

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-156-165

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 15.05.2023
Принята к печати 26.06.2023

Возрастные изменения характера нарушений функции тромбоцитов у пациентки с *SLFN14*-связанной макротромбоцитопенией

Е.Ю. Рашевская¹, Д.М. Полохов², Д.В. Федорова², А.А. Игнатова², Е.А. Пономаренко²,
Е.В. Райкина², И.В. Мерсиянова², А.В. Полетаев², Е.В. Трухина², С.А. Плясунова²,
П.А. Жарков², М.А. Пантелеев²⁻⁴

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

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

³ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Контактная информация:

Рашевская Елена Юрьевна,
врач-ординатор по специальности
«гематология» ФГАОУ ВО РНИМУ
им. Н.И. Пирогова Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Островитянова, 1
E-mail: elena.rashevskaya98@mail.ru

Нарушение свертываемости крови тромбоцитарного типа-20 является редкой наследственной тромбоцитопенией, вызываемой мутациями в гене *SLFN14*. Нами наблюдалась пациентка в возрасте с 17 до 19 лет с мутацией *SLFN14*, макротромбоцитопенией, тяжелым геморрагическим синдромом и отягощенным семейным анамнезом. В ходе 3-летнего обследования наблюдалась тенденция к частичной нормализации количества (с 47 до 82 × 10⁹/л) и морфологии тромбоцитов. Уменьшались размер, гранулярность, плотность рецепторов гликопротеина (ГП) Ib/V/IX и ГП IIb/IIIa мембраны тромбоцитов. Активация ГП IIb/IIIa была нарушена и положительной динамики не имела. Показатели плотных гранул были стабильно повышены. Показатели α-гранул (по Р-селектину) не отличались от значений контрольной группы. Доля прокоагулянтных фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов была повышена в покое, способность образовывать прокоагулянтные тромбоциты при активации была ослаблена. У пациентки по мере взросления наблюдалось облегчение проявлений геморрагического синдрома в сочетании с тенденцией к нормализации лабораторных показателей тромбоцитов. Все исследования проводились после получения письменного информированного согласия пациентки и ее родителей в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Ключевые слова: BDPLT-20, *SLFN14*, наследственная макротромбоцитопения, геморрагический синдром, проточная цитометрия

Рашевская Е.Ю. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 156–65. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-156-165

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 15.05.2023

Accepted 26.06.2023

Age-dependent changes in platelet function of a patient with *SLFN14*-related macrothrombocytopenia

E.Yu. Rashevskaya¹, D.M. Polokhov², D.V. Fyodorova², A.A. Ignatova², E.A. Ponomarenko², E.V. Raykina²,
I.V. Mersyanova², A.V. Poletayev², E.V. Trukhina², S.A. Plyasunova², P.A. Zharkov², M.A. Panteleev²⁻⁴

¹The N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

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

³Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

⁴The M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Correspondence:

Elena Yu. Rashevskaya,
a resident in hematology at the N.I. Pirogov
Russian National Research Medical University,
Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Ostrovityanova St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: elena.rashevskaya98@mail.ru

Platelet-type bleeding disorder-20 is a rare inherited thrombocytopenia caused by mutations in the *SLFN14* gene. We report a case of a female patient with *SLFN14* mutation, macrothrombocytopenia, severe hemorrhagic syndrome and a positive family history who was followed up from the age of 17 to 19. The 3-year follow-up showed a tendency towards partial normalization of platelet counts (from 47 to 82 × 10⁹/L) and morphology. Platelet size and granularity as well as the density of glycoprotein (GP) membrane receptors such as GP Ib/V/IX and GP IIb/IIIa decreased. GP IIb/IIIa activation was impaired and there were no positive changes over time. The dense granules indicators were stably elevated. The parameters of α-granules (assessed by P-selectin expression) did not differ from the control group. The proportion of procoagulant phosphatidylserine-positive platelets at rest was increased and the potential to form procoagulant platelets upon activation was reduced. As the patient grew older, her bleeding disorder symptoms abated and she showed a tendency towards normalization of platelet laboratory parameters. All investigations were performed after obtaining informed consent from the patient and her parents in accordance with the Declaration of Helsinki.

Key words: BDPLT-20, *SLFN14*, inherited thrombocytopenia, hemorrhagic syndrome, flow cytometry

Rashevskaya E.Yu., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 156–65.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-156-165

Нарушение свертываемости крови тромбоцитарного типа-20 (platelet-type bleeding disorder-20, BDPLT-20) вызывается гетерозиготной мутацией в гене *SLFN14* на хромосоме 17q12

(OMIM #616913) и относится к наследственным тромбоцитопениям (НТ). НТ характеризуются высокой вариабельностью тромбоцитопении и склонностью к кровотечениям, выявляемой с рождения. НТ – это

редкие заболевания, распространенность которых оценивается в 2,7 на 100 000. Однако эта цифра является ориентировочной, потому что НТ часто ошибочно диагностируются как иммунная тромбоцитопения [1]. По данным недавнего исследования по оценке частоты встречающихся мутаций в генах, связанных с нарушениями тромбоцитов (52% из которых были связаны с НТ), было установлено, что в общей популяции 0,329% обследованных имели клинически значимую мутацию [2]. Распространенность мутации *SLFN14* не определена.

Ранее были описаны 13 пациентов из 5 семей с мутациями *SLFN14* и проявлениями кровоточивости различной степени выраженности [3–6]. S.J. Fletcher и соавт. сообщили о 9 пациентах из 3 неродственных семей, у которых тесты агрегометрии тромбоцитов показали снижение агрегации в ответ на аденозиндифосфат (АДФ), коллаген, но давали нормальную реакцию на арахидоновую кислоту. Электронная микроскопия тромбоцитов показала нормальные α -гранулы, но значительное уменьшение количества плотных гранул по сравнению с контролем, что сопровождалось снижением секреции аденозинтрифосфата по данным люмиагрегометрии. У многих пациентов наблюдалось увеличение размера тромбоцитов [3].

C. Marconi и соавт. сообщили о 3 членах итальянской семьи с макротромбоцитопенией и умеренным геморрагическим синдромом [4]. Известно, что белок *SLFN14* является эндорибонуклеазой, регулирующей синтез белков, ответственных за расщепление РНК, а также регулятором тромбоцитопоза [7]. Исследование предшественников мегакариоцитов у пациентов показало нарушение созревания протромбоцитов [4].

