

## Тромбоциты и гемостаз

М.А. Пантелеев<sup>1-5</sup>, А.Н. Свешникова<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва;

<sup>2</sup>ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва;

<sup>3</sup>физический факультет ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

<sup>4</sup>ФГБУ ГНЦ Минздрава России, Москва;

<sup>5</sup>ООО «ГемаКор», Москва

**Контакты:** Михаил Александрович Пантелеев [mapanteleev@yandex.ru](mailto:mapanteleev@yandex.ru)

Тромбоциты представляют собой безъядерные клеточные фрагменты, играющие важную роль в гемостазе, остановке кровотечения при повреждении, а также в патологическом тромбообразовании. Главным способом выполнения своей функции у тромбоцитов является формирование агрегатов, перекрывающих место повреждения. Способность к агрегации они получают в результате переходного процесса, называемого активацией. Несмотря на относительно простую и однозначную функцию, устройство тромбоцитов весьма сложно: они имеют почти полноценный набор органелл, включая эндоплазматический ретикулум, митохондрии и другие образования; при активации тромбоциты секретируют разнообразные гранулы и вступают во взаимодействия с белками плазмы и клеток крови и других тканей; сама их активация управляется многочисленными рецепторами и сложными сигнальными каскадами. В настоящем обзоре мы рассмотрим устройство тромбоцита, механизмы его функционирования в норме и патологии, методы диагностики нарушений функции тромбоцитов и подходы к их коррекции. Особое внимание будет уделено тем областям науки о тромбоцитах, где до сих пор таятся загадки.

**Ключевые слова:** структура тромбоцитов, функция тромбоцитов

### Platelets and hemostasis

M.A. Pantelev<sup>1-5</sup>, A.N. Sveshnikova<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Theoretical Problems Center of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow;

<sup>2</sup>Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow;

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Moscow;

<sup>4</sup>Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia, Moscow;

<sup>5</sup>HemaCore Company, Moscow

Platelets are anuclear cell fragments playing important role in hemostasis, termination of bleeding after damage, as well as in pathological thrombus formation. The main action of platelets is the formation of aggregates, overlapping the injury. They obtained the ability to aggregate by the transition process called activation. Despite the relatively simple and definite function platelet structure is very difficult: they have almost a full set of organelles, including the endoplasmic reticulum, mitochondria and other entities. When activated platelets secrete various granules interact with plasma proteins and red blood cells and other tissues. Their activation is controlled by multiple receptors and complex signaling cascades. In this review platelet structure, mechanisms of its functioning in health and disease, diagnostic methods of platelet function and approaches to their correction were considered. Particular attention will be given to those areas of the science of platelets, which still lay hidden mysteries.

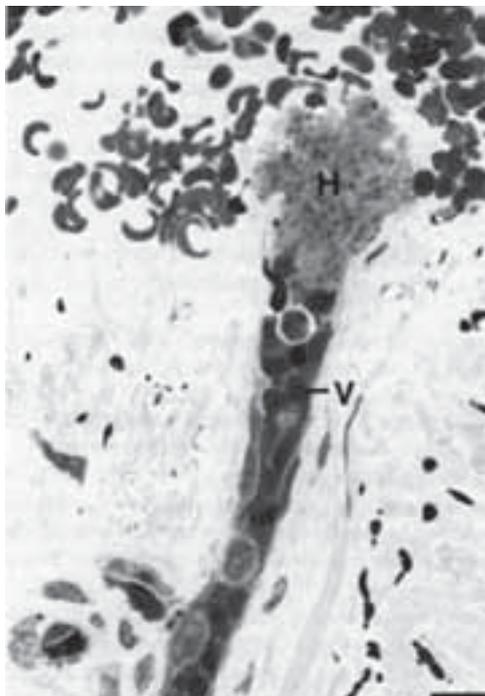
**Key words:** platelet structure, platelet function

### Введение

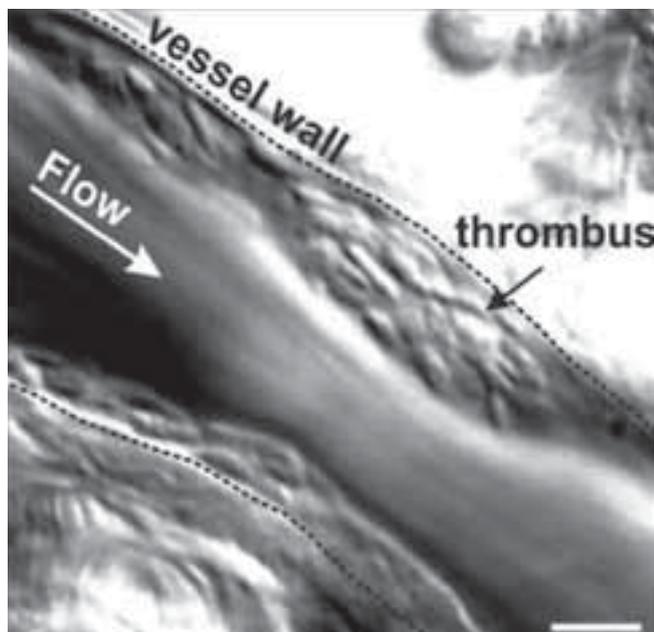
Тромбоциты представляют собой маленькие, 2–4 микрометра диаметром, безъядерные клеточные фрагменты (хотя иногда их называют клетками), циркулирующие в кровотоке в концентрации 200–400 тыс. на микролитр и отвечающие за ключевые этапы процесса остановки кровотечения — гемостаза. В случае ранения они способны прикрепляться к поврежденным тканям и друг к другу, формируя тромбоцитарную пробку-агрегат (рис. 1), прекращающую потерю крови и препятствующую попаданию микробов в систему кровообращения. Это не единственный механизм гемостаза, но крайне важный. Наследственные и приобретенные нарушения функции тромбоцитов, такие

как тромбастения Гланцмана или иммунная тромбоцитопения, являются тяжелыми заболеваниями, для которых характерны опасные кровотечения. Тромбоциты принимают активное участие и в других составляющих механизма гемостаза: одни секретируемые ими вещества вызывают локальную вазоконстрикцию, а другие — ускоряют реакции свертывания крови.

