

КАЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ АНОМАЛИИ МЕЯ – ХЕГГЛИНА

Сафиуллина С.И.^{1,2,*}, Евтюгина Н.Г.¹, Хисматуллин Р.Р.¹, Кравцова О.А.¹, Хабирова А.И.¹, Андрианова И.А.¹, Аминова А.Г.¹, Пешкова А.Д.¹, Литвинов Р.И.³

¹ Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», 420012, г. Казань, Россия

² Медицинский центр «Айболит», 420081, г. Казань, Россия

³ Департамент клеточной биологии медицинского факультета Университета Пенсильвании, Филадельфия, США

РЕЗЮМЕ

Введение. Аномалия Мея — Хегглина — разновидность мутации в гене *МУН9*, при которой нарушается динамика цитоскелета в мегакариоцитах. Дисфункция мегакариоцитов влечет нарушение тромбоцитопоэза, которое проявляется макротромбоцитопенией, иногда ассоциированной с кровоточивостью.

Цель: изучить структуру и функцию тромбоцитов у членов семьи с аномалией Мея — Хегглина.

Материалы и методы. Обследованы пробанд, ее сестра и их мать, у которых обнаружена гетерозиготная мутация R1933X в гене *МУН9*. Обследование включало общий анализ крови, микроскопию периферической крови, проточную цитометрию тромбоцитов, кинетику контракции сгустков крови, сканирующую и трансмиссионную электронную микроскопию тромбоцитов. Контрольную группу составили 10 здоровых доноров

Результаты: При отсутствии геморрагического синдрома степень контракции сгустков крови была сниженной (у пробанда и ее сестры) или нормальной (у матери). При проточной цитометрии обнаружили фоновую активацию нестимулированных тромбоцитов, установленную по сверхэкспрессии Р-селектина и активного интегрина $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. После стимуляции тромбиновых рецепторов пептидом TRAP-6 доля тромбоцитов, экспрессировавших Р-селектин, у пробанда и ее сестры была существенно ниже, чем у здоровых доноров, что указывало на частичную рефрактерность тромбоцитов. Электронная микроскопия нестимулированных тромбоцитов, наряду с макротромбоцитозом, выявила множественные филоподии и значительное расширение открытой канальцевой системы, содержащей нитевидные и везикулярные включения.

Заключение. Аномалия Мея — Хегглина, обусловленная гетерозиготной мутацией R1933X гена *МУН9*, сопровождается тромбоцитопенией и качественными структурными и функциональными дефектами тромбоцитов. Фоновая активация тромбоцитов парадоксальным образом сочетается с их частичной дисфункцией, что нарушает уплотнение (ретракцию) гемостатических сгустков, предрасполагая больных к геморрагическому диатезу.

Ключевые слова: макротромбоцитопения, мутации гена *МУН9*, тромбоцитопатия, контракция сгустков крови

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена при поддержке «Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030)

Благодарности. Авторы выражают благодарность компании ООО «ГемаКор» (Москва) за предоставление регистратора тромбодинамики, использованного в данной работе. Электронная микроскопия проведена на базе Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» Казанского (Приволжского) федерального университета.

Для цитирования: Сафиуллина С.И., Евтюгина Н.Г., Хисматуллин Р.Р., Кравцова О.А., Хабирова А.И., Андрианова И.А., Аминова А.Г., Пешкова А.Д., Литвинов Р.И. Качественные изменения тромбоцитов при аномалии Мея — Хегглина. Гематология и трансфузиология. 2023; 68(3):410–423. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-68-3-410-423>

QUALITATIVE PLATELET ALTERATIONS IN MAY – HEGGLIN ANOMALY

Safullina S.I.^{1,2,*}, Evtugina N.G.¹, Khismatullin R.R.¹, Kravtsova O.A.¹, Khabirova A.I.¹, Andrianova I.A.¹, Aminova A.G.¹, Peshkova A.D.¹, Litvinov R.I.³

¹ Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 420012, Kazan, Russian Federation

² "Aibolit" Medical Center, 420081, Kazan, Russian Federation

³ Department of Cell and Developmental Biology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, United States 421 Curie Blvd., BRB II/III, Philadelphia, PA 19104-6058, USA

ABSTRACT

Introduction: May – Hegglin anomaly is an autosomal dominant mutation in the *MYH9* gene that disrupts the dynamics of the cytoskeleton in megakaryocytes. Megakaryocyte dysfunction entails a violation of thrombocytopoiesis, which is manifested by macrothrombocytopenia, sometimes associated with bleeding.

Aim: to study the structure and function of platelets in the family members with documented May – Hegglin anomaly.

Patients and methods. The proband, her sister and their mother who all had a heterozygous mutation R1933X in the *MYH9* gene were examined. The examination included complete blood count, peripheral blood microscopy, platelet flow cytometry, blood clot contraction kinetics, scanning and transmission electron microscopy of platelets. The control group included 10 healthy donors.

Results. In the proband and her sister the degree of contraction of blood clots was reduced. Unstimulated platelets displayed overexpression of P-selectin and active α IIb β 3 integrin. After TRAP-induced stimulation the proportion of platelets expressing P-selectin in the patients was below normal, indicating partial platelet refractoriness. Electron microscopy of the unstimulated platelets revealed macrothrombocytosis and multiple filopodia, as well as enlargement of the open canalicular system.

Conclusion. The May – Hegglin anomaly caused by a heterozygous mutation R1933X in the *MYH9* gene is accompanied by thrombocytopenia associated with structural and functional platelet defects. Partial platelet refractoriness and contractile dysfunction can impair the retraction of hemostatic clots, predisposing patients with *MYH9*-related disorders to bleeding.

Keywords: macrothrombocytopenia, *MYH9* gene mutations, thrombocytopathy, blood clot contraction

Conflict of Interests: the authors declare no conflict of interests.

Funding: this work was supported by the Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030) at the Kazan Federal University.

Acknowledgements. We thank HemaCore Ltd. (Moscow, Russian Federation) for providing the Trombodynamics Analyzer System used in this study. Transmission electron microscopy was performed at the Interdisciplinary Center for Analytical Microscopy of Kazan Federal University.

For citation: Safullina S.I., Evtugina N.G., Khismatullin R.R., Kravtsova O.A., Khabirova A.I., Andrianova I.A., Aminova A.G., Peshkova A.D., Litvinov R.I. Qualitative platelet alterations in May – Hegglin anomaly. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2023;68(3):410–423 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-68-3-410-423>

Введение

Врожденные или приобретенные тромбоцитопении характеризуются стойким уменьшением количества тромбоцитов в крови, проявляющимся геморрагическим синдромом, который варьирует по клиническим проявлениям и степени их выраженности. Количественные изменения могут сочетаться с качественными дефектами тромбоцитов, т.е. тромбоцитопатиями. Многочисленные приобретенные аномалии тромбоцитов обусловлены их потреблением, хрониче-

ской активацией или индуцированной дисфункцией, повышенным разрушением или пониженной продукцией. К числу первичных генетических тромбоцитопений и тромбоцитопатий, очень разных по механизмам развития и клиническому фенотипу, относят синдром Бернара – Сулье, псевдоблезнь Виллебранда, тромбастению Гланцмана, болезнь Германского – Пудлака, тромбоцитопению с отсутствием лучевых костей (thrombocytopenia-absent radius syndrome –

TAR-синдром), синдром серых тромбоцитов, синдром Чедиака — Хигаси, синдром Вискотта — Олдрича, дефицит плотных гранул и другие [1].

Среди врожденных тромбоцитопений и тромбоцитопатий выделяют наследственные заболевания, объединенные наличием дефекта в гене *МУН9*, присутствующем в хромосоме 22q12–13 и кодирующем тяжелую цепь немышечного миозина IIА [2]. Миозин IIА синтезируется во многих клетках, но в тромбоцитах он является основной изоформой этого моторного белка, который в комплексе с актином генерирует механическую силу, необходимую для перестройки цитоскелета при выполнении тромбоцитами разнообразных функций, таких как агрегация, секреция биологически активных веществ, контракция сгустков крови и другие [3]. Мутации в гене *МУН9* в большинстве случаев наследуются по аутосомно-доминантному типу и вызывают группу родственных *МУН9*-ассоциированных болезней [4], распространенность которых в общей популяции составляет около 3 случаев на 1 000 000 населения [5–7].

Дефекты гена *МУН9* могут оставаться бессимптомными, но нередко проявляются геморрагическим синдромом, иногда в сочетании с другими патологическими проявлениями, такими как нефрит, катаракта и нейросенсорная тугоухость [2]. Геморрагический синдром при этих наследственных аномалиях отсутствует или выражен слабо. Патогномоничные лабораторные симптомы *МУН9*-ассоциированных болезней: макротромбоцитопения (уменьшение количества тромбоцитов при одновременном увеличении их размера) в сочетании с так называемыми тельцами Деле (базофильными цитоплазматическими включениями в нейтрофилах, моноцитах и эозинофилах, которые представляют собой белковые агрегаты мутированной тяжелой цепи миозина IIА) [8, 9].