Нами наблюдалась пациентка в возрасте с 17 до 19 лет с мутацией *SLFN14*, макротромбоцитопенией, тяжелым геморрагическим синдромом и отягощенным семейным анамнезом. Ранее мы подробно описывали результаты первичного обследования данной пациентки. Тромбоциты были гетерогенны по размеру, с преобладанием крупных вакуолизированных форм, с нарушением способности к адгезии и агрегации, активации гликопротеина (ГП) IIb/IIIa, диффузным распределением β_1 -тубулина цитоскелета и рецептора CD63, ослаблением внутриклеточной мобилизации кальция при стимуляции TRAP и CRP [8]. Остается не изученным вопрос о возможных возраст-зависимых особенностях течения заболевания. Считается, что интенсивность кровоизлияний при первичных нарушениях гемостаза, в том числе спонтанных носовых кровотечениях, может уменьшаться или даже исчезать после полового созревания [9].

Цель данной работы заключалась в выявлении возможных связей между уменьшением тяжести

кровоточивости и характеристиками тромбоцитов при взрослении пациентки с *SLFN14*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все исследования проводились после получения письменного информированного согласия пациентки и ее родителей в соответствии с Хельсинкской декларацией.

В НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в период с 2016 по 2019 г. наблюдалась пациентка с макротромбоцитопенией, гетерозиготной мутацией *SLFN14* с.655A> G, геморрагическим синдромом и отягощенным семейным анамнезом по отцовской линии. В течение 3 лет проводились ежегодные обследования, включающие оценку морфологии тромбоцитов методом оптической микроскопии и исследование функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии (ПЦ). Результаты углубленного изучения системы гемостаза при первом обращении в возрасте 17 лет были опубликованы ранее [8].

Оптическая микроскопия

Для приготовления мазка крови использовали ЭДТА-антикоагулированную кровь. Мазок крови окрашивался с использованием общепринятой методики по Романовскому–Гимзе.

Проточная цитометрия

ПЦ выполнялась по описанной ранее методике [10–12]. Изучался маркерный состав тромбоцитов в состоянии покоя и после активации смесью TRAP-6 (агонист рецептора PAR-1) и CRP (агонист ГП VI). Оценивались количество тромбоцитов, их морфология по FSC (размер) и SSC (гранулярность). Изучались рецепторы мембраны тромбоцитов: CD42b (субъединица Ib) рецепторного комплекса ГП Ib/V/XI; CD61 (субъединица IIIa) рецепторного комплекса ГП IIb/IIIa; связывание PAC-1 (выявление активированной формы ГП IIb/IIIa); CD62p (P-селектин) как маркер дегрануляции α -гранул. Объем и высвобождение плотных гранул оценивались по флуоресценции загруженного мепакрина. Фосфатидилсерин-положительные (ФС⁺) прокоагулянтные тромбоциты определялись по аннексину V.

Для оценки активационных изменений морфологических характеристик тромбоцитов были использованы расчетные индексы FSC и SSC в покое/после активации, описывающие уменьшение размера и гранулярности тромбоцитов [10–12]. Использование отношения в покое/после активации для рецепторов, гранул и ФС позволило интегрально и персонализировано оценить эффективность работы механизмов изменения фенотипа тромбоцитов независимо от

размера клеток. Относительные значения индексов позволили исключить ложную интерпретацию абсолютных значений в тех случаях, когда при активации абсолютные значения формально находились в пределах диапазона контрольной группы (КГ), но в действительности у пациента должных изменений фенотипа тромбоцитов не происходило.

Для оценки возраст-зависимых изменений использовались значения КГ из 6 здоровых подростков с медианой возраста 17 лет, описанные ранее [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациентку с рождения беспокоили проявления геморрагического синдрома: длительные кровотечения из мест инъекции, при прорезывании зубов, носовые кровотечения, требующие терапии. В 10 лет диагностированы гемартрозы коленных суставов, с 12 лет – полименорея. Неоднократно возникали длительные анемизирующие кровотечения, требующие госпитализации в реанимационное отделение. Проводились заместительные трансфузии компонентами крови и терапия препаратами факторов свертывания. Таким образом, к 17 годам тяжесть геморрагического синдрома пациентки анамнестически была оценена в 20 баллов по шкале Pediatric bleeding questionnaire (PBQ) (таблица 1). В возрасте 18 лет произошел гемартроз плечевого сустава, спровоцированный физической нагрузкой. В связи с достижением совершеннолетия тяжесть геморрагического синдрома у пациентки повторно оценивалась с использованием шкалы ISTH-SSC Bleeding Assessment Tool (BAT) [13] и составила также 20 баллов. Однако с возрастом было отмечено ослабление геморрагического синдрома: в 19 лет пациентка не предъявляла жалобы на тяжелые проявления геморрагического синдрома, приводящие к социальной дезадаптации. Ранее S.J. Fletcher и соавт. сообщили о кровотечениях от легкой до тяжелой степени тяжести (5–22 балла по BAT) у пациентов с *SLFN14* [3]. В работе C. Marconi и соавт. описывались пациенты с менее выраженным геморрагическим синдромом (2–9 баллов по шкале BAT) [4].

По данным семейного анамнеза у матери пациентки проявлений геморрагического синдрома не было, отец страдал от тяжелых эпизодов носового кровотечения, которые требовали госпитализации в детском и подростковом возрасте. Также сообщалось о гемартрозе коленного сустава и тромбоцитопении легкой степени тяжести ($100\text{--}130 \times 10^9/\text{л}$). Однако проявления геморрагического синдрома ослабли к 20–25 годам. Матери пациентки было проведено молекулярно-генетическое исследование, однако мутация в гене *SLFN14* не была выявлена. Отец пациентки отказался от генетического тестирования.

Таблица 1
Оценка тяжести кровотечения по шкалам PBQ и BAT ITSH

Table 1
Assessment of the severity of bleeding using the PBQ scale and the ITSH BAT

Симптомы Symptoms	Шкала, баллы Score	
	PBQ	BAT
Носовые кровотечения Epistaxis	3	3
Кожный геморрагический синдром Cutaneous bruising	2	2
Кровотечения из незначительных ран Bleeding from minor wounds	4	4
Кровотечения из слизистой ротовой полости Oral cavity bleeding	4	4
Кровотечения из желудочно-кишечного тракта Gastrointestinal bleeding	–	–
Гематурия Haematuria	Не оценивается Not subject to evaluation	–
Кровотечения при удалении зубов Dental extractions	–	–
Кровотечения при хирургических операциях Surgery	4	4
Меноррагии Menorrhagia	1	1
Послеродовые кровотечения Post-partum haemorrhage	Не оценивается Not subject to evaluation	–
Межмышечные гематомы Muscle haematomas	–	–
Гемартрозы Haemarthrosis	2	2
Кровотечения в ЦНС CNS bleeding	–	–
Другие кровотечения: после циркумизии, из пуповинного остатка, кефалогематома, макрогематурия, после венопункций, субконъюнктивальные кровоизлияния Other bleeding problems: following circumcision, umbilical stump bleeding, cephalohaematoma, macroscopic haematuria, post-venepuncture, conjunctival haemorrhage.	–	–
Всего Total	20	20

Примечание. ЦНС – центральная нервная система.
Note. CNS – central nervous system.