С другой стороны, избыточная функция или количество тромбоцитов, или иные нарушения в сердечно-сосудистой системе могут приводить к формированию тромбоцитарных агрегатов не вне, а внутри сосуда — тромбов (рис. 2). Тромбоцитарные тромбы могут образовываться в самых разных ситуациях и играют центральную роль в таких патологических состо-



**Рис. 1.** Гемостатический агрегат, формируемый тромбоцитами в артериоле собаки. Наблюдаемая под световым микроскопом картина тромбоцитарной пробки (H), перекрывающая разорванный сосуд (V). Биопсия произведена через 3 мин после ранения. Многочисленные эритроциты в верхней части снимка располагаются в просвете раны, тянущейся слева направо. Шкала размера в правом нижнем углу соответствует 10 микрометрам. Воспроизведено из [1]



**Рис. 2.** Формирование тромба в артериоле. Интравитальная ДИК-микроскопия тромбообразования в сосуде крысы, поврежденном посредством фотоактивации красителя бенгальский розовый. Тромб на сосудистой стенке, покрывающий место повреждения, указан в правой верхней части снимка. В нем можно различить отдельные тромбоциты и заметить, что они сохраняют дисковидную форму на первых этапах прикрепления. Направление потока указано стрелкой. Шкала масштаба соответствует 5 микрометрам. Воспроизведено из [2]

ниях, как инфаркты и инсульты. Таким образом, они отвечают за львиную долю смертности и инвалидности в современном мире, а противотромбоцитарные препараты, такие как клопидогрел, занимают почетные места в списке наиболее продаваемых лекарств на планете.

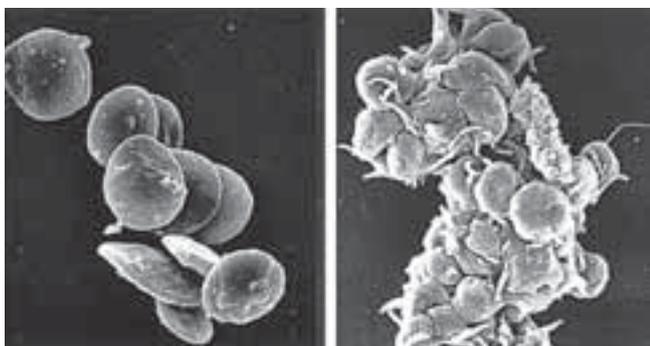
Тромбоциты во многих отношениях устроены просто: у них нет ядра, нет или практически нет синтеза белка, они не могут расти или делиться. Задача тромбоцита – приклеиться к месту повреждения – тоже выглядит простой и однозначной по сравнению с задачами практически любой иной клетки. Но на практике оказывается, что эта простота обманчива. Для выполнения своей функции они должны активироваться в процессе, который управляется добрым десятком активаторов, действующих через многочисленные рецепторы. Сеть сигнальных путей в тромбоците, управляющих его ответом, является сложной и плохо изученной. Сам по себе ответ тромбоцита представляет собой не простое «приклеивание», а включает десятки функций, начиная от первичной адгезии и заканчивая везикуляцией.

Кроме фундаментальных сложностей, тромбоциты таят в себе немало практических загадок: в настоящий момент в руках врачей нет ни сколько-нибудь адекватного теста для оценки функции тромбоцитов, ни действенного инструмента ее улучшения. Несмотря на огромный прогресс, достигнутый в конце XX века в связи с разработкой лекарственных препаратов-антагонистов гликопротеина P<sub>2</sub>U<sub>12</sub> и рецептора P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>, подавление активности тромбоцитов в целях борьбы с тромбозами все еще не является решенной проблемой. Наконец, сейчас разворачивается интенсивное исследование роли тромбоцитов за пределами гемостаза – в ангиогенезе, иммунитете и других системах.

Как клинические, так и биологические исследования тромбоцитов привлекают огромный интерес специалистов во всем мире. Практически каждый год приносит нам новые открытия, и представления о важнейших процессах буквально за последние годы претерпели радикальные изменения. В настоящем обзоре мы постараемся сосредоточиться на фундаментальных представлениях о тромбоците и рассказать о последних достижениях в понимании его функционирования. Тем, кто желает ближе познакомиться с разными аспектами жизни этой удивительной клетки, можно порекомендовать основополагающий учебник А.В. Мазурова [3]. Владеющие английским языком найдут ценную информацию в учебнике-справочнике Platelets под редакцией Алана Майкельсона [4], который регулярно переиздается.

