* изучена недостаточно и представлена отдельными наблюдениями серий случаев. Сообщалось о нарушении активации тромбоцитов тромбином [6, 7], ослаблении агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой и адреналином, пограничном снижении количества плотных гранул. У некоторых пациентов наблюдалось уменьшение количества альфа-гранул и увеличение количества вакуолей и канальцевых сетей, снижение поверхностной экспрессии гликопротеина (ГП) Ib [2, 7, 8].

Исследование оптической агрегометрии затруднено для многих пациентов вследствие тромбоцитопении, но в описанных случаях с умеренной тромбоцитопенией не наблюдалось стойкого нарушения реакции тромбоцитов на любую дозу коллагена, аденозиндифосфата или ристоцетина [2]. Ранее нами убедительно продемонстрированы диагностические возможности использования метода проточной цитофлуориметрии с активацией (тест функциональная активность тромбоцитов, ФАТ) для оценки функции тромбоцитов у детей с геморрагическим синдромом [9, 10], в том числе ассоциированным с тромбоцитопенией [9, 11]. В связи с этим целью настоящего исследования являлся поиск возможных

морфофункциональных нарушений тромбоцитов у пациентов с мутациями в гене *ANKRD26*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведено ретроспективное исследование, одобренное независимым этическим комитетом (протокол №8/2016 от 18.10.2016) и утвержденное решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В период с сентября 2017 г. по февраль 2020 г. под наблюдением находились 8 пациентов с тромбоцитопенией, которым на основании молекулярно-генетического обследования был установлен диагноз: тромбоцитопения, связанная с мутацией в гене *ANKRD26*. Проявления геморрагического синдрома были задокументированы в соответствии с требованиями стандартизированной шкалы Pediatric bleeding questionnaire (PBQ) [12]. В качестве контрольной группы (КГ) были использованы образцы крови 26 условно здоровых детей, которые проходили плановое лабораторное обследование в условиях Центра по причинам, не связанным с жалобами на повышенную кровоточивость или другое заболевание крови (обследование в рамках ежегодных диспансеризаций или при необходимости проведения плановых оперативных вмешательств). Письменное информированное согласие было получено от всех официальных представителей пациентов и участников КГ.

### Генетические исследования

Молекулярно-генетическое исследование проводили методом высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS) с помощью таргетной панели «Тромбоцитопении и тромбоцитопатии», включающей 162 гена. Для пробоподготовки ДНК-библиотек использовали методику селективного гибридизационного обогащения с использованием кастомной панели зондов производства Roche (Швейцария) согласно протоколу производителя. Секвенирование проводили на платформе NextSeq Illumina (США) методом парно-концевых прочтений длиной до 120 нуклеотидов. Средняя глубина прочтения в образцах была не менее 100х, покрытие таргетного региона составляло 99% при глубине прочтения не менее 10х. Биоинформатическую обработку осуществляли с применением собственного автоматизированного алгоритма, соответствующего международным стандартам. Для оценки клинической значимости выявленных вариантов использовали следующие базы данных: OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), HGMD (Human Gene Mutation Database), а также соответствующие литературные публикации (PubMed). Клиническую релевантность найденных вариантов определяли с учетом рекомендаций American College of Medical Genetics and Genomics

(ACMG) и российского руководства по интерпретации NGS-данных [13]. Подтверждение генетических вариантов, найденных методом NGS, а также генетическое исследование у сибсов проводили методом прямого секвенирования по Сэнгеру на капиллярном секвенаторе Genetic Analyzer 3500XL (Applied Biosystems).

### Функциональная активность тромбоцитов: проточная цитометрия

В цитометрическом исследовании [14] мы проанализировали маркерный состав тромбоцитов в состоянии покоя и после активации смесью TRAP-6 (аналог тромбина, агонист рецептора PAR-1) и CRP (аналог коллагена, агонист ГП VI). Исследование проводили, как описано ранее [9, 11, 15]. Оценивалась морфология тромбоцитов по FSC (размер) и SSC (гранулярность). Изучались следующие рецепторы мембраны тромбоцитов: CD42b (субъединица Ib) рецепторного комплекса ГП Ib-V-XI к фактору Виллебранда, тромбину и связывания с лейкоцитами [16]; CD61 (субъединица IIIa) рецепторного комплекса ГП IIb-IIIa к фибриногену в низкоаффинном состоянии [17]; связывание PAC-1 (выявление ГП IIb-IIIa в высокоаффинном состоянии, способного связывать фибриноген и вызывать агрегацию) [17]; CD62p (P-селектин) как маркер дегрануляции альфа-гранул и молекула межклеточного взаимодействия с лейкоцитами и эндотелиоцитами [18]; объем и высвобождение плотных гранул оценивались по флуоресценции загруженного мепакрина [18]; фосфатидилсерин как маркер количества прокоагулянтных тромбоцитов, модулирующих генерацию тромбина [19].

### Анализ крови

Анализ периферической крови выполнялся на гематологическом анализаторе Sysmex XS-1000i

(Sysmex Corporation, Япония). Для оценки результатов использовались референсные диапазоны, являющиеся общепринятыми эталонными диапазонами, взятыми из многих источников, с учетом возраста и пола согласно Pediatric Self-Assessment Program от American college of clinical pharmacy (ACCP).