Оптическая микроскопия

Тромбоциты пациентки характеризовались высокой гетерогенностью размера и гранулярности с преобладанием крупных вакуолизированных форм (рисунки 1). За время наблюдения с 17 до 19 лет уменьшились средний диаметр и площадь тромбоцитов. В 2 раза снизилась доля тромбоцитов диаметром $> 5,0$ мкм (таблица 2). Количество гипо- и агранулярных форм тромбоцитов в возрасте 17 лет составляло до 50%, к 19 годам снизилось до 22,4%, демонстрируя тенденцию к нормализации размера и гранулярности тромбоцитов.

Наблюдалась тенденция к снижению фракции незрелых (ретикулярных) тромбоцитов (IPF) по мере взросления пациентки с 9,7 до 8,6% (норма 1,4–4,6%) (таблица 2), что коррелирует с увеличением количества и уменьшением размера тромбоцитов, однако

данный показатель все равно оставался выше референтных значений для возраста пациентки [14].

Проточная цитометрия

У пациентки за время наблюдения с 17 до 19 лет отмечалась тромбоцитопения с тенденцией к восстановлению количества тромбоцитов с 47 до $82 \times 10^9/\text{л}$ (таблица 3). Метод ПЦ показал гетерогенность тромбоцитов пациентки по размеру и гранулярности, определявшихся по светорассеянию (рисунок 2, таблица 3).

В период наблюдения размер (рисунок 2А, Б) и гранулярность (рисунок 2Г, Д) тромбоцитов в покое и после активации были повышены. Однако с возрастом пациентки размер и гранулярность в покое уменьшались, приближаясь к верхним значениям КГ. После активации наблюдалась тенденция к увеличению размера тромбоцитов (рисунок 2Б). В норме, напротив, происходит контракция тромбоцитов после активации за счет сокращения актомиозина и других динамических цитоскелетных процессов [15]. Показатели гранулярности не изменялись при активации (рисунок 2Д) относительно значений в покое (рисунок 2Г) в течение всего периода наблюдения.

Рисунок 1

Морфология тромбоцитов

Панель А – крупные вакуолизированные тромбоциты пациентки; панель Б – тромбоциты здорового добровольца

Figure 1

Platelet morphology

Panel A – large vacuolated platelets of the patient; panel B – platelets of a healthy volunteer

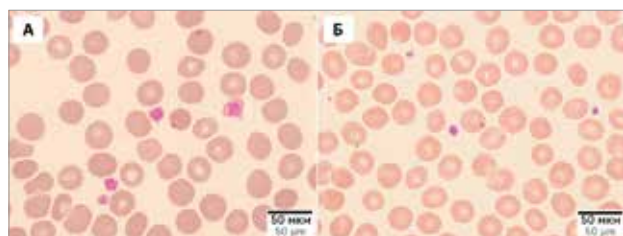


Таблица 2

Морфологические характеристики тромбоцитов нашей пациентки

Table 2

Morphological characteristics of platelets of the patient

Показатель Parameter	Норма Normal range	17 лет 17 y.o.	19 лет 19 y.o.
Средний диаметр, мкм Mean diameter, μm	1,69–2,63	3,47	2,97
Средняя площадь, мкм ² Mean area, μm^2	4,03–4,75	10,13	7,52
Минимальный диаметр, мкм Minimum diameter, μm		1,78	1,9
Максимальный диаметр, мкм Maximum diameter, μm		5,97	6,36
< 2,0 мкм, % < 2,0 μm , %	44,67	2,3	7,9
2,0–4,0 мкм, % 2,0–4,0 μm , %	53,54	72,41	80,3
4,0–5,0 мкм, % 4,0–5,0 μm , %	1,76	19,54	9,2
> 5,0 мкм, % > 5,0 μm , %	0,13	5,75	2,6
IPF, %	1,4–4,6	9,7	8,6

Note. IPF – immature platelet fraction.

Нормализация размера тромбоцитов с возрастом сопровождалась признаками ослабления их способности к контракции (рисунок 2Б), а повышенная и не изменяющаяся при активации гранулярность (рисунок 2Е) может объясняться персистирующей вакуолизацией тромбоцитов.

Таким образом, с возрастом количество тромбоцитов увеличивалось, а размер и гранулярность в покое закономерно уменьшались (рисунок 2, таблица 3), приближаясь к нормальным значениям, подтверждая данные микроскопии (таблица 2). Однако показатели активационных изменений по индексам FSC и SSC, напротив, демонстрировали признаки ослабления, подобно тому как это было описано для пациентов с мутациями *ANKRD26* [10], *RUNX1* и *ETV6* [16], что согласуется с данными о нарушении адгезии и распластывания тромбоцитов на фибриногеновой подложке при тромбоцитопениях *RUNX1* и *ETV6* [17, 18] и может быть объяснено нарушением механизмов перестройки цитоскелета тромбоцитов.

CD42b является рецептором фактора фон Виллебранда (ГП Ib/V/IX). Количество рецептора отражает способность тромбоцитов к первичной адгезии к коллагену I и III типов [19]. У пациентки в возрасте 17 лет уровень CD42b был повышен (рисунок 3А, Б), а его растворение/интернализация при активации были ослаблены по сравнению с КГ (рисунок 3В), подобно тому как это было описано у пациентов с *ANKRD26* и эссенциальной тромбоцитемией [10, 12]. В возрасте 18 лет все показатели CD42b не отличались от КГ, несмотря на увеличенный размер тромбоцитов (рисунок 3А, Б). В возрасте 19 лет уровень CD42b был повышен (рисунок 3А, Б), но индекс активации находился в пределах значений КГ (рисунок 3В). Таким образом, с возрастом у пациентки наблюдалась тенденция к нормализации показателей CD42b (рисунок 3, таблица 3) одновременно с уменьшением размера тромбоцитов.