В данной работе исследован случай генетически подтвержденной семейной мутации гена *МУН9* в виде аномалии Мея — Хегглина с описанием и анализом клинических и лабораторных проявлений этого редкого наследственного патологического состояния. В литературе описано менее 1000 случаев аномалии Мея — Хегглина, поэтому выявление новых вариантов этого заболевания в сочетании с подробным клинико-лабораторным обследованием больных представляет как научный, так и практический интерес.

Цель настоящего сообщения — изучить структуру и функцию тромбоцитов у членов семьи с аномалией Мея — Хегглина.

Материалы и методы

Больные. Обследование, проведенное в январе 2021 г., включало больную М. (пробанд, 35 лет), ее сестру А. (38 лет) и их мать Ф. (62 года).

Контрольную группу составили 10 здоровых доноров в возрасте от 21 до 72 лет (средний возраст 38 ±

8 лет). Трое из них были выбраны случайным образом для проведения сканирующей электронной микроскопии тромбоцитов. Электронограммы одного из них с характерной морфологией тромбоцитов были подвергнуты количественной морфометрии. Все взрослые доноры и больные подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 3 от 23.03.2017 г.).

Получение крови и ее компонентов. Венозную кровь стабилизировали 3,8% цитратом натрия в соотношении 9:1 по объему. Богатую тромбоцитами плазму (БТП) получали центрифугированием цитратной крови при 200 g 10 минут; бестромбоцитную плазму получали последовательным двукратным центрифугированием БТП при 1600 g в течение 15 мин и при 10 000 g — 5 мин. Дополнительную пробу венозной крови стабилизировали K_3 -ЭДТА (конечная концентрация 1,6 мг/мл) и использовали для гематологических анализов и генетических исследований. Кровь для исследования использовали не позднее 4 ч после взятия.

Микроскопия мазков крови, гематологический анализ и показатели гемостаза. Цельную нестабилизированную кровь из пальца смешивали с 3%-ным раствором ЭДТА в соотношении 1:3, после чего переносили каплю крови на предметное стекло, делали мазок, высушивали и фиксировали в метаноле в течение 10 мин. Мазок периферической крови окрашивали по Романовскому — Гимзе и анализировали под микроскопом в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$. Гематологический анализ проводили с помощью автоматического анализатора («Sysmex XN», Sysmex, Япония). Состояние гемостаза оценивали на коагулометре «ACL TOP 500» (Instrumentation Laboratory, США).

Кинетика контракции сгустков крови. Определение кинетики и степени контракции сгустков крови проводили с использованием прибора «Регистратор тромбодинамики» (ООО «ГемаКор», Россия). Метод основан на оптической регистрации размера сгустка крови в процессе сжатия, как описано ранее [10, 11].

Проточная цитометрия тромбоцитов. Функциональное состояние тромбоцитов в БТП оценивали методом проточной цитометрии до и после активации пептидом (TRAP-6) по экспрессии Р-селектина (связывание анти-CD62p антител) и активного интегрин $\alpha IIb\beta 3$ (антитела PAC-1). TRAP-6 (конечная концентрация 50 мкМ) добавляли к БТП и инкубировали в течение 3 минут при комнатной температуре. После инкубации с флуоресцентно-мечеными антителами (10 мин при комнатной температуре) тромбоциты анализировали с помощью проточного цитометра «FacsCalibur», оснащенного программой «BD CellQuest». Гейт тромбоцитов был определен на основе

их размера (прямое светорассеяние, FSC) и гранулярности (боковое светорассеяние, SSC); в каждом образце подсчитывали 5000 тромбоцитов. Для анализа данных использовали программное обеспечение «FlowJo X».

Сканирующая электронная микроскопия тромбоцитов. Для сканирующей электронной микроскопии тромбоцитов БТП разбавляли в 10 раз буфером Тироде (4 mM HEPES; 135 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 2,4 mM MgCl₂; 3,3 mM NaH₂PO₄; 5,6 mM D-глюкоза; 0,3% бычий сывороточный альбумин, pH 7,4), после чего фиксировали глутаровым альдегидом в конечной концентрации 2,5% и осаждали на поликарбонатный фильтр (размер пор 0,4 мкм) центрифугированием при 500 g, 5 мин. Осажденные тромбоциты промывали фосфатным буфером (0,1 M NaH₂PO₄, 0,1 M Na₂HPO₄, pH 7,2), после чего дегидратировали растворами этанола в восходящих концентрациях и инкубировали в гексаметилдисилазане с последующим высушиванием. Дегидратированные образцы напыляли тонким слоем золота с палладием на приборах «Polaron e5100» или «Quorum Q150T» и использовали для сканирующей электронной микроскопии (микроскоп «Merlin», Carl Zeiss, Германия).

Трансмиссионная электронная микроскопия тромбоцитов. Для трансмиссионной электронной микроскопии тромбоцитов БТП разбавляли в 10 раз буфером Тироде, после чего фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом, промывали фосфатным буфером (0,1 M NaH₂PO₄, 0,1 M Na₂HPO₄, pH 7,2) и вторично фиксировали 1% OsO₄ в присутствии сахарозы (25 мг/мл). Образцы дегидратировали растворами этанола в восходящих концентрациях, после чего образцы обрабатывали ацетоном и окисью пропилена. Обезвоженные образцы последовательно, с промежутком 12–24 часа при 4 °C пропитывали в смеси эпоксидной смолы (Эпон-812) и окиси пропилена в соотношениях 1:2, 1:1 и 2:1. После этого образцы заключали в чистую эпоксидную смолу и оставляли полимеризоваться в термостате при 37 °C. Через каждые 12–24 ч поднимали температуру с 37 до 45 °C, затем до 60 °C. Срезы получали на ультрамикротоме «Leica UC7» (Германия); контрастировали насыщенным водным раствором уранил-ацетата, а затем 0,4% водным раствором цитрата свинца. Препараты исследовали на электронном микроскопе «Hitachi HT7700 Exalens» (Япония).

Молекулярно-генетическое исследование. Выделение ДНК для выявления мутаций в гене *MYH9* проводили из буккального эпителия с использованием набора реактивов «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Наличие или отсутствие потенциальных мутаций в экзонах 26 (T1155I) и 27 (R1165C) исследуемого гена определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени на основе TaqMan-технологии

с использованием коммерческих наборов реактивов фирмы «ThermoFisher Scientific» (США) (кат. № C_27860266_10 и C_27860265_10 соответственно). Выявление мутаций в других экзонах проводили методом секвенирования с использованием праймеров, подобранных с помощью программы «CloneManager». Реакцию секвенирования осуществляли с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США) с последующим разделением продуктов секвенирования на капиллярном анализаторе «ABI PRISM 3730» (Applied Biosystems, США). Анализ результатов секвенирования проводили с использованием программы «FinchTV» с последующим выравниванием последовательностей экзона гена *MYH9* с помощью программ «BLAST» (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) и Mafft (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали пакет программ «GraphPad Prism 8». Парные сравнения осуществляли с помощью *t*-тест Стьюдента для параметрических данных. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Для многофакторного анализа применяли тест Краскела — Уоллиса с последующим тестом Данна для непараметрических параметров и тест one-way ANOVA с последующим тестом Дьюки для параметрических данных. Корреляционный анализ проводили методом Спирмена. Для анализа качественных признаков использовали критерий χ^2 . Уровень статистической значимости был равен 95% ($p < 0,05$).