### Статистический анализ

Анализ статистических различий проводился с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни с уровнем значимости  $p < 0,05$ . Для корреляционного анализа был рассчитан коэффициент корреляции Пирсона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Общая характеристика пациентов

Обследованы 4 мальчика и 4 девочки. Медиана возраста обращения составила 6 (1,5–15) лет. Количество тромбоцитов варьировало от 29 до 172 тыс/мкл, медиана 60 тыс/мкл. Релевантную пациентам КГ составили 11 мальчиков и 15 девочек (соотношение 1:1,4). Медиана возраста составила 7 (2–15) лет. Количество тромбоцитов варьировало от 160 до 429 тыс/мкл, медиана 265 тыс/мкл.

У пациентов количество лейкоцитов варьировало от 4,09 до 11,69 тыс/мкл, медиана 9,37 тыс/мкл; эритроцитов – от 4,59 до 5,28 млн/мкл, медиана 5,14 млн/мкл; уровень гемоглобина – от 12,1 до 14,7 г/дл, медиана 13,05 г/дл (таблица).

### Оценка кровоточивости

Пациенты имели тяжесть геморрагического синдрома от 0 до 5 баллов, медиана 3,5 балла по RBQ. Кровоточивость проявлялась в различных комбинациях экхимозов и петехиальной сыпи, носовых

Таблица  
Характеристики пациентов с мутацией ANKRD26

Table  
Characteristics of patients with ANKRD26 mutation

№	Пол Sex	Возраст, годы Age, years	5'UTR ANKRD26	Тромбоциты, тыс/мкл PLT, thousand/ μL	PI RI	Лейкоциты, тыс/мкл WBC, thousand/μL	PI RI	Эритроциты, млн/мкл RBC, mln/μL	PI RI	Гемоглобин, г/дл HGB, g/dL	PI RI	PBQ, баллы PBQ, scores
1	Мужской Male	1,5	c.-119C>A	64	150– 450	7,4	6–17	5,22	3,7–5,3	13,6	10,5– 14	2
2	Женский Female	3,5	c.-128G>T	172		11,69		5,11		13,3		1
3	Мужской Male	4	c.-118C>A	66		9,83		4,97		12,1		4
4	Женский Female	5	c.-128G>A	84		4,09		5,28		12,5		0
5	Женский Female	7	c.-118C>A	47		8,91		5,21		14,7		5
6	Мужской Male	8	c.-126T>C	56		10,35		4,59		12,2		3
7	Женский Female	13,5	c.-134G>A	29	4–13,5	6,4	4–13,5	5,17	4,1–5,1	14,3	12– 15	4
8	Мужской Male	15	c.-126T>C	33		10,78		5,02		12,8		5

Примечание. PI – референсные интервалы.  
Note. RI – reference intervals.

кровотечений (в том числе обильных, требующих госпитализации), меноррагий, кровотечений после удаления зубов (таблица).

### Генетические исследования

Было выявлено 6 патогенных регуляторных мутаций в гене *ANKRD26* (NM\_014915.3) в гетерозиготном состоянии (таблица). Пациенты 3 и 5, 6 и 8 являются сибсами и поэтому имеют идентичные мутации.

### Проточная цитометрия

Анализ морфологических характеристик тромбоцитов по параметрам светорассеяния FSC и SSC выявил ряд достоверных отличий группы пациентов от КГ.

Если в состоянии покоя FSC и SSC тромбоцитов достоверно не различались между КГ и пациентами ( $p = 0,15$  и  $p = 0,28$  соответственно) (рисунок 1А, В), то после активации FSC и SSC были достоверно выше в группе пациентов ( $p = 0,018$  и  $p < 0,001$  соответственно) (рисунок 1Б, Г).

Интегральная оценка морфологических изменений тромбоцитов в ответ на активацию косвенно оценивалась как отношение FSC в покое/после активации и SSC в покое/после активации, оба индекса были достоверно снижены у пациентов ( $p = 0,002$  и  $p = 0,007$  соответственно) (рисунок 1Д, Е). Полученные результаты указывают на возможные нарушения механизмов активации, изменения формы и SSC тромбоцитов [20].

Изучение корреляционной связи Пирсона между FSC и SSC в покое показало высокую и достоверную корреляцию в КГ (корреляция 0,87;  $p < 0,001$ ) и заметную, но недостоверную корреляцию в группе пациентов (корреляция 0,55;  $p = 0,15$ ) (рисунок 2А). Аналогичной была корреляция после активации FSC и SSC в КГ (корреляция 0,9;  $p < 0,001$ ) и в группе пациентов (корреляция 0,55;  $p = 0,16$ ) (рисунок 2Б). Полученные результаты указывают на нарушения SSC тромбоцитов пациентов при сохранности их FSC.