CD61 (ГП IIIa) является субъединицей рецептора фибриногена (ГП IIb/IIIa) [20]. Значение мембранного CD61 в покое в возрасте 17 лет было выше максимальных значений КГ, в возрасте 18 и 19 лет данный показатель не отличался от КГ (рисунок 4А). Выход CD61 из внутриклеточного депо при активации и индекс экспонирования CD61 оставались в норме при сравнении с КГ в период наблюдения (рисунок 4Б, В). Таким образом, показатели CD61 с возрастом нормализовались (рисунок 4, таблица 3), что коррелирует с уменьшением размера тромбоцитов.

Связывание антитела PAC1 с активированной (кластеризованной) формой ГП IIb/IIIa тромбоцитов в покое было выше относительно верхней границы КГ на протяжении всего времени наблюдения (рисунок 5А), что могло быть связано с увеличенным размером тромбоцитов. Однако после активации данный показа-

тель был ниже значений КГ (рисунок 5Б), что объясняет нарушение агрегации тромбоцитов пациентки с АДФ, коллагеном, TRAP и арахидоновой кислотой, подробно описанное ранее [8]. Закономерно индекс активации ГП IIb/IIIa (по PAC1) также был значительно снижен относительно КГ (рисунок 5В). Таким образом, нормализации этого показателя с возрастом не наблюдалось (рисунок 5, таблица 3).

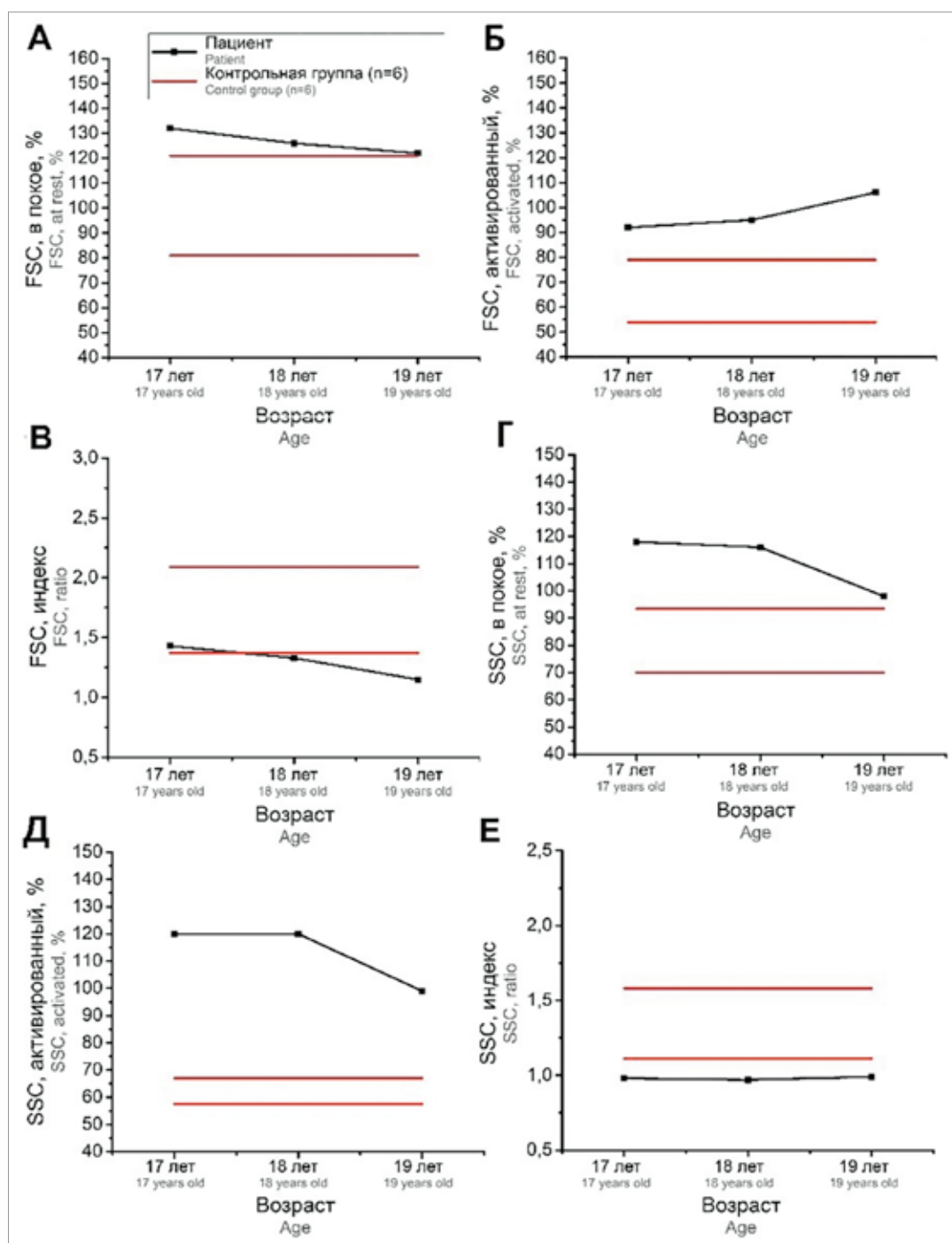
Доля FC^+ тромбоцитов в покое в течение всего времени наблюдения была повышена (рисунок 6А), что может указывать на усиленный апоптоз и ускоренный клиренс тромбоцитов, подобно тому как это было описано при синдроме Вискотта–Олдрича [21, 22] и иммунной тромбоцитопении [23, 24]. После активации доля FC^+ тромбоцитов находилась на нижней границе диапазона КГ (рисунок 6Б). Учитывая повышенную долю FC^+ тромбоцитов в покое, индекс образования прокоа-

Рисунок 2

Возрастная динамика изменения FSC (А – в покое; Б – после активации; В – индекс контракции) и SSC (Г – в покое; Д – после активации; Е – индекс дегрануляции)

Figure 2

Age-related changes in platelet size (FSC) (А – at rest; Б – after activation; В – ratio) and granularity (SSC) (Г – at rest; Д – after activation; Е – ratio)



гулянтных тромбоцитов был закономерно снижен и не имел возрастной динамики (рисунки 6В). Таким образом, выраженной тенденции к нормализации прокоагулянтной активности тромбоцитов по мере взросления пациентки не наблюдалось (рисунки 6, таблица 3).