### Строение тромбоцита

В исходном, неактивированном виде тромбоциты напоминают двояковыпуклые «тарелочки» (рис. 3, слева). Благодаря своему маленькому размеру (2–4 микрона в диаметре) они свободно проходят через капилляры,



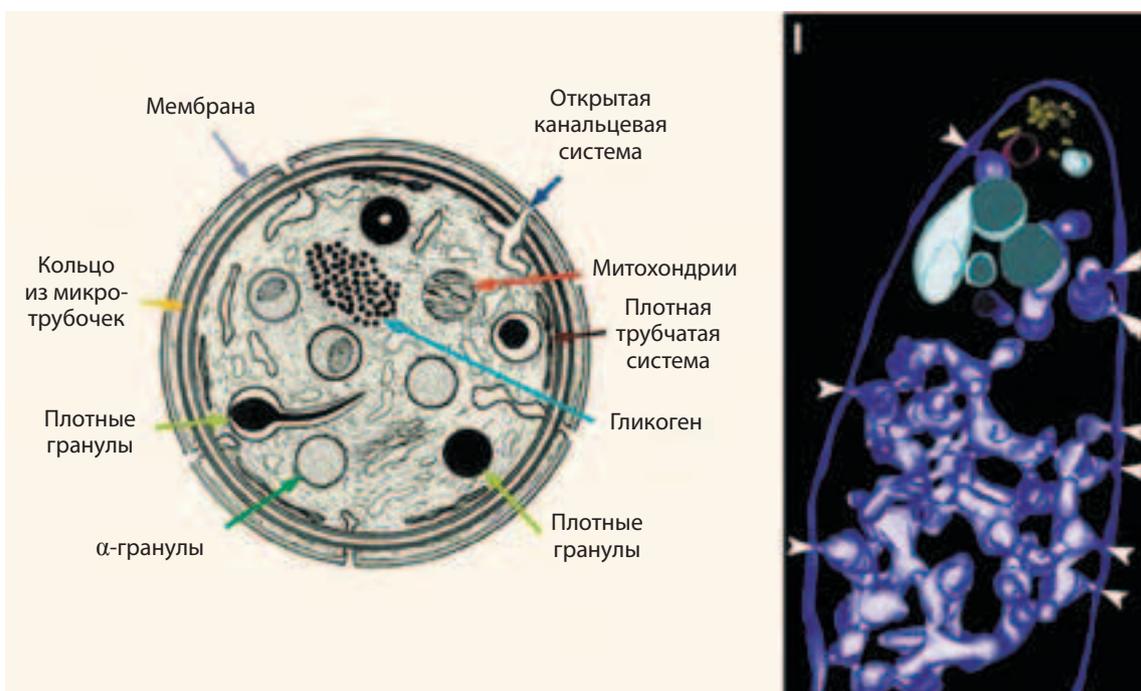
**Рис. 3.** Тромбоциты. Электронная микрофотография неактивированных тромбоцитов, сохраняющих дисковидную форму (слева), и активированных АДФ тромбоцитов в агрегате (справа). Воспроизведено из [5]

так что их форма постоянна, в отличие от вынужденных протискиваться через капилляры эритроцитов. Только при активации форма тромбоцита меняется, становясь в большинстве случаев амёбовидной (рис. 3, справа). Форма тромбоцита поддерживается как спектриновым цитоскелетом, придающим их оболочке упругость, так и кольцом из тубулиновых микротрубочек (рис. 4), которое разрушается при активации. Цитоплазма клетки содержит многочисленные гранулы, главными из которых являются плотные гранулы, содержащие преимущественно низкомолекулярные вещества, такие как серотонин и аденозиндифосфат (АДФ), и альфа-гранулы, содержащие белки – фибриноген, тромбоспондин, Р-селектин, фактор свертывания V, фактор фон Виллебранда и многие другие [8]. Содержимое этих гранул секретируется при актива-

ции. Важно отметить, что форма тромбоцита во многих отношениях является иллюзорной. Его внутренняя среда на самом деле представляет собой сплошную «губку», сеть мембранных каналов, которая служит дополнительным источником мембранной поверхности при активации и способствует секреции гранул [7].

Способность к активации – быстрому и в большинстве случаев необратимому переходу в некое новое состояние – является главным качеством тромбоцита. Стимулом активации может служить практически любое значительное возмущение окружающей среды, вплоть до простого механического напряжения. Однако основными физиологическими активаторами тромбоцитов считаются: 1) коллаген – главный белок внеклеточного матрикса; 2) тромбин – сериновая протеиназа, центральный фермент плазменной системы свертывания; 3) АДФ – адениновый нуклеотид, который выделяется из разрушенных клеток сосуда или секретируется плотными гранулами самих тромбоцитов; 4) тромбоксан А2 – липид из класса эйкозаноидов, синтезируемый и выделяемый тромбоцитами.

Действие каждого из тромбоцитарных активаторов опосредуется через специализированные рецепторы в мембране тромбоцита. Так, коллаген активирует тромбоциты через гликопротеин VI, тромбин имеет 2 главных протеиназ-активируемых рецептора PAR1 и PAR4, действие АДФ происходит через пуринорецепторы P2Y1 и P2Y12. Стимуляция любого из рецепторов ведет к активации сложной сети каскадов внутриклеточной сигнализации, которые управляют ответом клетки; причем разные рецепторы в целом запускают разные пути.



**Рис. 4.** Структура тромбоцита. На схеме слева можно различить основные элементы структуры тромбоцита, наблюдаемые под электронным микроскопом. Воспроизведено из [6]. Справа показана трехмерная реконструкция внутренностей тромбоцита по данным электронной томографии. Обратите внимание, что показанная синим каналикулярная система занимает огромную долю объема клетки. Воспроизведено из [7]

Активация тромбоцитов внешне проявляется многочисленными внутренними перестройками и изменениями свойств, основными среди которых считаются: 1) изменение формы на амёбовидную, для части тромбоцитов – сферическую [9]; 2) усиление способности к адгезии – прикреплению к месту повреждения [10]; 3) появление способности к агрегации – прикреплению к другим тромбоцитам с целью формирования полноценной пробки; 4) секреция описанных выше многочисленных низко- и высокомолекулярных соединений из плотных гранул, альфа-гранул и других источников; 5) экспонирование прокоагулянтной мембраны.