Изучение корреляционных связей между количеством и морфологией тромбоцитов показало отсутствие корреляций между количеством и FSC тромбоцитов в КГ в покое (корреляция  $-0,13$ ;  $p = 0,54$ ) и после активации (корреляция  $-0,1$ ;  $p = 0,62$ ) (рисунок 3А, Б); отсутствие корреляций между количеством и SSC тромбоцитов в КГ в покое (корреляция  $-0,008$ ;  $p = 0,97$ ) и после активации (корреляция  $-0,008$ ;  $p = 0,97$ ) (рисунок 3В, Г). В группе пациентов корреляция была весьма высокой между количеством и FSC тромбоцитов в покое (корреляция  $-0,93$ ;  $p < 0,001$ ), после активации корреляция была заметной, но не достоверной (корреляция  $-0,69$ ;  $p = 0,06$ ) (рисунок 3А, Б); корреляция между SSC и количеством тромбоцитов в группе пациентов

была заметной, но не достоверной в покое (корреляция  $-0,57$ ;  $p = 0,14$ ) и после активации (корреляция  $-0,69$ ;  $p = 0,06$ ) (рисунок 3В, Г). Наблюдаемая зависимость ранее описывалась у пациентов с микроциркуляторным геморрагическим синдромом [10].

Плотность CD42b в состоянии покоя достоверно не различалась между КГ и группой пациентов ( $p = 0,87$ ; рисунок 4А), но после активации она была достоверно выше в группе пациентов ( $p < 0,001$ ; рисунок 4Б). Наблюдаемые различия могут указывать на нарушение механизма отщепления (растворения) CD42b с поверхности мембраны тромбоцитов у пациентов.

Количество фосфатидилсерин-положительных (прокоагулянтных) тромбоцитов в состоянии покоя достоверно не различалось между КГ и группой пациентов ( $p = 0,82$ ; рисунок 4В), но после активации оно было достоверно ниже в группе пациентов ( $p = 0,01$ ; рисунок 4Г). Наблюдаемые различия могут указывать на ослабление механизма активации тромбоцитов у пациентов.

Различия между КГ и пациентами в покое и после активации были недостоверны при определении рецепторов CD61, связывания PAC1, CD62p, флуоресценции мепакрина плотных гранул тромбоцитов ( $p > 0,05$ , данные не показаны).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основная цель данной работы заключалась в выявлении возможных морфологических, фенотипических и функциональных нарушений тромбоцитов у пациентов детского возраста с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией.

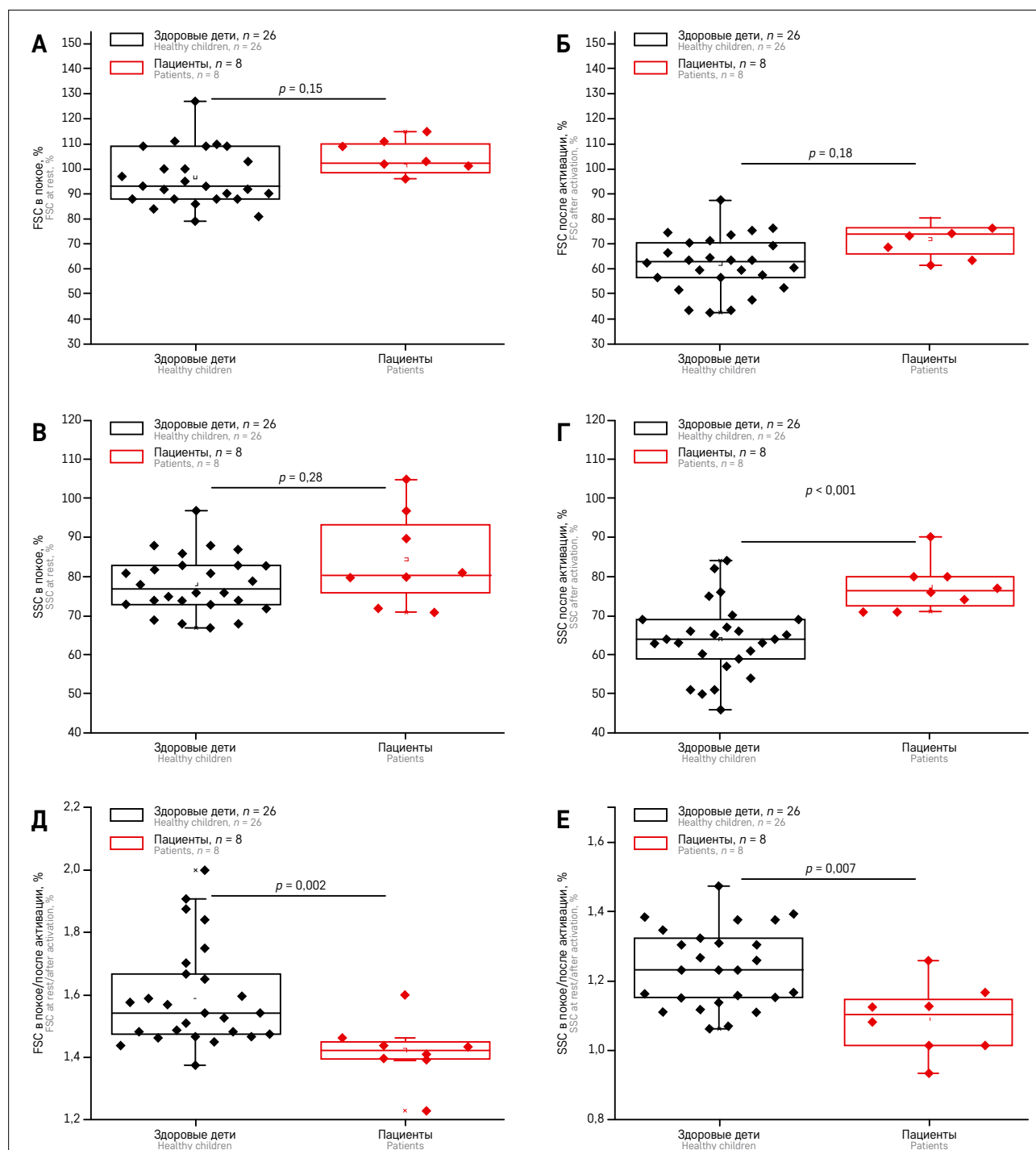
В ходе проведенного анализа нами были обнаружены специфические признаки нарушения активации тромбоцитов, а именно тромбоциты пациентов не показали уменьшения FSC и SSC, характерного для КГ, в сочетании с ослаблением отщепления CD42b и со снижением доли прокоагулянтных тромбоцитов. Похожие нарушения были описаны у пациентов с геморрагическими проявлениями эссенциальной тромбоцитемии (с сопутствующим приобретенным синдромом Виллебранда), предположительно вызванные внутрисосудистой преактивацией и частичной десенсилизацией тромбоцитов [21]. Ранее у пациентов с мутацией *ANKRD26* с.-116C>T J. P. Botero и соавт. описывали пограничное снижение количества плотных гранул, нормальное или сниженное количество альфа-гранул, увеличение количества вакуолей и канальцевых сетей по данным трансмиссионной электронной микроскопии тромбоцитов [8]. У обследованных нами пациентов методом проточной цитометрии мы не выявили достоверных данных за дефицит плотных и альфа-гранул, но пред-