В период наблюдения у пациентки не было выявлено признаков дефицита пула хранения и нарушения механизма высвобождения плотных и α -гранул. Так, флуоресценция загруженного мепакрина

плотных гранул была повышена как в покое, так и после активации на протяжении всего времени наблюдения относительно КГ, что коррелирует с увеличенным размером тромбоцитов пациентки. Индекс высвобождения плотных гранул не отличался от КГ за весь период наблюдения. CD62p мембраны тромбоцитов в покое и экстернализированный CD62p α -гранул после активации находились в пределах значений КГ, несмотря на увеличенный размер тром-

Таблица 3
Оценка функциональной активности тромбоцитов методом ПЦ

Table 3
Evaluation of platelet functional activity by flow cytometry

Параметр Parameter	КГ Control group	17 лет 17 y.o.	18 лет 18 y.o.	19 лет 19 y.o.
1	2	3	4	5
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Platelets, $\times 10^9/\text{L}$	229 (219–376)	47	67	82
FSC:				
в покое, % at rest, %	107 (81–121)	132	126	122
после активации, % after activation, %	69 (54–79)	92	95	106
индекс (контракции) FSC в покое/после активации FSC ratio at rest/after activation	1,53 (1,37–2,09)	1,43	1,33	1,15
SSC:				
в покое, % at rest, %	84,6 (70–93,4)	118	116	98
после активации, % after activation, %	84,2 (57,5–66,9)	120	120	99
индекс (дегрануляции) SSC в покое/после активации SSC ratio at rest/after activation	1,19 (1,11–1,58)	0,98	0,97	0,99
ГП Ib (антиген CD42b): Glycoprotein (GP) Ib (CD42b antigen):				
в покое, % at rest, %	99 (68–118)	135	107	121
после активации, % after activation, %	57 (46–71)	98	69	82
индекс растворения CD42b в покое/после активации CD42b ratio at rest/after activation	1,71 (1,43–2,39)	1,38	1,55	1,47
ГП IIIa (антиген CD61): GP IIIa (CD61 antigen):				
в покое, % at rest, %	98 (91–113)	119	93	93
после активации, % after activation, %	261 (211–352)	340	284	286
индекс экспонирования CD61 после активации/в покое CD61 ratio after activation/at rest	2,58 (2,28–3,45)	2,86	3,05	3,08
1	2	3	4	5
Связывание PAC1 (активированный ГП IIb/IIIa): PAC-1 binding (activated GP IIb/IIIa):				
в покое, % at rest, %	3,31 (3,02–4,1)	4,8	10,8	5,2
после активации, % after activation, %	116 (76–165)	33	26	33
индекс активации ГП IIb/IIIa (по PAC1) после активации/в покое PAC-1 ratio after activation/at rest	36 (21–48)	6,87	2,41	6,35
Флуоресценция загруженного мепакрина в плотных гранулах: Fluorescence of mepacrine-loaded dense granules:				
в покое, % at rest, %	85 (73–118)	165	195	150
после активации, % after activation, %	22 (19–35)	62	64	53
индекс высвобождения плотных гранул dense granules release index at rest/after activation	4,1 (2,2–4,8)	2,7	3,1	2,8
Антиген CD62p: CD62p antigen:				
в покое, % at rest, %	2,35 (2,1–4)	2,8	2,3	2,5
после активации, % after activation, %	93 (78–114)	84	86	110
индекс высвобождения α -гранул (по CD62p) после активации/в покое release index of α -granules (by CD62p) after activation/at rest	41 (20–47,5)	30	37,39	44
Доля прокоагулянтных тромбоцитов (по аннексину V): The proportion of procoagulant platelets (by annexin V):				
в покое, % at rest, %	0,3 (0,05–0,7)	2,28	2,64	1,33
после активации, % after activation, %	19 (6,2–37,1)	10,80	6,50	8,03
индекс образования прокоагулянтных тромбоцитов после активации/в покое index of the formation of procoagulant platelets after activation/at rest	66 (21–332)	4,74	2,46	6

боцитов. Индекс выброса α -гранул после активации/в покое за все время наблюдения оставался в пределах значений КГ (таблица 3).

Таким образом, в период наблюдения были выявлены последовательное увеличение количества тромбоцитов, уменьшение их размера и гранулярности в покое, нормализация ГП Ib/V/IX (по CD42b) и ГП IIb/IIIa (по CD61) до значений КГ, оставались сохранными показатели пула хранения α - и плотных гранул,

без существенной положительной динамики были сниженные показатели активации ГП IIb/IIIa (по PAC1) и прокоагулянтной активности тромбоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

У пациентки по мере взросления уменьшалась тяжесть геморрагического синдрома и в ходе 3-летнего клинико-лабораторного обследования

Рисунок 3

Возрастная динамика изменения рецептора CD42b на мембране тромбоцитов
А – в покое; Б – после активации; В – индекс растворения

Figure 3

Age-related changes in the CD42b receptor on platelet membrane
A – at rest; B – after activation; B – ratio