Часть этих свойств служит для реализации главной функции тромбоцитов – формирования гемостатической пробки, другая – для ускорения реакций свертывания крови. Так, экспонирование прокоагулянтной мембраны и секреция альфа-гранул необходимы для осуществления именно второй функции тромбоцитов.

Свертывание крови представляет собой каскад реакций в плазме крови, который заканчивается формированием сети волокон фибрина и переводом крови из жидкого состояния в желеобразное [11]. Многие ключевые реакции свертывания являются мембранно-зависимыми (рис. 5), ускоряясь на многие порядки в присутствии отрицательно заряженных фосфолипидных мембран, с которыми белки свертывания связываются посредством так называемых кальциевых мостиков. В нормальном состоянии мембрана тромбоцитов не поддерживает реакций свертывания. Отрицательно заряженные фосфолипиды, в первую очередь фосфатидилсерин, сосредоточены на внутреннем

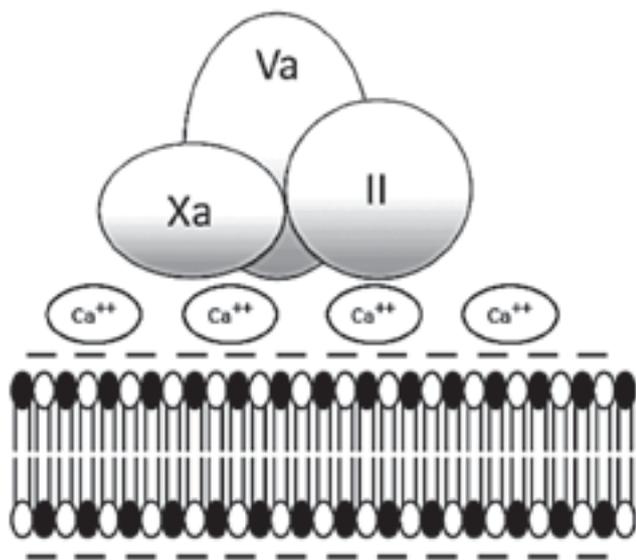


Рис. 5. Мембранные реакции свертывания крови. Активация тромбоцитов ведет к появлению фосфатидилсерина во внешнем слое мембраны тромбоцитов. Факторы свертывания связываются с такими мембранами посредством кальциевых мостиков, формируя комплексы белков, в которых реакции свертывания ускоряются на порядки. На иллюстрации изображен комплекс протромбиназы, состоящий из факторов Xa, Va, II, находящийся на поверхности бислоистой мембраны

слое мембраны, а фосфатидилхолин внешнего слоя связывает факторы свертывания гораздо хуже. Несмотря на то, что некоторые факторы свертывания могут связываться и с неактивированными тромбоцитами, это не приводит к формированию активных ферментативных комплексов.

Активация тромбоцита, предположительно, приводит к активации фермента скрамблазы, который начинает быстро, специфично, двусторонне и АДФ-независимо перебрасывать отрицательно заряженные фосфолипиды из одного слоя в другой. В результате происходит ускоренное установление равновесия, при котором концентрация фосфатидилсерина в обоих слоях становится одинаковой. Кроме того, при активации имеет место экспозиция и/или конформационное изменение многих трансмембранных белков внешнего слоя мембраны, и они приобретают способность специфически связывать факторы свертывания, ускоряя реакции с их участием. Что интересно, только часть тромбоцитов проявляет такие свойства при активации [12–14].

Вообще говоря, активированное состояние тромбоцита может быть разным: активация тромбоцитов имеет несколько степеней, и экспрессия прокоагулянтной поверхности является одной из высших. Только тромбин или коллаген могут вызывать такой сильный ответ. Более слабые активаторы, особенно АДФ, могут вносить вклад в работу сильных активаторов [15]. Однако они не способны самостоятельно вызвать выход фосфатидилсерина на внешний слой мембраны; их эффекты сводятся к изменению формы, агрегации и секреции части гранул.

### Как работает тромбоцит

Наиболее распространенным способом тестирования состояния системы тромбоцитарного гемостаза в современной диагностической практике является агрегация, в которой по оптической плотности оценивается эффект добавления к суспензии тромбоцитов некоторого активатора. Активатор, чаще всего АДФ или коллаген, добавляется к обогащенной тромбоцитами плазме крови при постоянном перемешивании на протяжении нескольких минут. Тромбоциты активируются, взаимодействуют друг с другом, и происходит формирование агрегатов, которое можно заметить по уменьшению мутности суспензии, вызванному уменьшением количества рассеивающих свет частиц. Существуют варианты теста агрегации, связанные с иными принципами детекции: например, можно измерить агрегацию тромбоцитов в цельной крови, если использовать импедансный метод вместо оптического.

Возможно, именно в связи с распространенностью теста агрегации за последние десятилетия в умах многих специалистов утвердилось представление, что формирование тромбоцитарного тромба или гемостатической пробки в организме происходит похожим способом: сначала активация (например, выделившимся из кле-

ток поврежденной стенки сосуда АДФ), а потом агрегация. Несмотря на то, что исследование роста тромбоцитарного тромба в проточных камерах имеет историю длиной почти в полвека, только в последние десятилетия этот традиционный взгляд начал подвергаться сомнению [2].