Результаты

Результаты клинического обследования

Больная М. (пробанд), 1986 года рождения. Менархе — в 14 лет, менструации — обильные, болезненные. В подростковом возрасте наблюдались периодические спонтанные носовые кровотечения, которые купировались самостоятельно, и экхимозы на теле и конечностях, которые возникали при незначительной травматизации. В возрасте 29 лет была впервые случайно обнаружена тромбоцитопения $50 \times 10^9/\text{л}$, наблюдалась у гематолога по месту жительства с диагнозом «идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура» (ИТП). Вероятной причиной ошибочного диагноза было отсутствие или недооценка показателей гемограммы — среднего объема тромбоцитов (mean platelet volume — MPV), фракции крупных тромбоцитов (platelet large cell ratio — P-LCR), индекса распределения тромбоцитов (platelet distribution width — PDW). Первая беременность в возрасте 34 лет протекала без геморрагического синдрома. Плановое родоразрешение произведено на сроке 38 недель путем кесарева сечения по акушерским показаниям. Во время операции были перелиты 3 дозы концентрата

тромбоцитов в связи с геморрагическим синдромом (петехиальные высыпания на висцеральной брюшине матки и пузырно-маточной складке в брюшной полости). Родилась девочка, масса тела которой была 2200 г. В послеоперационном периоде кровотечения не было. Операционная рана зажила первичным натяжением. В связи с подозрением на тромбоцитопатию у пробанда М. исследован мазок крови и проведено генотипирование, которые подтвердили мутацию гена *МУН9*. На момент обследования (январь 2021 г.) проявлений геморрагического синдрома, признаков поражения слуха, зрения и почек не было. У новорожденной девочки (октябрь 2021 г.) была выявлена комбинация тромбоцитопении ($10 \times 10^9/\text{л}$) и макротромбоцитоза, а также тельца Деле в лейкоцитах, при этом не было геморрагического синдрома. В июле 2022 г. было проведено генетическое тестирование, при котором подтверждена мутация в гене *МУН9*.

Родная сестра пробанда, А., 1983 года рождения. Менархе — в 14 лет, менструации — умеренные, безболезненные. В 24 года проявился геморрагический синдром в виде петехий на нижних конечностях и тромбоцитопения до $28 \times 10^9/\text{л}$. Гематологом по месту жительства был установлен диагноз «ИТП». После двух курсов лечения преднизолоном перорально в связи с отсутствием нормализации количества тромбоцитов крови была проведена плановая спленэктомия, после которой не был достигнут ни клинический, ни лабораторный эффекты. Первая беременность в 2019 г. закончилась экстренным кесаревым сечением на сроке 28 недель в связи с преждевременной отслойкой нормально расположенной плаценты. Операция сопровождалась кровотечением, из-за чего потребовалось переливание компонентов крови. Масса тела новорожденной девочки составила 1900 г. Исследование мазка крови у сестры пробанда А. и генотипирование подтвердили наличие у нее мутации гена *МУН9*. На момент обследования (январь 2021 г.) клинических проявлений геморрагического синдрома, признаков поражения слуха, зрения и почек не было. Развитие ребенка соответствовало возрасту. Отклонений в гемограмме в мае 2021 г. у ребенка не выявлено.

Мать пробанда, Ф., 1959 года рождения. Менархе — в 14 лет, менструации — обильные, продолжительность — 6–7 дней. Другие проявления геморрагического синдрома, в том числе после оперативных вмешательств (аппендэктомия, удаление кисты верхнечелюстной пазухи, миомэктомия и экстирпация зубов), отрицает. Две беременности закончились родами без геморрагических осложнений. Масса дочерей при рождении — 2900 и 2800 г. В возрасте 57 лет при обследовании в связи с болями в животе выявлена тромбоцитопения $86 \times 10^9/\text{л}$; гематологом по месту жительства был установлен диагноз «ИТП». На момент обследования (январь 2021 г.) геморрагического син-

дрома, признаков поражения слуха, зрения и почек не выявлено. Со слов пробанда и живущих родственников, в семейном анамнезе видимых проявлений геморрагического синдрома не было (рис. 1).

Молекулярно-генетический анализ

В образцах ДНК всех трех обследованных больных выявлена гетерозиготная мутация С5797Т (R1933X) в 41-м экзоне гена *МУН9*, которая приводит к образованию преждевременного стоп-кодона в мРНК и, как следствие, к abortивному синтезу тяжелой цепи миозина II [12]. В остальных исследованных экзонах гена *МУН9* мутаций не обнаружено. На рисунке 1 представлена информация о родословной обследованных больных и указано количество тромбоцитов в крови родственников на момент обследования.

Гематологические показатели

При лабораторном обследовании выявили уменьшение количества тромбоцитов и увеличение фракции незрелых тромбоцитов у всех обследованных больных (табл. 1). Кроме того, у пробанда М. был увеличен индекс распределения эритроцитов в сочетании с лимфопенией и нейтрофилезом по сравнению с референсными значениями. У сестры пробанда А. и матери пробанда Ф. выявлено повышенное содержание моноцитов в крови. Таким образом, у обследованных членов семьи обнаружена тромбоцитопения. Помимо пробанда, ее сестры и их матери выраженная тромбоцитопения ($10 \times 10^9/\text{л}$) была обнаружена у новорожденной дочери пробанда и тенденция к тромбоцитопении ($178 \times 10^9/\text{л}$) — у бабушки пробанда, у обеих — без геморрагических проявлений (рис. 1).

Микроскопическое исследование мазков крови

В мазках периферической крови пробанда, ее сестры и матери присутствовали тромбоциты большого и гигантского размеров, от 2 до 20 в каждом из 10 исследованных полей зрения на большом увеличении для каждого мазка (рис. 2А). Клетки лейкоцитарного ряда были представлены нейтрофилами и лимфоцитами, а также единичными моноцитами; количество лейкоцитов — в пределах нормы. В единичных сегментоядерных клетках встречались пенистость и базофилия цитоплазмы, а также светло-голубые цитоплазматические включения веретеновидной или неправильной формы, часто прилегающие к мембране клетки (тельца Деле) (рис. 2 В). Описанные морфологические изменения в сочетании с тромбоцитопенией (табл. 1) и фактом родственной близости трех обследуемых больных соответствовали аномалии Мея — Хегглина, ассоциированной с мутацией гена *МУН9*. Среди эритроцитов преобладали клетки нормального размера двояковогнутой формы с незначительным пойкилоцитозом в виде единичных эхиноцитов и овалоцитов (рис. 2).

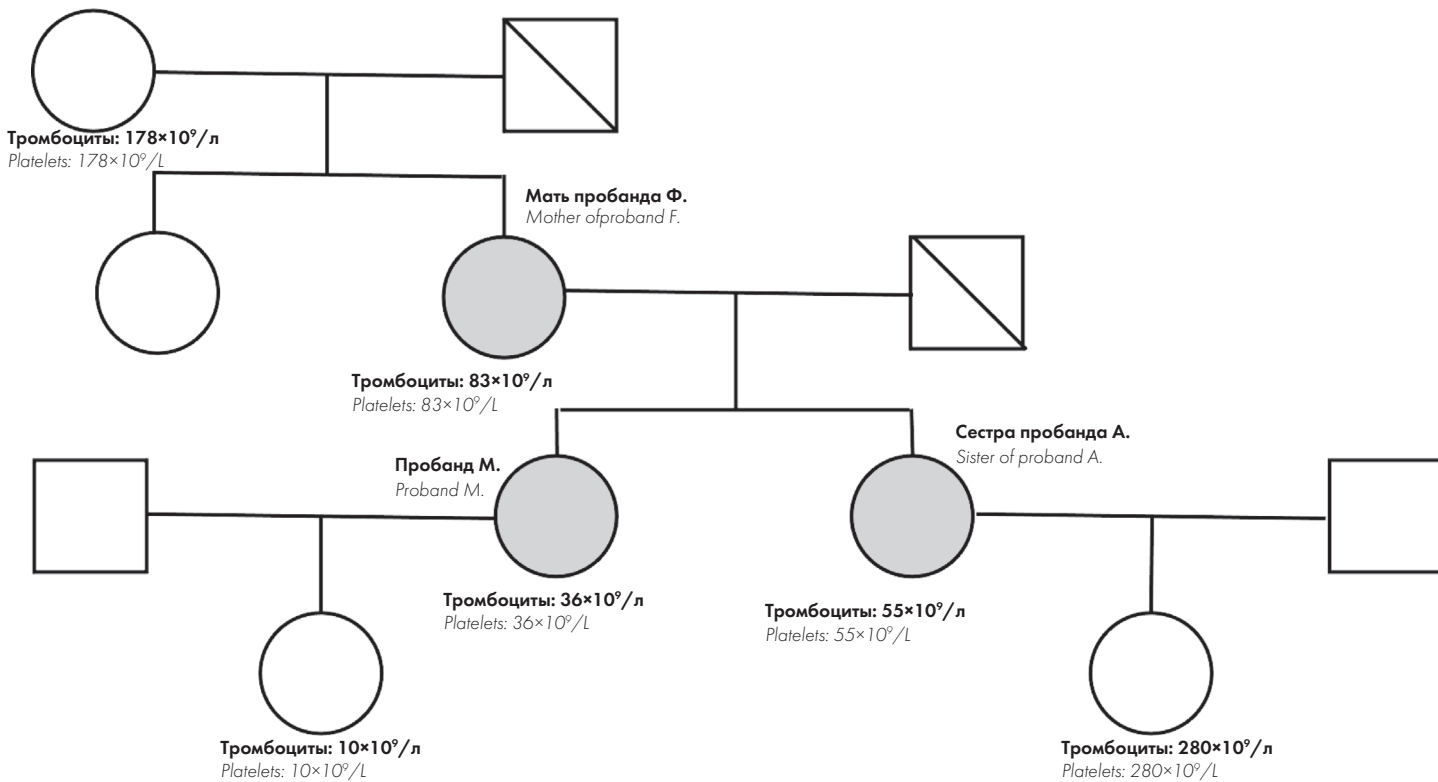


Рисунок 1. Родословная обследованных больных с мутацией гена MYH9 и количество тромбоцитов в крови членов семьи на момент обследования. Серым цветом выделены члены семьи с доказанной мутацией гена MYH9 и макротромбоцитопенией