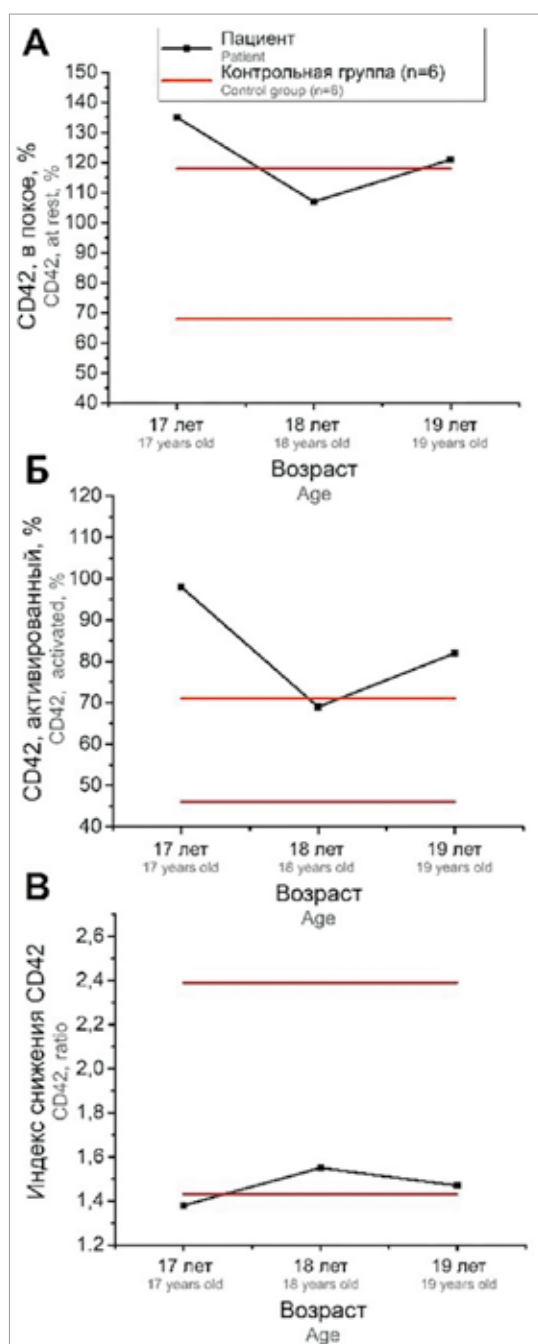
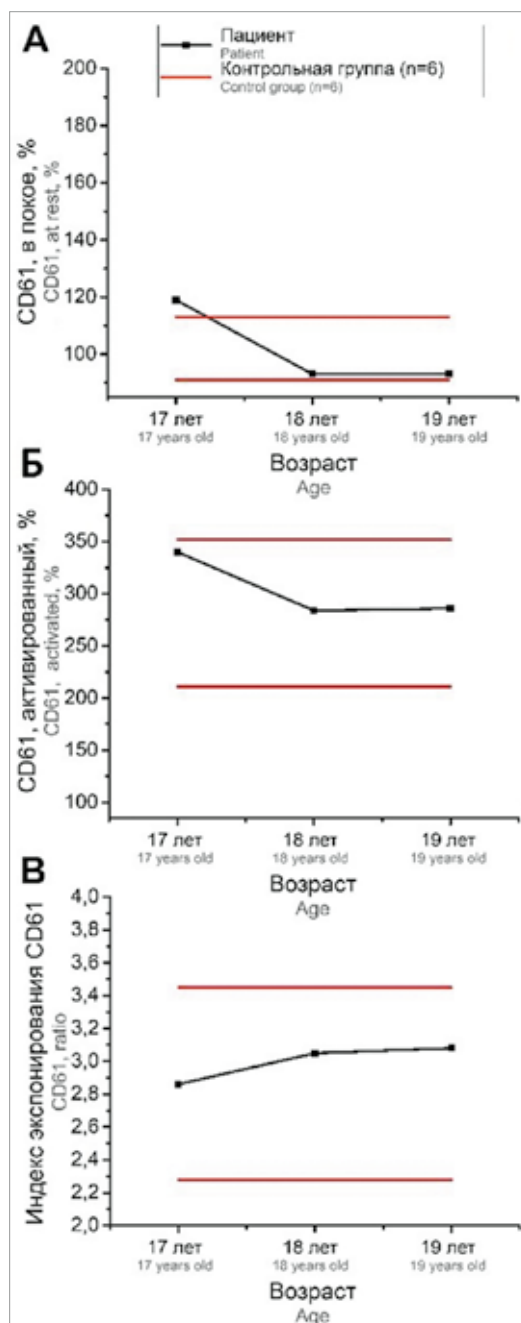


Рисунок 4

Возрастная динамика изменения плотности рецептора CD61 на мембране тромбоцитов
А – в покое; Б – после активации; В – индекс экспонирования

Figure 4

Age-related changes in the density of CD61 receptor on platelet membrane
A – at rest; B – after activation; B – ratio



наблюдалась тенденция к частичной нормализации характеристик тромбоцитов.

Считается, что увеличение доли IPF говорит об усиленной регенераторной функции костного мозга. Также известно, что экстернализованный на экзоплазматический листок мембраны ФС передает сигналы для апоптотического клеточного клиренса тромбоцитов (макрофагами, эндотелиальными клетками) и может быть важным маркером элими-

нации прокоагулянтных тромбоцитов [25, 26]. Таким образом, повышенные значения IPF и доли ФС⁺ тромбоцитов в покое у пациентки может быть связано с ускоренным клиренсом патологических тромбоцитов. Наблюдавшиеся с возрастом увеличение количества, уменьшение размера и гранулярности, снижение числа IPF и прокоагулянтных тромбоцитов могут указывать на ослабление интенсивности клиренса тромбоцитов пациентки. Однако все вышеперечис-

Рисунок 5

Возрастная динамика активации ГП IIb/IIIa
А – в покое; Б – после активации; В – индекс активации рецептора

Figure 5

Age-related changes in GP IIb/IIIa activation
A – at rest; Б – after activation; В – ratio