Рассмотрим первую стадию формирования тромба: адгезии тромбоцитов к коллагену, экспонированному в месте повреждения. Попробуем оценить времена и расстояния, типичные для этого процесса. Пусть характерный размер области повреждения будет составлять, скажем,  $l = 10$  микрометров (1 оторвавшаяся клетка эндотелия). Пусть скорость потока будет артериальной, это означает градиент скорости потока на стенке около  $u = 1000 \text{ с}^{-1}$ . Тогда тромбоцит, имеющий характерный размер (по порядку величины) около  $x = 1$  микрометра, будет двигаться около стенки со скоростью  $v = x \times u = 1000$  микрометров в секунду. Это означает, что он пролетит над местом повреждения за время  $l/v = 10$  микросекунд при том, что типичное время активации тромбоцита составляет минуты, для каких-то событий (скажем, активация интегринов) несколько секунд, но никак не одну сотую секунды. Отсюда следует единственный возможный вывод, который к настоящему моменту подкреплен экспериментально [2]: чтобы нормально активироваться, тромбоцит должен сначала прикрепиться к месту повреждения.

Более того, то же самое применимо и к последующим событиям увеличения размера тромба — агрегации. Тромбоцит, проплывающий над растущим в артерии тромбом, должен успеть присоединиться к нему за сотые доли секунды. Поэтому агрегация в организме может идти тоже только одним образом: сначала агрегация, а потом активация.

Еще одна проблема — это перемещение тромбоцита в сосуде поперек потока крови. Если бы тромбоциты были равномерно распределены в крови и спокойно перемещались с ламинарным потоком вдоль сосуда (а при ранении — вдоль раны), каждый по своей линии тока, то они не могли бы подойти к месту повреждения, чтобы выполнить свою задачу в гемостазе: для адгезии к месту повреждения или присоединения к уже активированному тромбоциту в тромбе необходимо воздействие какой-то физической силы, приводящей клетки в контакт. В тестах *in vitro* эта задача выполняется обычно магнитной мешалкой; а что работает в организме?

Вышеописанные рассуждения не могут, разумеется, служить доказательством новой картины тромбоцитарного гемостаза и тромбоза. Эта новая картина, которая будет изложена ниже, сложилась в последние 10 лет в результате активной экспериментальной работы многих исследователей, ведущую роль среди которых играет лаборатория Shaun P. Jackson в Австралии [2, 10]; при этом подавляющее большинство результатов получено с помощью видеомикроскопических

наблюдений за тромбообразованием *in vivo*. Представленные вниманию читателя численные оценки призваны лишь показать нереальность и внутреннюю противоречивость традиционного представления об агрегации тромбоцитов.

Как же происходит формирование тромбоцитарного тромба в реальности?

Первым шагом является вытеснение тромбоцитов к стенкам сосуда, осуществляемое эритроцитами. Красные клетки крови занимают почти половину ее объема, они на порядок превосходят тромбоциты как по концентрации, так и по массе. Столкновения эритроцитов, двигающихся с разными скоростями на разных линиях тока, между собой ведут к их перераспределению и концентрации у оси сосуда. Многие детали этого процесса неясны, но подобные перераспределения наблюдались в суспензиях частиц самого разного типа, не только в крови [16]. Легкие и малочисленные тромбоциты оказываются постоянно вытеснены на периферию, что крайне удобно, так как именно там, около потенциальных мест повреждения, находится их рабочее место; таким образом, локальная концентрация тромбоцитов у стенки сосуда на порядок превышает среднюю по крови.

Более того, даже у стенок сосуда тромбоциты постоянно терпят столкновения с эритроцитами, что ведет фактически к тому самому перемешиванию, которое необходимо для возникновения взаимодействия [17]. Благодаря таким столкновениям тромбоциты часто прижимаются к стенке, и если там оказывается место повреждения, они могут к нему прикрепиться. Помимо 2 главных механизмов, для которых построены надежные теории, — вытеснения и постоянного толкания — сейчас обсуждаются и другие, но бесспорным является экспериментальный факт: присутствие эритроцитов больше чем в 10 раз увеличивает скорость роста тромбоцитарного агрегата на поврежденной поверхности [18].

Второй проблемой является необходимость быстрой и бережной остановки тромбоцита, оказавшегося у места повреждения или около растущего тромба. Чтобы принять участие в формировании гемостатической пробки или тромба, тромбоцит должен погасить свою немалую скорость. Для этого служит специальный рецептор на тромбоцитах, гликопротеин Ib-V-IX, и растворенный в крови фактор фон Виллебранда (рис. 6). Этот фактор, циркулирующий в виде больших мультимеров до 100 нанометров в диаметре, способен обратимо связываться с коллагеном и тромбоцитами в составе тромба, так что он быстро покрывает их. Проносимые мимо тромбоциты цепляются за фактор фон Виллебранда и начинают останавливаться. Если бы они связывали коллаген напрямую, то резкая их остановка могла бы повредить, но слабо привязанный фактор фон Виллебранда может отсоединиться и вновь присоединиться к коллагену, так что тромбоциты могут достаточно быстро ос-

тановиться, проскользив всего несколько своих длин, как самолет, садящийся на брюхо.

Активация в таком подходе оказывается не первой, а последней стадией в формировании тромба. Обратимо связавшийся с местом повреждения тромбоцит может оторваться; однако активация способна его стабилизировать. Тромбоциты первого слоя, севшие непосредственно на коллаген, активируются коллагеном же через рецептор гликопротеин VI и затем прочно связываются с коллагеном через рецептор интегрин  $\alpha 2\beta 1$ : белки этого семейства способны менять свою конформацию и прочность связывания с мишенью под действием внутриклеточных сигналов (рис. 6). В своем обычном состоянии он не взаимодействует с коллагеном, а при активации крепится к нему прочно.