Figure 1. Pedigree of the patients examined with a mutation in the MYH9 gene and their platelet counts at the time of examination. Highlighted in grey are the family members with a documented MYH9 gene mutation and macrothrombocytopenia

Контракция сгустков крови и показатели гемостаза

Степень контракции сгустков крови у пробанда М. и сестры пробанда А. была снижена, тогда как у матери пробанда Ф. степень контракции была нормальной (табл. 2), что указывало на контрактильную дисфункцию тромбоцитов у пробанда М. и сестры пробанда А. Рутинные параметры гемостаза у всех обследованных больных на момент обследования находились в пределах референсных значений (табл. 2).

Функциональное состояние и реактивность тромбоцитов

По данным проточной цитометрии у всех обследованных больных обнаружена фоновая спонтанная активация тромбоцитов, выявленная по гиперэкспрессии Р-селектина и активного интегрина $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (табл. 3). После инкубации с активатором (пептид TRAP-6), напротив, доля тромбоцитов, экспрессировавших Р-селектин, у пробанда М. и сестры пробанда А. была снижена по сравнению с нормальными значениями для тромбоцитов здоровых доноров (табл. 3). Экспрессия активного интегрина $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ в ответ на стимуляцию также была снижена у сестры пробанда. Эти результаты указывают на хроническую фоновую активацию циркулирующих тромбоцитов в сочетании с их рефрактерностью, т.е. пониженной способностью отвечать на физиологический стимул.

Морфология тромбоцитов

Методом сканирующей электронной микроскопии были изучены тромбоциты пробанда М., сестры пробанда А. и матери пробанда Ф. Во всех исследуемых образцах встречались тромбоциты с гетерогенной морфологией, которую можно разделить на два

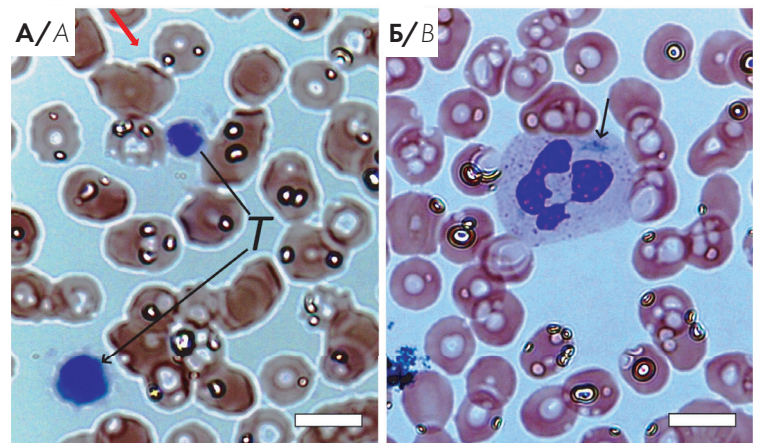


Рисунок 2. Характерные микрофотографии мазка крови больной с мутацией гена MYH9: А — два гигантских тромбоцита (Т) на фоне эритроцитов с легким анизоцитозом и пойкилоцитозом; В — сегментоядерный гранулоцит со светлоголубым веретеновидным цитоплазматическим включением, телом Деле (показано стрелкой). Окраска по Романовскому — Гимзе. Линейки = 6 мкм

Figure 2. Characteristic micrographs of a blood smear from a patient with a MYH9 gene mutation examined here: A — two giant platelets (T) against the background of erythrocytes with slight anisocytosis and poikilocytosis; B — a segmented nuclear granulocyte with a light blue fusiform cytoplasmic inclusion named a Döhle-like body (shown by the arrow). Romanovsky-Giemsa staining. Magnification bars = 6 μm

Таблица 1. Гемограмма у обследованных больных с мутацией гена MYH9
Table 1. Hemogram in the examined patients with a MYH9 gene mutation

Параметры (референсные значения) Parameters (reference values)	Пробанд М Proband M.	Сестра пробанда А. Sister of proband A.	Мать пробанда Ф. Mother of proband F.
Тромбоциты (150–450)×10 ⁹ /л / Platelet count (150–450)×10 ⁹ /l	36	55	83
Фракция незрелых тромбоцитов Immature platelet fraction (1,1–6,1), %	68,9	79,2	40,6
Фракция незрелых тромбоцитов (2,5–17,8)×10 ⁹ /л Immature platelet fraction (2.5–17.8)×10 ⁹ /l	24,8	43,6	33,7
Средний объем тромбоцитов (MPV)* (7,4–10,4), фл Mean platelet volume* (7.4–10.4), fl	19,2	28,0	15,6
Тромбокрит (PCT)* (0,1–0,4), % / Plateletcrit** (0.1–0.4), %	0,07	0,15	0,13
Гематокрит / Hematocrit (35–45), %	35	37	39
Эритроциты (3,7–4,7)×10 ¹² /л / Red blood cell count (3.7–4.7)×10 ¹² /l	4,19	4,21	4,4
Средний объем эритроцитов (80–100), фл Mean corpuscular volume (80–100), fl	82,3	88,1	89,1
Среднее содержание гемоглобина (27–32), пг Mean corpuscular hemoglobin (27–32), pg	28,9	29,0	30,9
Средняя концентрация гемоглобина (32–37), г/дл Mean corpuscular hemoglobin content (32–37), g/dL	35,1	32,9	34,7
Индекс распределения эритроцитов (11,5–14,0), фл RBC distribution width (11.5–14.0), fl	15,3	13,2	12,7
СОЭ (2–30), мм/ч / Erythrocyte sedimentation rate (2–30), mm/h	6	9	21
Лейкоциты (4–9)×10 ⁹ /л / White blood cell (4–9)×10 ⁹ /l	6,34	5,48	7,15
Моноциты, (2–9), % / Monocytes (2–9), %	8	11	10
Моноциты (0,08–0,81)×10 ⁹ /л / Monocytes (0.08–0.81)×10 ⁹ /l	0,5	0,61	0,7
Лимфоциты, (19–37), % / Lymphocytes (19–37), %	14	34	32
Лимфоциты (0,8–3,3)×10 ⁹ /л / Lymphocytes (0.8–3.3)×10 ⁹ /l	0,91	1,88	2,31
Нейтрофилы, (47–72), % / Neutrophils (47–72), %	77	49	52
Нейтрофилы (1,9–6,5)×10 ⁹ /л / Neutrophils (1.9–6.5)×10 ⁹ /l	4,89	2,8	3,88
Эозинофилы, (0–5), % / Eosinophils (0–5), %	0	2	3
Эозинофилы (0,02–0,45)×10 ⁹ /л / Eosinophils (0.02–0.45)×10 ⁹ /l	0,02	0,11	0,18
Базофилы, (0–2), % / Basophils (0–2), %	0	2	1
Базофилы (0,00–0,12)×10 ⁹ /л / Basophils (0.00–0.12)×10 ⁹ /l	0,02	0,08	0,08

Примечание: Жирным шрифтом выделены значения, выходящие за пределы нормы; * рассчитано вручную по размерам тромбоцитов, определенным с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 3 Б).

Note: the bold highlighted values are outside the normal range; * calculated manually based on the platelet sizes measured with scanning electron microscopy (Figure 3 B).

типа: 1) тромбоциты дисковидной формы при отсутствии или наличии одной-двух коротких филоподий (покоящиеся тромбоциты) (рис. 3 А); 2) тромбоциты, утратившие дисковидную форму, с множественными филоподиями (активированные тромбоциты) (рис. 3 Б). Основываясь на этих морфологических критериях, можно отметить, что доля покоящихся и активированных тромбоцитов в образцах существенно отличалась. Наименьшая фракция активированных тромбоцитов среди обследованных больных была у матери пробанда Ф. (23%, $n = 8$), в то время как у пробанда М. и сестры пробанда А. доля активированных тромбоцитов была высокой и составляла 74% ($n = 86$) и 78% ($n = 62$) соответственно ($p < 0,0001$, критерий χ^2). Доли активированных тромбоцитов, определенные на основании морфологических критериев, соответствовали данным, полученным методом проточной цитометрии (табл. 3), и подтверждали по-

вышенную фоновую активацию тромбоцитов у пробанда М. и сестры пробанда А.