Рисунок 1

Интегральная оценка морфологических характеристик FSC и SSC тромбоцитов в покое и после активации. Панели А и В показывают отсутствие достоверных различий FSC и SSC между КГ и пациентами в покое. Панели Б и Г демонстрируют повышенные значения FSC и SSC в группе пациентов после активации. Панели Д и Е отражают «суммарные» нарушения изменения морфологии тромбоцитов пациентов при реализации активационных процессов перестройки цитоскелета и изменения SSC

Figure 1

Integral assessment of morphological characteristics of platelet size (FSC) and granularity (SSC) at rest and after activation. Panels A and B show no significant differences in FSC and SSC between the CG and patients at rest. Panels Б and Г show increased FSC and SSC values in the patient group after activation. Panels Д and Е reflect the "total" disorders in platelets morphology changes in patients during the implementation of activation processes of the cytoskeleton rearrangement and granularity



полагаем, что наблюдаемое нами повышение SSC может быть обусловлено увеличением количества вакуолей и канальцев, что требует подтверждения методом трансмиссионной электронной микроскопии тромбоцитов.

В литературе описано более 20 мутаций в гене *ANKRD26*, приводящих к тромбоцитопении и 1 функциональный полиморфизм, ассоциированный с усилением агрегационного ответа тромбоцитов на аденозиндифосфат, но молекулярные механизмы и

Рисунок 2

Корреляционные связи между FSC и SSC тромбоцитов в покое и после активации

Панели А и Б демонстрируют высокую и достоверную корреляцию между FSC и SSC у здоровых детей и отсутствие достоверной корреляции у пациентов

Figure 2

Correlation links between FSC and SSC platelets at rest and after activation

Panels A and B show a high and significant correlation between FSC and SSC in healthy children and no significant correlation in patients