Прикрепление следующих слоев тромбоцитов, т. е. собственно рост тромба, происходит аналогичным образом: сначала клетки непрочно садятся на фактор фон Виллебранда, а после активации надежно закрепляются через рецепторы-интегрины. Разница заключается в том, что тромбоциты между собой связываются через другой интегрин, называемый  $\alpha IIb\beta 3$  (или гликопротеин IIb-IIIa): эти рецепторы «хватают» с 2 сторон молекулы фибриногена и через такие «фибриногеновые мостики» связывают отдельные тромбоциты. Второе отличие заключается в том, что следующие слои тромбоцитов активируются не контактом с коллагеном (который уже закрыт первым слоем), а растворимыми активаторами, которые либо секретируются самими тромбоцитами (АДФ, тромбоксан А<sub>2</sub>), либо образуются в ходе работы плазменной системы свертывания (тромбин). Важно подчеркнуть еще раз, что эти активаторы действуют исключительно в пределах тромба: быстрый поток за его пределами уносит их, не давая возможности рекрутировать новые клетки в тромб.

Картина роста тромбоцитарного тромба *in vivo* сейчас достаточно устоялась, и описанная выше последовательность событий считается общепризнанной. Тем не менее в ней хватает неясных мест, которые будут обсуждаться ниже.

### Проблемы диагностики функции тромбоцитов

В настоящий момент диагностика функций тромбоцитов не менее чем на 90 % производится с помощью исследования агрегации. Принципы и недостатки этого подхода обсуждались выше; главной проблемой является то, что ни один из тестов агрегации не соответствует тому, что происходит *in vivo*.

Наверное, еще 10 % функциональной оценки обеспечивается проточной цитометрией, которая позволяет определить антигенный состав белков на поверхности тромбоцита. Наиболее подготовленные специалисты могут также использовать цитометрию для более детальной характеристики функций тромбоцитов: активации интегринов, выхода гранул и фосфатидилсерина. Это дает полезную информацию об отдельных молекулах и способностях клетки. Тем не менее все это не дает ответа на общий вопрос: как адекватно оценить функцию тромбоцитов в целом?

Наиболее естественный ответ: надо заставить тромбоциты формировать тромбы в условиях, приближенных к физиологическим. В настоящее время все большее применение набирают проточные камеры [20], в которых адгезия тромбоцитов к покрытой коллагеном подложке изучается с помощью микроскопии. В настоящий момент уже существуют коммерчески доступные камеры и ведется их стандартизация, хотя до сколько-нибудь значимого клинического применения в практике диагностического комплекса еще далеко. Возможным соперником для видеомикроскопии являются похожие подходы, использующиеся

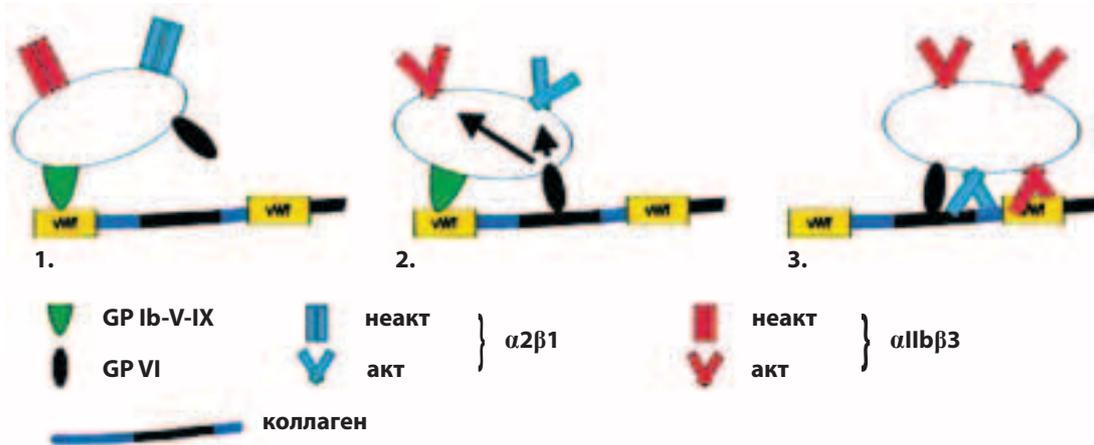


Рис. 6. Основной механизм начального роста тромбоцитарного тромба. Первичное закрепление тромбоцита в месте повреждения происходит путем взаимодействия главного адгезионного рецептора гликопротеина Ib-V-IX с молекулой-посредником фактором фон Виллебранда (vWf), закрепленным на обнажившемся коллагене (шаг 1). Затем сигнальный рецептор гликопротеин VI связывается с коллагеном, что ведет к активации тромбоцитов (шаг 2). Активация агрегационных рецепторов интегринов  $\alpha 2\beta 1$  (служит для связывания коллагена) и  $\alpha IIb\beta 3$  (для связывания через фибриногеновые мостики с другими тромбоцитами) способствует закреплению активированного тромбоцита на коллагене (шаг 3) и создает основу для дальнейшего роста тромба. Воспроизведено из [19]

в приборах типа PFA [21], где оценивается способность тромбоцитов забивать агрегатами картридж, через который прокачивается цельная кровь.

**Проблемы коррекции функции тромбоцитов**

Контроль функции тромбоцитов является одним из главных способов борьбы с артериальными тромбозами практически любой природы. Исходно основным препаратом для этой цели был аспирин, блокирующий синтез тромбоксана A2: несмотря на давнюю историю препарата, только во 2-й половине XX века была открыта его способность подавлять тромбообразование и снижать риск инфаркта. В 1990-е годы появились эффективные антиагреганты, атакующие рецептор к фибриногену, интегрин  $\alpha IIb\beta 3$ : абциксимаб, тирофибан, эптифибатид [22], а также отечественный препарат монафрам. Сейчас оба этих класса препаратов в значительной степени вытесняются ингибиторами аденозиндифосфатного рецептора P2Y12: это в первую очередь клопидогрел, а также прасугрел, тикагрелор и кангрелор [23]. Сейчас активно ведутся работы по созданию новых препаратов, обладающих большей эффективностью и меньшей опасностью кровотечений.