Поскольку наряду с тромбоцитопенией одним из характерных проявлений аномалии Мея — Хегглина является макротромбоцитоз, было проведено сравнение среднего диаметра тромбоцитов донора (случайно выбранного из 10 здоровых доноров, использованных для контроля) и обследованных больных по данным сканирующей электронной микроскопии (рис. 3 Б). Все обследованные имели индивидуальные тромбоциты (n), средний размер которых был достоверно больше ($p < 0,0001$), чем у здорового донора ($2,4 \pm 0,3$ мкм, $n = 109$). Самые крупные тромбоциты были в образце сестры пробанда А.: их средний диаметр составлял $3,7 \pm 0,6$ мкм ($n = 70$), в то время как у пробанда он составлял $3,2 \pm 0,5$ мкм ($n = 58$), а у матери пробанда Ф. — $2,9 \pm 0,5$ мкм ($n = 33$). Таким образом, результаты подтвердили данные световой микроскопии клеток крови

Таблица 2. Степень контракции сгустков крови, параметры гемостаза и тромбодинамики у больных с аномалией Мея — Хегглина
Table 2. Degree of contraction of blood clots, parameters of hemostasis and thrombodynamics in patients with May — Hegglin anomaly

Параметры (референсные значения) Parameters (reference values)	Пробанд М. Proband M.	Сестра пробанда А. Sister of proband A.	Мать пробанда Ф. Proband's Mother F.
Степень контракции The final extent of blood clot contraction (42–49), %	33	39	42
Лag период контракции (75–255), сек Lag period of clot contraction (75–255), sec	360	405	225
Площадь под кривой контракции (256–393), отн. ед. Area under the kinetic curve of clot contraction (256–393), a. u.	194	206	310
Средняя скорость контракции (0,034–0,041), %/сек Average velocity of clot contraction (0.034–0.041), %/sec	0,027	0,032	0,034
АЧТВ (25–36), сек / APTT (25–36), sec	27,0	28,5	29,1
Протромбиновое время (9,4–12,5), сек Prothrombin time (9.4–12.5), sec	11,1	11,2	10,2
МНО/INR (0,9–1,5)	0,95	0,96	0,88
Фибриноген (2–5), г/л / Fibrinogen (1.8–3.5), g/l	3,2	3,6	2,9
Стационарная скорость роста сгустка (20–29), мкм/мин Stationary clot growth rate (20–29), μM/min	32,3	34,8	29,4
Начальная скорость роста сгустка (38–56), мкм/мин Initial clot growth rate (38–56), μM/min	49,2	54,8	53,5
Оптическая плотность сгустка (15 000–32 000), усл. ед. Maximum density of the clot (15 000–32 000), a. u.	29788	22874	27436

Примечание: жирным шрифтом выделены значения, выходящие за пределы нормы.

Note: the bold highlighted values are outside the normal range.

Таблица 3. Фоновая и индуцированная экспрессия P-селектина и активного интегрин αIIbβ3 у женщин с аномалией Мея — Хегглина по данным проточной цитометрии

Table 3. Background and induced expression of P-selectin and active αIIbβ3 integrin in women with May-Hegglin anomaly determined with flow cytometry

Члены семьи	Экспрессия активного интегрин αIIbβ3 Expression of active integrin αIIbβ3		Экспрессия P-селектина Expression of P-selectin	
	Покоящиеся тромбоциты (норма < 2%) Resting platelets (reference values < 2%)	Тромбоциты, активированные TRAP (норма > 70%) TRAP-stimulated platelets (reference values > 70%)	Покоящиеся тромбоциты (норма < 2%) Resting platelets (reference values < 2%)	Тромбоциты, активированные TRAP (норма > 70%) TRAP-stimulated platelets (reference values > 70%)
Пробанд М. Proband M.	24%	49%	26%	71%
Сестра пробанда А. Sister of proband A.	14%	62%	36%	64%
Мать пробанда Ф. Mother of proband F.	15%	82%	11%	78%

Примечание: Результаты представлены как фракции тромбоцитов, экспрессирующих активный интегрин αIIbβ3 или P-селектин; жирным шрифтом выделены значения, выходящие за пределы референсных значений.

Note: results are presented as fractions of platelets expressing active integrin αIIbβ3 or P-selectin; the numbers in bold are outside the normal ranges determined in control healthy subjects.

и наличие макротромбоцитоза у больных с мутацией гена *MUN9*.

Ультраструктура тромбоцитов

Методом трансмиссионной электронной микроскопии была изучена ультраструктура тромбоцитов, полученных из крови сестры пробанда А., т.к. у этой больной отклонения по функциональным показателям (табл. 1–3) и по данным сканирующей электронной микроскопии тромбоцитов (рис. 3 Б) были наиболее

выражены. Согласно данным трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 3В, Г), тромбоциты больной были в среднем крупнее ($3,4 \pm 0,6$ мкм, $n = 103$), чем тромбоциты здорового донора ($2,3 \pm 0,5$ мкм, $n = 29$, $p < 0,0001$), что соответствовало результатам сканирующей электронной микроскопии. У большей части тромбоцитов больной наблюдались множественные мембранные выросты (филоподии) при округлой форме тела на срезе (рис. 3 Г). Главной ультраструктурной особенностью тромбоцитов больной были