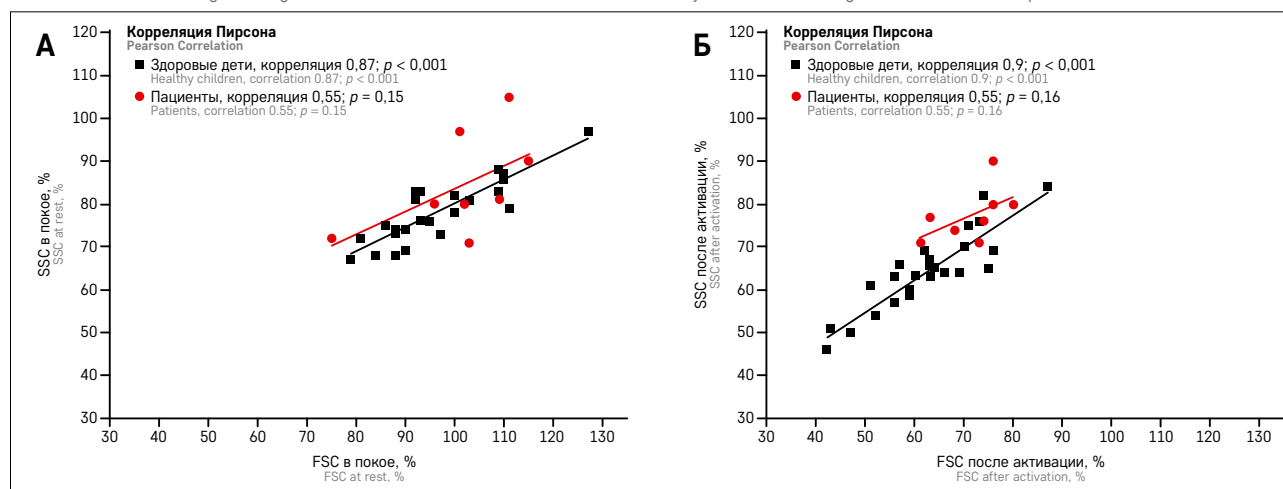


Рисунок 3

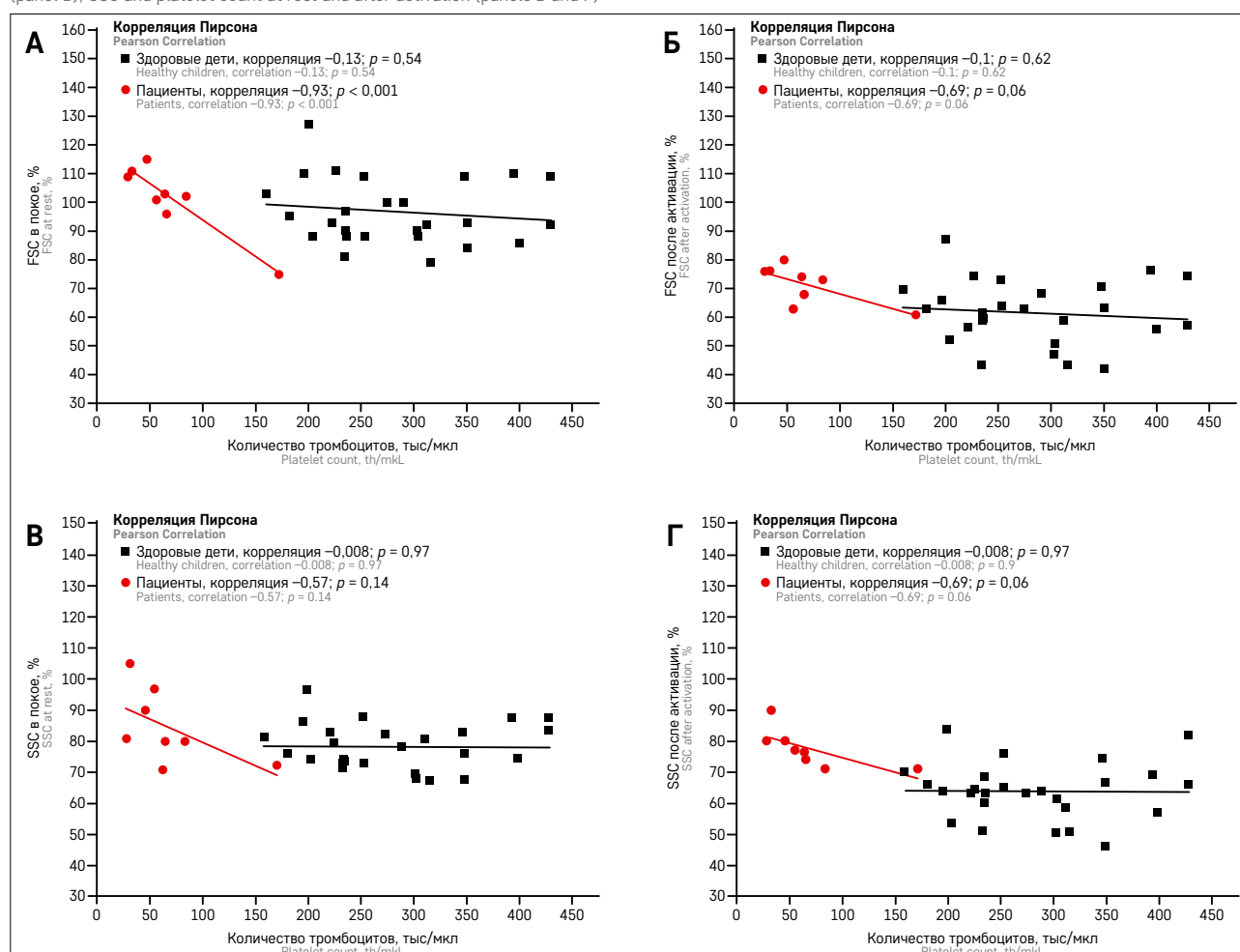
Корреляционные связи между FSC, SSC и количеством тромбоцитов в покое и после активации

Панели А и Б, В и Г демонстрируют отсутствие корреляции между FSC, SSC и количеством тромбоцитов у здоровых детей. В группе пациентов наблюдалась высокая и достоверная корреляция между FSC и количеством тромбоцитов в покое (панель А) и заметная, но не достоверная корреляция между FSC и количеством тромбоцитов после активации (панель Б); SSC и количеством тромбоцитов в покое и после активации (панели В и Г)