Более сложная задача – как быть, когда тромбоцитов мало или они плохо работают? Технология приготовления и хранения тромбоцитарных концентратов для переливания достигла наилучших результатов к середине 1980-х годов, и принципиальных прорывов с тех пор не произошло. Короткое время жизни, высокий риск иммунных осложнений и инфицирования пациента, непрерывно усугубляющийся во всем мире дефицит доноров, отсутствие вплоть до самого последнего времени искусственных заменителей делают ситуацию с переливанием тромбоцитов крайне неудовлетворительной, возможно, самой проблемной среди всех компонентов крови.

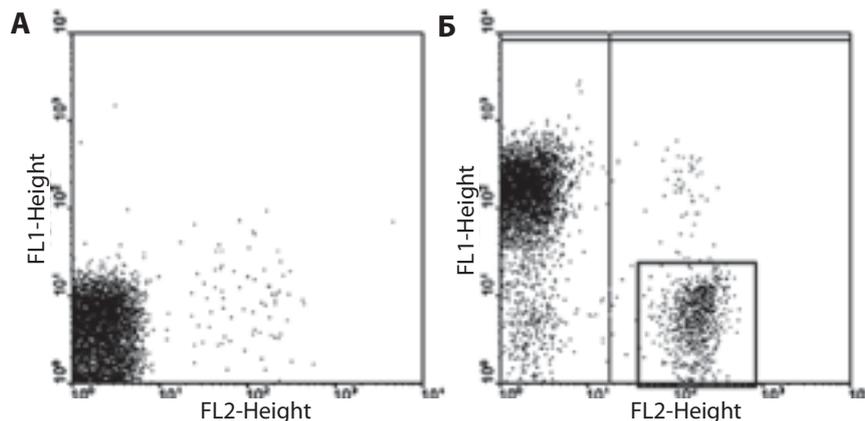
На протяжении все тех же последних десятилетий единственной доступной для клинического использо-

вания альтернативой обычным тромбоконцентратам было криоконсервирование, позволявшее продлить срок их жизни до нескольких лет. Но решить проблему сохранения свойств тромбоцитов при замораживании и размораживании до конца так и не удалось. К тому же замораживание этих клеток оказалось связано с таким количеством технических сложностей, что вплоть до настоящего времени оно не смогло составить успешную конкуренцию использованию незамороженных тромбоконцентратов.

Именно поэтому с каждым годом все большее внимание уделялось начатым еще в 1950-е годы работам по созданию новых препаратов и методов, способных радикально продлить срок жизни и удобство использования донорских тромбоцитов, а то и создать возможные аналоги, позволяющие полностью отказаться от их использования. Антибактериальные препараты и ингибиторы жизнедеятельности тромбоцитов, новые криоконсерванты и протоколы заморозки, лиофилизированные тромбоциты и везикулы на основе тромбоцитарных мембран, эритроциты с гемостатической функцией и липосомы – вот далеко не полный список подходов, применявшихся для достижения этой цели. Некоторые из них – например, лиофилизированные тромбоциты Stasix – уже сейчас находятся в активных клинических исследованиях [24].

**Загадки тромбоцитов**

**Субпопуляции.** Одна из наиболее интригующих загадок тромбоцитов – их гетерогенность. При активации тромбоцитов формируются 2 субпопуляции с драматически разными свойствами [25]. Их формирование управляется не до конца исследованными сигнальными путями [13]. Интересно, что одна из этих субпопуляций ускоряет реакции свертывания, а вторая способна к нормальной агрегации (рис. 7). Это разделение 2 главных функций тромбоцитов интригует [14], но объяснений ему пока не предложено.



**Рис. 7.** Субпопуляции тромбоцитов крови радикально различаются по способности к ускорению реакций свертывания и агрегации. Точечные диаграммы суспензии неактивированных (слева) и активированных (справа) тромбоцитов на проточном цитометре. По оси абсцисс отложена флуоресценция аннексина V, маркера фосфатидилсерина. По оси ординат показана флуоресценция фибриногена. Видно, что при активации формируются 2 субпопуляции тромбоцитов, из которых одна на порядки превосходит другую по уровню фосфатидилсерина, но настолько же уступает по связыванию фибриногена. Воспроизведено из [14]

**Остановка роста тромба.** Выше мы рассмотрели последовательность событий, происходящих в процессе роста тромбоцитарного тромба. Одной из самых больших проблем, которые до сих пор остаются нерешенными, является вопрос об остановке этого роста: почему в каких-то случаях он идет вплоть до полной окклюзии сосуда, а в других сосуд остается свободным? Сейчас существует около десятка гипотез, объясняющих ограниченность размера тромба. Одной из наиболее активно обсуждающихся является предположение о том, что при периодическом разрушении верхней, нестабильной части тромба обнажается сформировавшийся внутри фибрин [26]. Тем не менее этот вопрос еще далек от решения. С большой вероятностью может быть не один механизм остановки, и для разных сосудов эти механизмы могут быть разными.