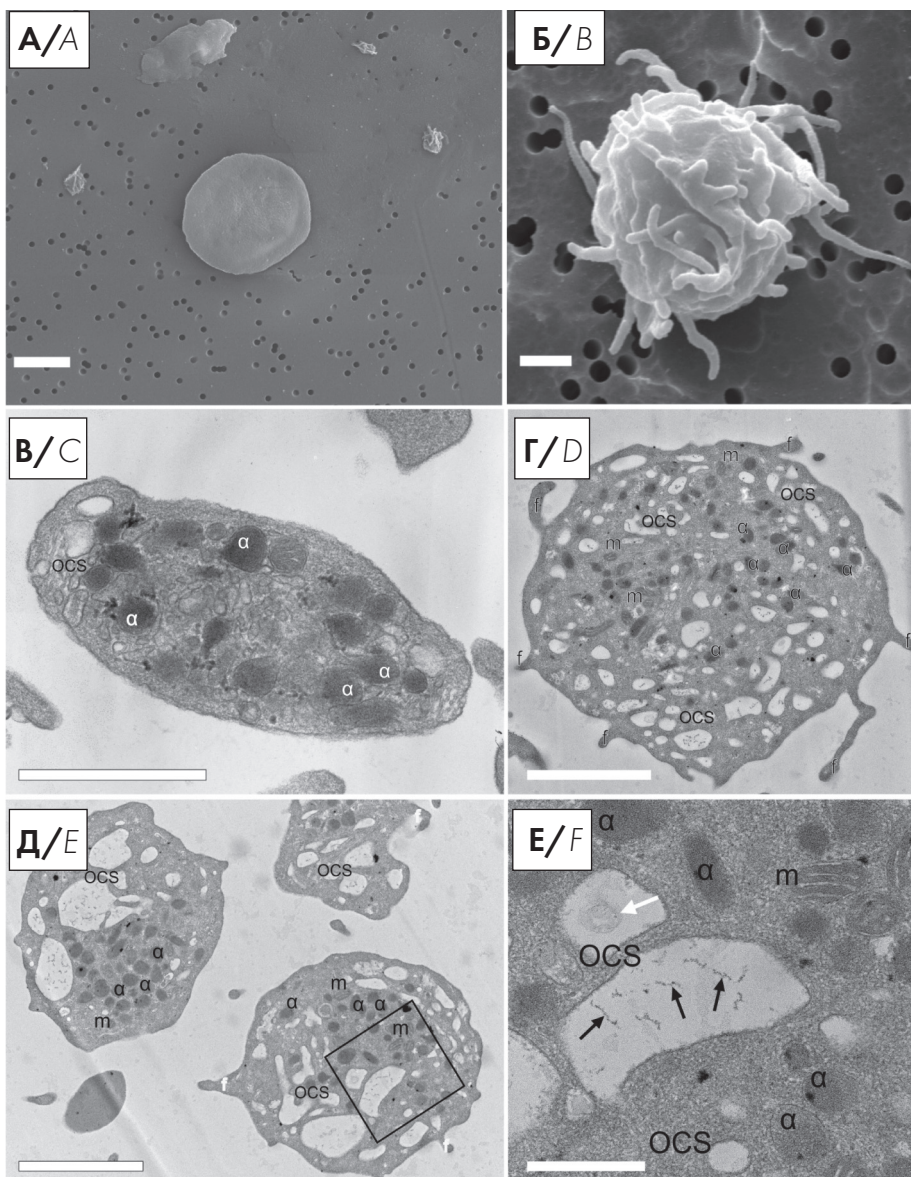


Рисунок 3. Сканирующая (А, Б) и трансмиссионная (В–Е) электронная микроскопия нормальных и патологических тромбоцитов. А, Б — характерные сканирующие электронные микрофотографии тромбоцитов здорового донора (А) и больной с мутацией гена *MYH9* (Б). На электронограмме А типичная морфология нормального покоящегося тромбоцита: нормальный размер, дискоидная форма, отсутствие филоподий. На электронограмме Б типичный тромбоцит больной с морфологическими признаками активации: большой размер, потеря дискоидной формы, образование множественных филоподий. Линейки = 1 мкм; В–Е — репрезентативные трансмиссионные электронные микрофотографии тромбоцитов здорового донора (В) и сестры пробанда с мутацией гена *MYH9* (Г–Е). На электронограмме Е — увеличенная область, отмеченная квадратом на электронограмме Д. Обозначения: α — альфа-гранулы; OCS — открытая канальцевая система; м — митохондрии; ф — филоподии. Черные стрелки на электронограмме Е указывают на нитевидные включения внутри OCS; белая стрелка на электронограмме Е указывает на везикулярную структуру. Линейки: А, Б, В — 1 мкм; Г и Д — 2 мкм, Е — 500 нм

Figure 3. Scanning (A, B) and transmission (C–F) electron microscopy of normal and pathological platelets. (A, B) Representative scanning electron micrographs of platelets from a healthy donor (A) and a patient with a *MYH9* gene mutation (B). Image A: a normal resting platelet characterized by a normal size, discoid shape, and the absence of filopodia. Image B: a typical patient's platelet with morphological signs of activation, namely a large size, loss of the discoid shape, and formation of multiple filopodia. Magnification bars = 1 μm; C–F — representative transmission electron micrographs of platelets from a healthy donor (C) and a sister of a proband with a *MYH9* gene mutation (D–F). Image F comprises an enlarged area marked with a square on the image E. Designations: α — alpha granules; OCS — open tubular system; m — mitochondria; f — filopodia. Black arrows in F indicate threadlike inclusions within the OCS; white arrow at F indicates a vesicular structure. Magnification bars: A — 1 μm; D, E — 2 μm, F — 500 nm

гигантские расширения открытой канальцевой системы (рис. 3 Д), которые содержали включения в виде нитевидных структур и/или мембранных везикул (рис. 3 Е). Подобные фрагментированные нитевидные структуры часто наблюдались во внеклеточном пространстве вокруг тромбоцитов, поэтому разорванные нитевидные структуры в расширенной системе открытых канальцев могут содержать частицы, возможно, происходящие из дезинтегрированного гликокаликса.

Похожие нитевидные структуры неопределенного происхождения в открытой канальцевой системе наблюдались ранее при изучении с помощью сканирующей электронной микроскопии тромбоцитов больной с мутацией R1933X в гене *MYH9* [13]. Органеллы тромбоцитов больной были хорошо различимы (α-гранулы, митохондрии, открытая канальцевая система), целостность плазматической мембраны не нарушена, а плазматическая мембрана гладкая и легко различимая.

Обсуждение

Немышечный миозин IIА, одна из полипептидных цепей которого кодируется геном *MYH9*, относится к суперсемейству белков, которые в комплексе с актином преобразуют энергию гидролиза АТФ в механическое усилие. Миозин IIА является важнейшим моторным белком и основным генератором сократительной силы во многих клетках, в том числе в мегакариоцитах и тромбоцитах [3]. Показано, что при мутациях гена *MYH9* нарушение тромбоцитопоза и развитие макротромбоцитопении прямо связано с дефектом структуры и дисфункцией миозина IIА. При дефектах гена *MYH9* нарушается последний шаг образования тромбоцитов в синусоидах костного мозга — «отшнуровка» участка мегакариоцита, которая происходит за счет комбинации напряжения гемодинамического сдвига и механического сокращения цитоскелета с участием миозина IIА [14, 15].

Описано 49 различных повреждений в 12 экзонах гена *MYH9* [3]. Связь между генетическим дефектом и особенностями фенотипа в виде геморрагического синдрома различной тяжести до сих пор не установлена. Основной вопрос, имеющий как практическое, так и теоретическое значение, состоит в том, каково относительное значение тромбоцитопении и тромбоцитопатии как основных патогенетических механизмов геморрагического синдрома при дефектах гена *MYH9*.

В настоящем исследовании документированного семейного дефекта гена *MYH9*, характерного для аномалии Мея — Хегглина, несмотря на выраженную тромбоцитопению, геморрагических проявлений на момент обследования у больных не было, хотя в анамнезе наблюдались обильные менструации и спонтанные экхимозы на коже. У пробанда и ее сестры развились послеродовые кровотечения, которые были купированы трансфузиями компонентов крови (свежезамороженной плазмы и концентратов тромбоцитов). Эти данные свидетельствуют о предрасположенности больных с аномалией Мея — Хегглина к геморрагическому диатезу, проявления которого варьируют от бессимптомного течения до тяжелых кровотечений.

Основным лабораторным симптомом у всех обследованных больных была тромбоцитопения разной степени выраженности (табл. 1). Этот симптом был основанием для установки пробанду ошибочного первичного диагноза «идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура». При консультации гематолога сомнения в правильности направительного диагноза возникли на основании семейной истории тромбоцитопении и выраженного повышения фракции незрелых тромбоцитов в общем анализе крови у самой больной, ее сестры и матери. При изучении мазков периферической крови были обнаружены макротромбоцитопения и тельца Деле в лейкоцитах, что дало основание заподозрить у членов семьи аномалию Мея — Хегглина.

Этот диагноз подтвердился при молекулярно-генетическом исследовании, которое обнаружило гетерозиготную мутацию С5797Т в 41-м экзоне гена *MYH9*, которая соответствует мутации R1933X в тяжелой цепи миозина IIА. Эта мутация впервые была описана в 2000 г. у членов итальянской семьи с клиническими проявлениями, ранее известными как аномалия Мея — Хегглина [16].

Критерии дифференциальной диагностики болезней, ассоциированных с мутациями гена *MYH9*, описаны ранее [3]. В описываемой в настоящей работе семье синдрома Фехтнера и Эпштейна были исключены из-за отсутствия характерных клинических проявлений, таких как нефрит, глухота и катаракта. Диагноз «аномалия Мея — Хегглина» трудно дифференцировать со схожим, но гораздо более редким синдромом Себастьяна. Потенциально их можно различить при трансмиссионной электронной микроскопии лейкоцитов по различиям диаметра телец Деле [2], однако по всем остальным лабораторным и клиническим показателям аномалия Мея — Хегглина и синдром Себастьяна очень похожи и их дифференцировка не имеет практического значения. В подавляющем большинстве случаев больные с дефектами гена *MYH9*, включая аномалию Мея — Хегглина, не нуждаются в специализированной гемостатической терапии. Переливание концентратов тромбоцитов требуется только во время хирургического вмешательства при развитии тяжелого геморрагического синдрома. Помимо трансфузии гемостатических препаратов, у этих больных рекомендуют применять десмопрессин для увеличения выработки фактора фон Виллебранда [8].

Поскольку ген *MYH9* кодирует тяжелую цепь миозина IIа, который в комплексе с актином осуществляет перестройку цитоскелета, возможно, что дефект *MYH9* вызывает контракильную, т.е. механическую сократительную дисфункцию тромбоцитов [17]. В свою очередь, неспособность тромбоцитов к полноценному сокращению может вызывать нарушение контракции сгустков крови, необходимой для уплотнения сгустка и полноценного гемостаза [18]. Полученные данные указывают на умеренное снижение степени контракции сгустков крови у больных с мутацией гена *MYH9* (табл. 1), однако трудно определить, является ли этот дефект следствием тромбоцитопении или следствием нарушения сократительной (контракильной) функции тромбоцитов. В сочетании с данными об отчетливых качественных изменениях тромбоцитов, как функциональных (табл. 2, 3), так и структурных (рис. 3), есть веские основания связывать нарушения контракции сгустков крови при дефектах *MYH9* с истинной дисфункцией тромбоцитов. Независимо от причин, нарушенная контракция сгустков крови может быть

одним из важных механизмов нарушений гемостаза и склонности к кровоточивости при заболеваниях, ассоциированных с мутацией гена *МУН9*.