Figure 3

Correlation between FSC, SSC and platelet count at rest and after activation

Panels A and B, B and Г show no correlation between FSC, SSC and platelet count in healthy children. In the patient group, there was a high and significant correlation between FSC and platelet count at rest (panel A), and a noticeable, but not significant correlation between: FSC and platelet count after activation (panel B); SSC and platelet count at rest and after activation (panels B and Г)





## Рисунок 4

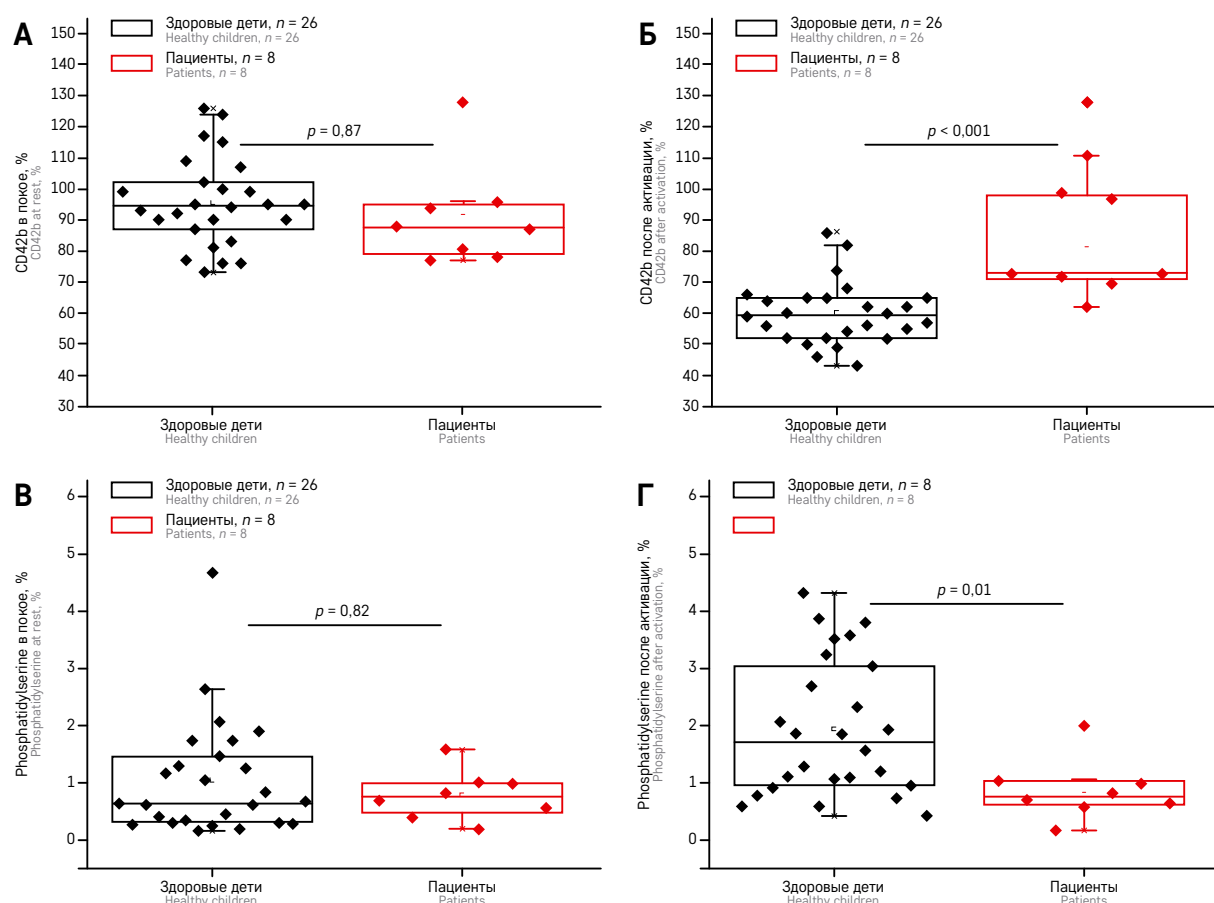
## Различия в плотности рецептора CD42b и доли фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов

В состоянии покоя нет достоверных различий по CD42b и фосфатидилсерин-положительным тромбоцитам между КГ и пациентами (панели А и В). После активации CD42b был повышен, а доля фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов снижена в группе пациентов (панели Б и Г)

Figure 4

## Differences in CD42b receptor density and proportion of phosphatidylserine-positive platelets

At rest, there was no significant difference in CD42b and phosphatidylserine-positive platelets between CG and patients (panels A and B). Upon activation, CD42b was increased and the proportion of phosphatidylserine-positive platelets decreased in the patient group (panels Б and Г)



клинические последствия этих результатов требуют дальнейшего изучения [22] и указывают на вероятную ассоциацию между нарушением продукции, структуры и функции тромбоцитов у некоторых пациентов, наблюдавшихся в тестах агрегометрии и проточной цитометрии [2, 6–8].