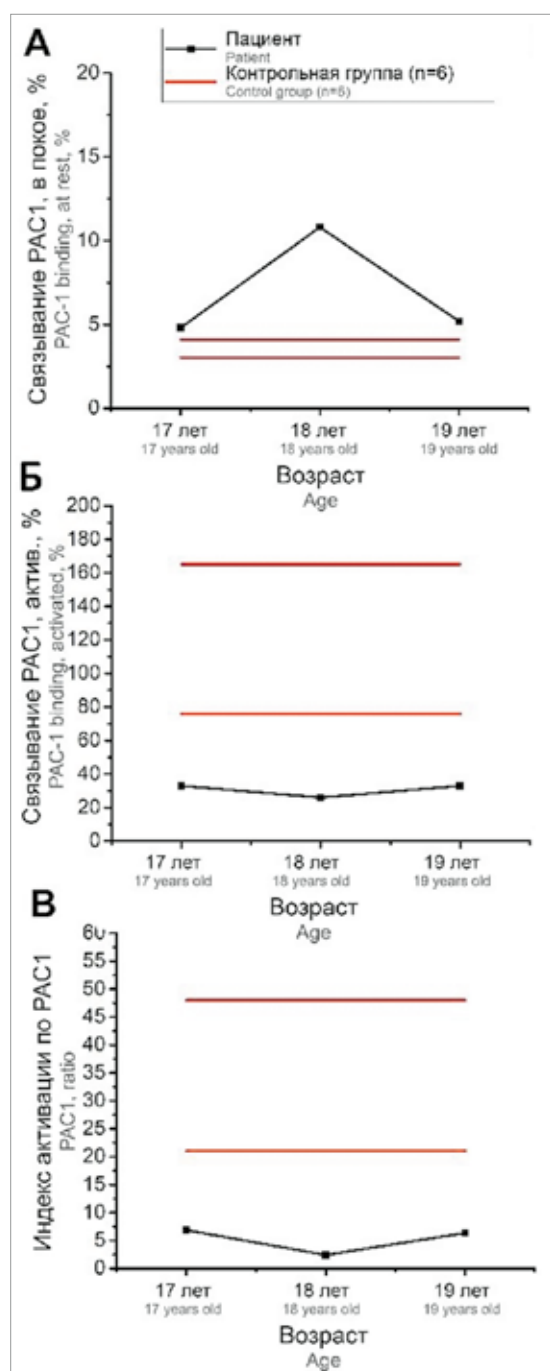
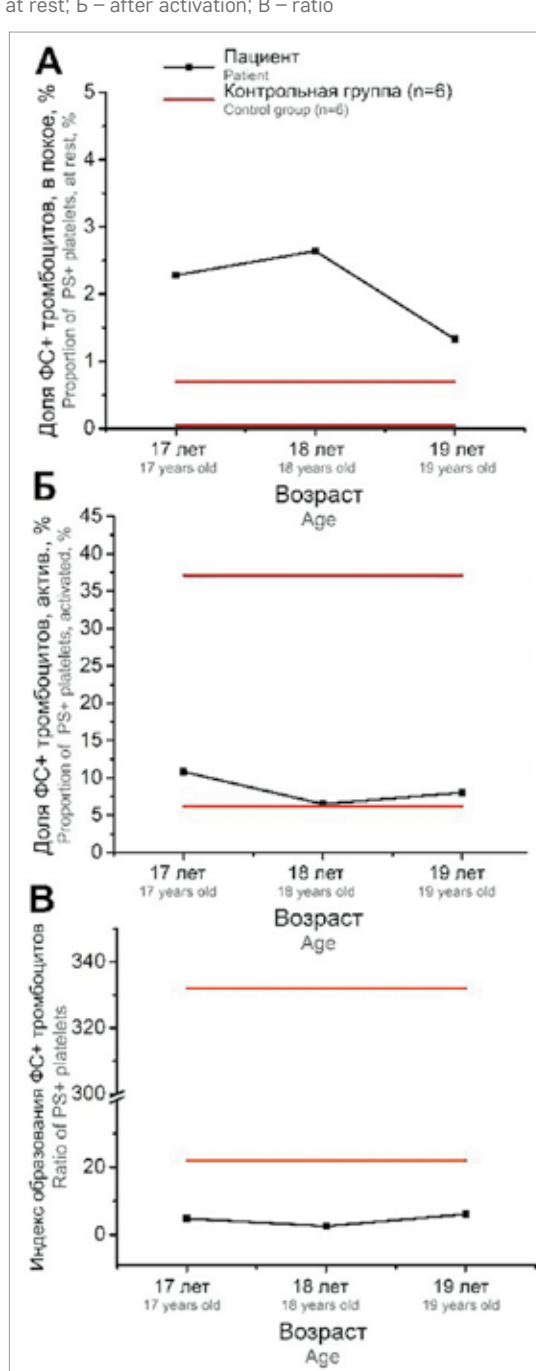


Рисунок 6

Возрастная динамика изменения доли прокоагулянтных тромбоцитов
А – в покое; Б – после активации; В – индекс образования

Figure 6

Age-related changes in the proportion of procoagulant platelets
A – at rest; Б – after activation; В – ratio



ленные показатели оставались вне нормальных значений весь период наблюдения.

Ранее сообщалось о 3 пациентах со схожей мутацией *SLFN14* (с.657 A>T, p.Lys219Asn) [3, 5], приводящей к нарушению структуры белка *SLFN14* в том же сайте, но отличающемся от нашей пациентки на 1 аминокислоту (с.655 A>G, p.Lys219Glu) [8]. Возможно, такое различие в структуре белка привело к дефициту плотных гранул у ранее описанных пациентов [3] и сохранности количества и функции плотных и α -гранул у нашей пациентки в течение всего периода наблюдения.

Считается, что при многих макротромбоцитопениях дифференцировка и созревание мегакариоцитов сохранены, а тромбоцитопения возникает из-за изменений в вытягивании и высвобождении протромбоцитов из зрелых мегакариоцитов и/или превращении протромбоцитов в тромбоциты в кровотоке [27]. Данные С. Marconi и соавт. по пациентам с *SLFN14* показали сочетание уменьшения количества мегакариоцитов в периферической крови с дефектом удлинения протромбоцитов [4]. Об аномалиях внутриклеточных органелл, возникающих вследствие нарушений мегакариоцитопоэза, ранее сообщалось для ряда тромбоцитопатий, например при синдроме белых тромбоцитов [28] и синдроме серых тромбоцитов [29]: тромбоциты были увеличены, в клетках обнаруживались комплексы Гольджи, вакуоли, избыточно развитые канальцевые сети, центриолы и другие признаки нарушения созревания. При *ANKRD26*-связанной тромбоцитопении сообщалось об уменьшении α -гранул, увеличении канальцевой сети [30] и общей гранулярности [10]. У нашей пациентки тромбоциты также были выражено вакуолизированы и характеризовались повышенной гранулярностью в течение всего периода наблюдения, что согласуется с литературными данными для НТ.

Взросление пациентки сопровождалось постепенной нормализацией размера тромбоцитов и законо-

мерным снижением ГП Ib/V/IX и ГП IIb/IIIa на мембране тромбоцитов. Однако сниженное связывание PAC-1 с кластеризованной формой ГП IIb/IIIa не изменялось в период наблюдения, указывая на устойчивое нарушение внутриклеточной мобилизации кальция при стимуляции TRAP и CRP, сочетавшееся с нарушениями агрегации в ответ на АДФ, коллаген, TRAP, адреналин и арахидоновую кислоту, описанными ранее [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдение за пациенткой с мутацией *SLFN14* показало отчетливые и последовательные изменения количественных и морфофункциональных характеристик тромбоцитов, коррелирующих с улучшением клинической картины по мере взросления. Вероятно, увеличение числа тромбоцитов, уменьшение доли FC⁺ тромбоцитов в покое и размера тромбоцитов обуславливали уменьшение геморрагических проявлений. Изучение возраст-зависимых особенностей течения НТ представляется нам перспективным подходом для углубленного понимания механизмов кровоточивости и создания новых подходов к ведению таких пациентов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Rashevskaya E.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1650-1817>
 Polokhov D.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6905-2878>
 Fyodorova D.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4567-1871>
 Ignatova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5217-3937>
 Ponomarenko E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8697-7570>
 Raykina E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7634-2053>
 Mersiyanova I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0471-2956>
 Poletayev A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5209-2099>
 Plyasunova S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4503-0735>
 Zharkov P.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4384-6754>
 Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература

1. Bury L., Falcinelli E., Gresele P. Learning the Ropes of Platelet Count Regulation: Inherited Thrombocytopenias. *J Clin Med* 2021; 10 (3): 533.
2. Oved J.H., Lambert M.P., Kowalska M.A., Poncz M., Karczewski K.J. Population based frequency of naturally occurring loss-of-function variants in genes associated with platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2021; 19 (1): 248–54.
3. Fletcher S.J., Johnson B., Lowe G.C., Bem D., Drake S., Lordkipanidze M., et al. *SLFN14* mutations underlie thrombocytopenia with excessive bleeding and platelet secretion defects. *J Clin Invest* 2015; 125 (9): 3600–5.
4. Marconi C., Di Buduo C.A., Barozzi S., Palombo F., Pardini S., Zaninetti C., et al. *SLFN14*-related thrombocytopenia: identification within a large series of patients with inherited thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2016; 115 (5): 1076–9.
5. Saes J.L., Simons A., de Munnik S.A., Nijziel M.R., Blijlevens N.M.A., Jong-

- mans M.C., et al. Whole exome sequencing in the diagnostic workup of patients with a bleeding diathesis. *Haemophilia* 2019; 25 (1): 127–35.
6. Stapley R.J., Pisareva V.P., Pisarev A.V., Morgan N.V. *SLFN14* gene mutations associated with bleeding. *Platelets* 2020; 31 (3): 407–10.
 7. Stapley R.J., Smith C.W., Haining E.J., Bacon A., Lax S., Pisareva V.P., et al. Heterozygous mutation *SLFN14* K208N in mice mediates species-specific differences in platelet and erythroid lineage commitment. *Blood Adv* 2021; 5 (2): 377–90.
 8. Polokhov D., Fedorova D., Ignatova A., Ponomarenko E., Rashevskaya E., Martyanov A., et al. Novel *SLFN14* mutation associated with macrothrombocytopenia in a patient with severe haemorrhagic syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2023; 18 (1): 74. DOI: 10.1186/s13023-023-02675-9
 9. Mezzano D., Pereira J. Approach to the Patient with Platelet-Related Bleeding. In: *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Gresele P., et al. (eds.) Cham: Springer International Publishing; 2017. Pp. 717–25.
 10. Полохов Д.М., Федорова Д.В., Пшонкин А.В., Игнатова А.А., Пономаренко Е.А., Алексенко М.Ю. и др. Особенности фенотипа тромбоцитов у детей с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2021; 20 (2): 65–73. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-65-73
 11. 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): 58–65. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-58-65
 12. Polokhov D.M., Ershov N.M., Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Gaskova M.V., Zharkov P.A., et al. Platelet function and blood coagulation system status in childhood essential thrombocythemia. *Platelets* 2020; 31 (8): 1001–11.
 13. Bidlingmaier C., Grote V., Budde U., Olivieri M., Kurnik K. Prospective evaluation of a pediatric bleeding questionnaire and the ISTH bleeding assessment tool in children and parents in routine clinical practice. *J Thromb Haemost* 2012; 10 (7): 1335–41.
 14. Reference intervals for immature platelet fraction and immature platelet count – Seo – 2015 – International Journal of Laboratory Hematology – Wiley Online Library [Electronic resource]. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.12237> (accessed 03.07.2022).
 15. Aslan J.E. Platelet Shape Change. In: *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Gresele P., et al. (eds.) Cham: Springer International Publishing; 2017. Pp. 321–36.
 16. Полохов Д.М. Диагностика нарушений функции тромбоцитов у детей с использованием метода проточной цитометрии. Дис. ... канд. мед. наук. М.; 2023. 157 с.
 17. Glembotsky A.C., Bluteau D., Espasandin Y.R., Goette N.P., Marta R.F., Marin Oyarzun C.P., et al. Mechanisms underlying platelet function defect in a pedigree with familial platelet disorder with a predisposition to acute myelogenous leukemia: potential role for candidate *RUNX1* targets. *J Thromb Haemost* 2014; 12 (5): 761–72.
 18. Melazzini F., Palombo F., Balduini A., De Rocco D., Marconi C., Noris P., et al. Clinical and pathogenic features of *ETV6*-related thrombocytopenia with predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2016; 101 (11): 1333–42.
 19. Sadler J.E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 199; 67: 395–424.
 20. Calvete J.J. On the structure and function of platelet integrin α IIb β 3, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208 (4): 346–60.
 21. Shcherbina A., Rosen F.S., Remold-O'Donnell E. Pathological events in platelets of Wiskott–Aldrich syndrome patients. *Br J Haematol* 1999; 106 (4) 875–83.
 22. Obyednyy 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* 2020; 105 (4): 1095–106.
 23. Catani L., Fagioli M.E., Tazzari P.L., Ricci F., Curti A., Rovito M., et al. Dendritic cells of immune thrombocytopenic purpura (ITP) show increased capacity to present apoptotic platelets to T lymphocytes. *Exp Hematol* 2006; 34 (7): 879–87.
 24. Platelet apoptosis in paediatric immune thrombocytopenia is ameliorated by intravenous immunoglobulin – Winkler – 2012 – British Journal of Haematology – Wiley Online Library [Electronic resource]. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2011.08973.x> (accessed 20.06.2022).
 25. Shin H.-W., Takatsu H. Phosphatidylserine exposure in living cells. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2020; 55 (2): 166–78.
 26. Ma R., Xie R., Yu C., Si Y., Wu X., Zhao L., et al. Phosphatidylserine-mediated platelet clearance by endothelium decreases platelet aggregates and procoagulant activity in sepsis. *Sci Rep* 2017; 7 (1): 4978.
 27. Thon J.N., Macleod H., Begonja A.J., Zhu J., Lee K.-C., Mogilner A., et al. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat Commun* 2012; 3 (1): 852.
 28. White J.G., Key N.S., King R.A., Vercellotti G.M. The White platelet syndrome: A new autosomal dominant platelet disorder. *Platelets* 2004; 15 (3): 173–84.
 29. Nurden A.T., Nurden P. The gray platelet syndrome: Clinical spectrum of the disease. *Blood Rev* 2007; 21 (1): 21–36.
 30. 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 (7): 712–5.