Функциональное состояние генетически нормальных тромбоцитов может быть нарушено вследствие хронической гиперактивации тромбоцитов в кровотоке, их истощения и вторичной дисфункции, включая снижение сократительного потенциала [19–21]. В настоящем исследовании при проточной цитометрии выявили фоновую активацию нестимулированных тромбоцитов, оцененную по повышенной экспрессии Р-селектина и активного интегрина $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (табл. 3). После стимуляции рецепторов PAR1 доля тромбоцитов, экспрессировавших Р-селектин, у пробанда и ее сестры была, напротив, снижена по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствовало о частичной рефрактерности тромбоцитов, которая, в дополнение к тромбоцитопении, может быть еще одним механизмом нарушения тромбоцитарного компонента гемостаза и геморрагического диатеза при аномалии Мея — Хегглина. Рефрактерность тромбоцитов представляет собой снижение реактивности тромбоцитов в ответ на биохимические стимулы. Данные проточной цитометрии совпадали с морфологическими характеристиками, которые указывали на повышенную фоновую активацию тромбоцитов у пробанда М. и сестры пробанда А. (рис. 3). В совокупности эти данные подтверждают, что уменьшение контракции сгустков крови у обследованных больных может быть одним из проявлений тромбоцитопатии, а не только и не столько следствием тромбоцитопении.

Помимо других тромбоцитопений, ассоциированных с мутациями гена *МУН9*, аномалию Мея — Хегглина следует дифференцировать с ИТП. Среди дифференциально-диагностических признаков наиболее важными являются увеличение размеров тромбоцитов в мазке периферической крови, а также наличие телец Деле в лейкоцитах. Характерно, что пробанда и ее родственникам изначально устанавливали диагноз ИТП, причем сестре пробанда в возрасте 24-х лет дважды провели курс пероральными глюкокортикостероидами и, не получив эффекта, выполнили спленэктомию. Сходные ситуации описаны в литературе, когда больным с мутациями гена *МУН9* изначально устанавливали диагноз ИТП и лечили соответственно [13]. Чаще всего это происходит, когда была неизвестна семейная история или у больного обнаруживали только тромбоцитопению без других, негематологических симптомов. С целью дифференциальной диагностики заболевания, связанного с мутацией гена *МУН9*, важно, чтобы у больных с подозрением на ИТП проводили микроскопию мазка периферической крови и принимали во внимание показатели гемограммы — средний объем тромбоцитов (mean platelet volume — MPV), фракцию крупных тромбоцитов (platelet large cell

ratio — P-LCR) и индекс распределения тромбоцитов (platelet distribution width — PDW). При наследственных макротромбоцитопениях часто эти аномальные показатели не могут быть определены автоматическим анализатором. Отсутствие нормализации количества тромбоцитов в результате терапии глюкокортикостероидами и/или после спленэктомии также должно потребовать пересмотра диагноза ИТП.

Фракция незрелых (ретикулярных) тромбоцитов (IPF — immature platelet fraction), образованная тромбоцитами с повышенным содержанием РНК, является важным дифференциально-диагностическим критерием, который характеризует интенсивность тромбоцитопоза и позволяет различить тромбоцитопении, вызванные нарушением образования тромбоцитов в костном мозге, и тромбоцитопении, обусловленные повышенным разрушением/потреблением тромбоцитов. Значительное превышение показателя IPF наблюдается при врожденных макротромбоцитопениях, особенно при аномалии Мея — Хегглина [22]. Показатель IPF был в 5 раз выше у больных с макротромбоцитопенией, ассоциированной с мутацией гена *МУН9* (48,6%), и примерно в 2 раза выше у больных с другими макротромбоцитопениями (18,4%) по сравнению со случаями ИТП при сходном количестве тромбоцитов в крови (9,2%).

Таким образом, описан семейный случай мутации гена *МУН9* по типу аномалии Мея — Хегглина. Это состояние характеризуется макротромбоцитопенией и ассоциируется со склонностью к геморрагиям, однако не ясно, какова относительная роль тромбоцитопении и тромбоцитопатии в патогенезе кровоточивости при данной патологии. Результаты исследования показывают, что у больных с гетерозиготной мутацией C5797T (R1933X) гена *МУН9* геморрагические проявления ассоциированы не только с тромбоцитопенией, но и с качественными структурно-функциональными дефектами тромбоцитов. Эти дефекты проявляются фоновой активацией тромбоцитов, которая парадоксальным образом сочетается с частичной их рефрактерностью, проявляющейся снижением реактивности в ответ на стимул, и контрактальной дисфункцией тромбоцитов, что может способствовать формированию неполноценных гемостатических сгустков и способствовать кровоточивости. Учитывая клиническое сходство патологических состояний, обусловленных мутациями гена *МУН9*, и приобретенных тромбоцитопений, для дифференциальной диагностики этих заболеваний необходимы тщательный сбор семейного анамнеза для установления наследственного характера тромбоцитопении и геморрагического синдрома, микроскопическое исследование мазка периферической крови и молекулярно-генетическое исследование гена *МУН9* для выявления характерных мутаций.

Литература

1. Handin R.I. Inherited Platelet Disorders. ASH Education Book. 2005; 2005: 1396–402.
2. Heath K.E., Campos-Barros A., Toren A., et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-Like syndromes. *Am J Hum Genet.* 2001; 69: 1033–45. DOI: 10.1086/324267.
3. Asensio-Juárez G., Llorente-González C., Vicente-Manzanares M. Linking the landscape of MYH9-related diseases to the molecular mechanisms that control non-muscle myosin II-A function in cells. *Cells.* 2020; 9(6); 1458. DOI: 10.3390/cells9061458.
4. Seri M., Pecci A., Di Bari F., et al. MYH9-related disease May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore).* 2003; 82: 203–15. DOI: 10.1097/01.md.0000076006.64510.5c.
5. Pecci A., Panza E., Pujol-Moix N., et al. Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum Mutat.* 2008; 29: 409–17. DOI: 10.1002/humu.20661.
6. Pecci A., Ma X., Savoia A., Adelstein R.S. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. *Gene.* 2018; 664: 152–67. DOI: 10.1016/j.gene.2018.04.048.
7. Savoia A., De Rocco D., Pecci A. MYH9 gene mutations associated with bleeding. *Platelets.* 2017; 28(3): 312–5. DOI: 10.1080/09537104.2017.1294250.
8. Althaus K., Greinacher A. MYH-9 related platelet disorders: Strategies for management and diagnosis. *Transfus Med Hemother.* 2010; 37(5): 260–7. DOI: 10.1159/000320335.
9. Pecci A., Klersy C., Gresele P., et al. MYH9-related disease: A novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2014; 35(2): 236–47. DOI: 10.1002/humu.22476.
10. Ложкин А.П., Пешкова А.Д., Атауллаханов Ф.И., Литвинов Р.И. Разработка и применение нового метода контракции (ретракции) сгустка крови. *Гены и клетки.* 2014; 3: 99–104. DOI: 10.23868/gc120329.
11. Пешкова А.Д., Ложкин А.П., Фатхуллина Л.С. и др. Зависимость контракции (ретракции) сгустка от молекулярного и клеточного состава крови. *Казанский медицинский журнал.* 2016; 97(1): 70–7. DOI: 10.17750/KMJ2016-70.
12. Сунцова М.П., Калинина М.Е., Аксенова А.Ю. и др. Наследственная тромбоцитопения, ассоциированная с мутацией в гене MYH9. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2017; 1: 40–8. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-40-48.
13. Sung C.C., Lin S.H., Chao T.K., Chen Y.C. R1933X mutation in the MYH9 gene in May-Hegglin anomaly mimicking idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Formos Med Assoc.* 2014; 113(1): 56–9. DOI: 10.1016/j.jfma.2012.07.024.
14. Jiang J., Woulfe D.S., Papoutsakis, E.T. Shear enhances thrombopoiesis and formation of microparticles that induce megakaryocytic differentiation of stem cells. *Blood.* 2014; 124(13): 2094–103. DOI: 10.1182/blood-2014-01-547927.
15. Eckly A., Strassel C., Freund M., et al. Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood.* 2009; 113(14): 3182–9. DOI: 10.1182/blood-2008-06-164061.
16. Pecci A., Canobbio I., Balduini A., et al. Pathogenetic mechanisms of hematological abnormalities of patients with MYH9 mutations. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(21): 3169–78. DOI: 10.1093/hmg/ddi344.
17. Baumann J., Sachs L., Oliver O., et al. Reduced platelet forces underlie impaired hemostasis in mouse models of MYH9-related disease. *Sci Adv.* 2022; 8(20): eabn2627. DOI: 10.1126/sciadv.abn2627.