Известно, что FSC тромбоцитов может увеличиваться с тяжестью тромбоцитопении [9, 10], в том числе вследствие изменений характера тромбоцитопоза [3]. Среди наблюдавшихся пациентов FSC тромбоцитов увеличивался не выражено, но достоверно по мере уменьшения их количества и эти наблюдения требуют дополнительного изучения на больших когортах пациентов с мутацией *ANKRD26*.

Цитоплазматический участок CD42b связан с белком цитоскелета филамином, а через него с актиновыми волокнами цитоскелета и мембранным цитоскелетом. В норме при активации тромбоцитов происходит деполимеризация волокон цитоскелета, а под действием внутриклеточных протеаз – отще-

пление растворимой внеклеточной части CD42b (гликокаликсина) [16]. Мы предполагаем, что одной из возможных причин повышенного уровня CD42b у пациентов после активации может быть нарушение реорганизации цитоскелета тромбоцитов [20], также проявляющееся в нарушении изменения FSC и SSC.

Способность прокоагулянтных тромбоцитов регулировать образование тромбина привлекает все больше внимания исследователей из разных областей медицины [23]. Ранее M. Daskalakis и соавт. сообщали, что среди 67 пациентов с тяжелым геморрагическим синдромом в 24% случаев наблюдалось снижение образования прокоагулянтных тромбоцитов < 20% по сравнению с КГ [24]. C.I. Prodan и соавт. сообщили о потенциальном клиническом значении снижения доли COAT-тромбоцитов (подгруппа прокоагулянтных тромбоцитов) в развитии спонтанных внутримозговых кровоизлияний у взрослых пациентов [25, 26]. И напротив, повышение количества COAT-тромбоцитов коррелировало с преходящей

ишемической атакой и ишемическими инсультами [27–29]. Таким образом, не исключен возможный вклад низкого количества прокоагулянтных тромбоцитов в развитие геморрагических проявлений у обследованных пациентов с мутацией *ANKRD26*.

Мы склонны считать, что тяжесть геморрагических проявлений у наблюдавшихся нами пациентов не соответствует выраженности тромбоцитопении и выявленные отклонения могут вносить вклад в развитие геморрагических симптомов. У половины наблюдавшихся пациентов тяжесть геморрагического синдрома оценена в 4–5 баллов по PBQ, но нам не удалось выявить ярких отличий фенотипа тромбоцитов от пациентов с минимальными проявлениями в 0–3 балла. Однако пациенты 2 и 4 (таблица) с мутациями с.-128G>T и с.-128G>A соответственно имели наибольшее количество тромбоцитов и не имели жалоб на геморрагические проявления, что может указывать на неоднозначность влияния мутаций в гене *ANKRD26* на клинический фенотип, и это должно быть принято во внимание лечащими врачами, в том числе и при решении вопроса о заместительной терапии.

Литературные данные о количестве лейкоцитов, эритроцитов и уровне гемоглобина противоречивы. Сообщалось, что у большинства пациентов они оставались в пределах нормы, но у части больных отмечалось независимое повышение или снижение данных показателей относительно референсного диапазона. Лейкоцитоз объяснялся воспалительными процес-

сами, снижение гемоглобина и эритроцитоз – геморрагическими проявлениями. Повышение гемоглобина у некоторых пациентов осталось не объясненным [2]. В гемограмме наших пациентов невыраженное повышение количества эритроцитов и гемоглобина наблюдались независимо лишь у 2 пациентов, а все остальные показатели оставались в пределах возрастных норм (таблица).

Выявленные нами паттерны функциональных нарушений заслуживают дальнейшего изучения их молекулярных механизмов для выработки подхода к прогнозированию геморрагических рисков путем выявления клиничко-лабораторных корреляций.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ORCID

**Polokhov D.M.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6905-2878>  
**Fedorova D.V.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4567-1871>  
**Pshonkin A.V.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2057-2036>  
**Ignatova A.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5217-3937>  
**Ponomarenko E.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8697-7570>  
**Aleksenko M.Yu.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2521-5353>  
**Mersiyanova I.V.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0471-2956>  
**Seregina E.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7534-3863>  
**Poletaev A.V.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5209-2099>  
**Raykina E.V.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7634-2053>  
**Panteleev M.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>  
**Zharkov P.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4384-6754>