References

1. Handin R.I. Inherited Platelet Disorders. ASH Education Book. 2005; 2005: 1396–402.
2. Heath K.E., Campos-Barros A., Toren A., et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-Like syndromes. *Am J Hum Genet.* 2001; 69: 1033–45. DOI: 10.1086/324267.
3. Asensio-Juárez G., Llorente-González C., Vicente-Manzanares M. Linking the landscape of MYH9-related diseases to the molecular mechanisms that control non-muscle myosin II-A function in cells. *Cells.* 2020; 9(6); 1458. DOI: 10.3390/cells9061458.
4. Seri M., Pecci A., Di Bari F., et al. MYH9-related disease May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore).* 2003; 82: 203–15. DOI: 10.1097/01.md.0000076006.64510.5c.
5. Pecci A., Panza E., Pujol-Moix N., et al. Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum Mutat.* 2008; 29: 409–17. DOI: 10.1002/humu.20661.
6. Pecci A., Ma X., Savoia A., Adelstein R.S. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. *Gene.* 2018; 664: 152–67. DOI: 10.1016/j.gene.2018.04.048.
7. Savoia A., De Rocco D., Pecci A. MYH9 gene mutations associated with bleeding. *Platelets.* 2017; 28(3): 312–5. DOI: 10.1080/09537104.2017.1294250.
8. Althaus K., Greinacher A. MYH-9 related platelet disorders: Strategies for management and diagnosis. *Transfus Med Hemother.* 2010; 37(5): 260–7. DOI: 10.1159/000320335.
9. Pecci A., Klersy C., Gresele P., et al. MYH9-related disease: A novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2014; 35(2): 236–47. DOI: 10.1002/humu.22476.
10. Lozhkin A.P., Peshkova A.D., Ataullakhanov F.I., Litvinov R.I. Development and application of a new method of contraction (retraction) of a blood clot. *Geny i Kletki.* 2014; 3: 99–104 (In Russian). DOI: 10.23868/gc120329.
11. Peshkova A.D., Lozhkin A.P., Fatkhullina L.S., et al. Dependence of contraction (retraction) of a clot on the molecular and cellular composition of blood. *Kazanskij medicinskij zhurnal.* 2016; 97(1): 70–7 (In Russian). DOI: 10.17750/KMJ2016-70.
12. Suntsova M.P., Kalina M.E., Aksanova A.Yu. Hereditary thrombocytopenia associated with a mutation in the MYH9 gene. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii.* 2017; 1: 40–8 (In Russian). DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-40-48.
13. Sung C.C., Lin S.H., Chao T.K., Chen Y.C. R1933X mutation in the MYH9 gene in May-Hegglin anomaly mimicking idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Formos Med Assoc.* 2014; 113(1): 56–9. DOI: 10.1016/j.jfma.2012.07.024.
14. Jiang J., Woulfe D.S., Papoutsakis, E.T. Shear enhances thrombopoiesis and formation of microparticles that induce megakaryocytic differentiation of stem cells. *Blood.* 2014; 124(13): 2094–103. DOI: 10.1182/blood-2014-01-547927.
15. Eckly A., Strassel C., Freund M., et al. Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood.* 2009; 113(14): 3182–9. DOI: 10.1182/blood-2008-06-164061.
16. Pecci A., Canobbio I., Balduini A., et al. Pathogenetic mechanisms of hematological abnormalities of patients with MYH9 mutations. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(21): 3169–78. DOI: 10.1093/hmg/ddi344.
17. Baumann J., Sachs L., Oliver O., et al. Reduced platelet forces underlie impaired hemostasis in mouse models of MYH9-related disease. *Sci Adv.* 2022; 8(20): eabn2627. DOI: 10.1126/sciadv.abn2627.

18. Литвинов Р.И., Пешкова А.Д. Контракция (ретракция) сгустков крови и тромбов: патогенетическое и клиническое значение. Альманах клинической медицины. 2018; 46(7): 662–71. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-662-671.

19. Peshkova A.D., Malyasyov D.V., Bredikhin R.A., et al. Reduced contraction of blood clots in patients with venous thromboembolism is a possible thrombogenic and embologenic mechanism. TH Open. 2018; 2(1): 104–15. DOI: 10.1055/s-0038-1635572.

20. Minh G. Le, Peshkova A.D., Andrianova I.A., et al. Impaired contraction of blood clots is a novel prothrombotic mechanism in systemic lupus erythematosus. Clin Sci. 2018; 132(2): 243–54. DOI: 10.1042/CS20171510.

21. Peshkova A.D., Safiullina S.I., Evtugina N.G., et al. Premorbid hemostasis in women with a history of pregnancy loss. Thromb Haemost. 2019; 119(12): 1994–2004. DOI: 10.1055/s-0039-1696972.

22. Miyazaki K., Koike Y., Kunishima S., et al. Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. Hematology. 2015; 20(10): 587–92. DOI: 10.1179/1607845415Y.0000000021.

Информация об авторах

Сафиуллина Светлана Ильдаровна*, кандидат медицинских наук, доцент кафедры внутренних болезней Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»; гематолог медицинского центра «Айболит»,
e-mail: svetlana.ild.safiullina@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4657-0140>

Евтюгина Наталья Геннадьевна, аспирант кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»,
e-mail: natalja.evtugyna@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4950-3691>

Хисматуллин Рафаэль Рафикович, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры морфологии и общей патологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»,
e-mail: rafael.khismatullin@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8597-811X>

Кравцова Ольга Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»,
e-mail: okravz@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4227-008X>

Хабирова Алина Ильшатовна, младший научный сотрудник Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»,
e-mail: alina.urussu.95@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7243-8832>

18. Litvinov R.I., Peshkova A.D. Contraction (retraction) of blood clots and thrombi: pathogenetic and clinical significance. Al'manah klinicheskoy meditsiny. 2018; 46(7): 662–71 (In Russian). DOI:10.18786/2072-0505-2018-46-7-662-671.

19. Peshkova A.D., Malyasyov D.V., Bredikhin R.A., et al. Reduced contraction of blood clots in patients with venous thromboembolism is a possible thrombogenic and embologenic mechanism. TH Open. 2018; 2(1): 104–15. DOI: 10.1055/s-0038-1635572.

20. Minh G. Le, Peshkova A.D., Andrianova I. A., et al. Impaired contraction of blood clots is a novel prothrombotic mechanism in systemic lupus erythematosus. Clin Sci. 2018; 132(2): 243–54. DOI: 10.1042/CS20171510.

21. Peshkova A.D., Safiullina S.I., Evtugina N.G., et al. Premorbid hemostasis in women with a history of pregnancy loss. Thromb Haemost. 2019; 119(12): 1994–2004. DOI: 10.1055/s-0039-1696972.

22. Miyazaki K., Koike Y., Kunishima S., et al. Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. Hematology. 2015; 20(10): 587–92. DOI: 10.1179/1607845415Y.0000000021.

Information about the authors

Svetlana I. Safiullina*, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Internal Diseases of the Institute of Fundamental Medicine and Biology of the Kazan Federal University; hematologist, Medical Center “Aibolit”,
e-mail: svetlana.ild.safiullina@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4657-0140>

Natalia G. Evtugina, Postgraduate student, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University,
e-mail: natalja.evtugyna@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4950-3691>

Rafael R. Khismatullin, Cand. Sci. (Med.), Senior Lecturer of the Department of Morphology and General Pathology of the Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University,
e-mail: rafael.khismatullin@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8597-811X>

Olga A. Kravtsova, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor of the Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology of the Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University,
e-mail: okravz@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4227-008X>

Alina I. Khabirova, junior researcher, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University
e-mail: alina.urussu.95@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7243-8832>

Андрианова Изабелла Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»,
e-mail: izabella2d@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3973-3183>

Даминова Амина Галеевна, кандидат биологических наук, главный инженер проекта Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»,
e-mail: daminova.ag@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7672-4430>

Пешкова Алина Дмитриевна кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»,
e-mail: alinapeshkova26@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8790-1818>

Литвинов Рустем Игоревич, доктор медицинских наук, профессор, старший исследователь Отдела клеточной биологии и биологии развития медицинского факультета Пенсильванского университета,
e-mail: rustempa@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0643-1496>

* Автор, ответственный за переписку

Поступила: 21.05.2023

Принята к печати: 18.09.2023

Izabella A. Andrianova, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University,
e-mail: izabella2d@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3973-3183>

Amina G. Daminova, Cand. Sci. (Biol.), Chief Project Engineer, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University,
e-mail: daminova.ag@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7672-4430>

Alina D. Peshkova, Cand. Sci. (Biol.), Senior Lecturer, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University,
e-mail: alinapeshkova26@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8790-1818>

Rustem I. Litvinov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Senior Researcher, Department of Cell and Developmental Biology, University of Pennsylvania School of Medicine,
e-mail: rustempa@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0643-1496>

* Corresponding author

Received 21 May 2023

Accepted 18 Sep 2023