## Литература

1. Botero J.P., Stefanie N.D., Matthew W.A. *ANKRD26*-Related Thrombocytopenia 2018 Jun 21. GeneReviews 2019; 1–11.
2. 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 (24): 6673–80.
3. Balduini C.L., Melazzini F., Pecci A. Inherited thrombocytopenias – recent advances in clinical and molecular aspects. *Platelets* 2017; 28: 3–13.
4. 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.
5. Balduini C., Pecci A., Noris P. Diagnosis and management of inherited thrombocytopenias. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39: 161–71.
6. Boutroux H., Petit A., Auvrignon A., Lapillonne H., Ballerini P., Favier R., Leverger G. Childhood diagnosis of genetic thrombocytopenia with mutation in the ankyrin repeat domain 26 gene. *Eur J Pediatr* 2015; 174: 1399–403.
7. Rabbolini D., Connor D., Morel-Kopp M.C., Donikian D., Kondo M., Chen W., et al. An integrated approach to inherited platelet disorders: results from a research collaborative, the Sydney Platelet Group. *Pathology* 2020; 52: 243–55.
8. Botero J.P., Chen D., He R., Viswanatha D.S., Majerus J.A., Coon L.M., et al. Clinical and laboratory characteristics in congenital *ANKRD26* mutation-associated thrombocytopenia: A detailed phenotypic study of a family. *Platelets* 2016; 27: 712–5.
9. 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.
10. Полохов Д.М., Пшонкин А.В., Игнатова А.А., Пономаренко Е.А., Федорова Д.В., Алексенко М.Ю. и др. Особенности пула хранения и морфологии тромбоцитов у детей с неуточненным геморрагическим синдромом. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2021; 20 (1): 58–67.
11. Suntsova E.V., Demina I.M., Ignatova A.A., Ershov N.M., Trubina N.M., Dobrynina J., et al. Bleeding tendency and platelet function during treatment with romiplostim in children with severe immune



- thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2017; 105: 841–8.
12. Mittal N., Naridze R., James P., Shott S., Valentino L.A. Utility of a Paediatric Bleeding Questionnaire as a screening tool for von Willebrand disease in apparently healthy children. *Haemophilia* 2015; 21: 806–11.
  13. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика* 2019; 8: 3–23.
  14. Carubbi C., Masselli E., Vitale M. Flow Cytometry. In: Gresele P., Kleiman N.S., Lopez J.A., Page C.P. (eds.). *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders. Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Springer International Publishing, Cham; 2017. Pp. 589–617.
  15. Ignatova A.A., Karpova O.V., Trakhtman P.E., Rumiantsev S.A., Panteleev M.A. Functional characteristics and clinical effectiveness of platelet concentrates treated with riboflavin and ultraviolet light in plasma and in platelet additive solution. *Vox Sang* 2016; 110: 244–52.
  16. López J.A. The Platelet Glycoprotein Ib-IX-V Complex. In: Gresele P., Kleiman N.S., Lopez J.A., Page C.P. (eds.). *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders. Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Springer International Publishing, Cham; 2017. Pp. 85–97.
  17. Bennett J.S. GPIIb/IIIa Structure and Function. In: Gresele P., Kleiman N.S., Lopez J.A., Page C.P. (eds.). *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders. Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Springer International Publishing, Cham; 2017. Pp. 99–112.
  18. Flaumenhaft R. Platelet Secretion. In: Gresele P., Kleiman N.S., Lopez J.A., Page C.P. (eds.). *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders. Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Springer International Publishing, Cham; 2017. Pp. 353–366.
  19. Heemskerk J.W.M., Cosemans J.M.E.M., van der Meijden P.E.J. Platelets and Coagulation. In: Gresele P., Kleiman N.S., Lopez J.A., Page C.P. (eds.). *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders. Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Springer International Publishing, Cham; 2017. Pp. 447–462.
  20. Aslan J.E. Platelet Shape Change. In: Gresele P., Kleiman N.S., Lopez J.A., Page C.P. (eds.). *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders. Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Springer International Publishing, Cham; 2017. Pp. 321–336.
  21. Polokhov D.M., Ershov N.M., Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Gaskova M.A., Zharkov P.A., et al. Platelet function and blood coagulation system status in childhood essential thrombocythemia. *Platelets* 2019; 31 (8): 1001–11.
  22. Chen M.H., Yanek L.R., Backman J.D., Eicher J.D., Huffman J.E., Ben-Shlomo Y., et al. Exome-chip meta-analysis identifies association between variation in *ANKRD26* and platelet aggregation. *Platelets* 2019; 30: 164–73.
  23. Mazepa M., Hoffman M., Monroe D. Superactivated platelets: Thrombus regulators, thrombin generators, and potential clinical targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 1747–52.
  24. Daskalakis M., Colucci G., Keller P., Rochat S., Silzle T., Biasiutti F.D., et al. Decreased generation of procoagulant platelets detected by flow cytometric analysis in patients with bleeding diathesis. *Cytom Part B Clin Cytom* 2014; 86: 397–409.
  25. Prodan C.I., Vincent A.S., Padmanabhan R., Dale G.L. Coated-platelet levels are low in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2009; 40: 2578–80.
  26. Prodan C.I., Vincent A.S., Dale G.L. Coated platelet levels correlate with bleed volume in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2010; 41: 1301–3.
  27. Prodan C.I., Vincent A.S., Dale G.L. Coated-platelet levels are elevated in patients with transient ischemic attack. *Transl Res* 2011; 158: 71–5.
  28. Prodan C.I., Joseph P.M., Vincent A.S., Dale G.L. Coated-platelets in ischemic stroke: Differences between lacunar and cortical stroke. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 609–14.
  29. Prodan C.I., Stoner J.A., Cowan L.D., Dale G.L. Lower coated-platelet levels are associated with early hemorrhagic transformation in patients with non-lacunar brain infarction. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1185–90.