**Тромбоциты и контактный путь.** Довольно давно исследователи показали, что тромбоциты потенциально способны активировать свертывание крови по контактному пути [27]. Главными кандидатами на роль активаторов считаются полифосфаты, выходящие из плотных гранул при активации [28], хотя есть опровержения этой точки зрения [29]. По-видимому, благодаря этой активации контактный путь активации свертывания крови важен для роста тромбоцитарного тромба, как было показано в недавних работах [30]. Это открытие позволяет надеяться на создание новых антитромботических препаратов.

**Микровезикулы.** Тромбоциты при активации отщепляют липидные микрочастицы, также называемые микровезикулами. Рецепторы на их поверхности сконцентрированы, и поэтому эти частицы обладают колоссальной прокоагулянтной активностью: их поверхность в 50–100 раз более активна, чем поверхность активированных тромбоцитов [31]. Зачем тромбоциты это делают — неясно. Однако в крови даже здоровых людей количество таких везикул значительно, и оно достоверно возрастает у пациентов с различными сердечно-сосудистыми и гематологическими заболеваниями, коррелируя с риском тромбозов. Изучение этих

везикул затруднено их крошечными размерами (30–300 нм), намного меньше длины волны света [32].

**Тромбоциты в онкологии.** Тромбоциты играют двойственную роль при онкологических заболеваниях [33]. С одной стороны, они увеличивают риск и тяжесть венозных тромбозов, характерных для пациентов с опухолями. С другой стороны, они напрямую влияют на течение заболевания, регулируя ангиогенез, рост опухоли и метастазирование с помощью ряда механизмов. Механизмы взаимодействия тромбоцитов с раковыми клетками сложны и плохо изучены, но их исключительная важность сейчас не вызывает сомнения [34].

### Заключение

Тромбоциты крови — важнейшие участники как нормального гемостаза, так и патологического тромбоцитарного процесса, состояние которых критично для самых разных заболеваний и состояний. В настоящий момент достигнут существенный прогресс на пути к пониманию функционирования тромбоцитов и коррекции тромбоцитарного гемостаза, но количество научных загадок еще очень велико: взаимодействие тромбоцитов с плазменным гемостазом, сложность сигнализации, механизмы регуляции роста и остановки тромбоцитарного тромба. В последнее время появляются сведения о взаимодействии тромбоцитов с другими системами организма, указывающие на их важные роли в иммунитете и морфогенезе. Главными среди практических сложностей являются отсутствие адекватных интегральных тестов функции тромбоцита и затруднительность нормализации этой функции.

### Благодарности

*Работа авторов поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 14-04-00670, а также грантами Программ фундаментальных исследований Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sixma J.J., van den Berg A. The haemostatic plug in haemophilia A: a morphological study of haemostatic plug formation in bleeding time skin wounds of patients with severe haemophilia A. *Br J Haematol* 1984;58(4):741–53.
2. Maxwell M.J., Westein E., Nesbitt W.S. et al. Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood* 2007;109(2):566–76.
3. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 480 с.
4. Michelson A.D. Platelets. 3<sup>rd</sup> ed., 2013. London; Waltham, MA: Academic Press, xlv, 1353 p.
5. Ohlmann P., Eckly A., Freund M. et al. ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of Galphaq. *Blood* 2000;96(6):2134–9.
6. White J.G. Electron microscopy methods for studying platelet structure and function. *Methods Mol Biol* 2004;272:47–63.
7. van Nispen tot Panneerden H., de Haas F., Geerts W. et al. The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood* 2010;116(7):1147–56.
8. Blair P., Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009;23(4):177–89.
9. Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N. et al. Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered «cap» on their surface that promotes their attachment to aggregates. *J Biol Chem* 2013;288(41):29621–32.
10. Kaplan Z.S., Jackson S.P. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology*

- Am Soc Hematol Educ Program 2011;2011:51–61.
11. Tanaka K.A., Key N.S., Levy J.H. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 2009;108(5):1433–46.
  12. Pantelev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J. et al. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J Thromb Haemost* 2005;3(11):2545–53.
  13. Topalov N.N., Kotova Y.N., Vasil'ev S. A., Pantelev M.A. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation. *Br J Haematol* 2012;157(1):105–15.
  14. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N. et al. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys J* 2012;102(10):2261–9.
  15. Kotova Y.N., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the P2Y12 receptor. *J Thromb Haemost* 2008;6(9):1603–5.
  16. Uijttewaal W.S., Nijhof E.J., Bronkhorst P.J. et al. Near-wall excess of platelets induced by lateral migration of erythrocytes in flowing blood. *Am J Physiol* 1993;264(4 Pt 2):H1239–44.
  17. Tokarev A.A., Butylin A.A., Ataulakhanov F.I. Platelet adhesion from shear blood flow is controlled by near-wall rebounding collisions with erythrocytes. *Biophys J* 2011;100(4):799–808.
  18. Turitto V.T., Weiss H.J. Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science* 1980;207(4430):541–3.
  19. Nieswandt B., Brakebusch C., Bergmeier W. et al. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001;20(9):2120–30.
  20. Westein E., de Witt S., Lamers M. et al. Monitoring *in vitro* thrombus formation with novel microfluidic devices. *Platelets* 2012;23(7):501–9.
  21. Favalaro E.J., Bonar R. External quality assessment/proficiency testing and internal quality control for the PFA-100 and PFA-200: an update. *Semin Thromb Hemost* 2014;40(2):239–53.
  22. Kristensen S.D., Würtz M., Grove E.L. et al., Contemporary use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Thromb Haemost* 2012;107(2):215–24.
  23. Ferri N., Corsini A., Bellosta S. Pharmacology of the new P2Y12 receptor inhibitors: insights on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drugs* 2013;73(15):1681–709.
  24. Bode A.P., Fischer T.H. Lyophilized platelets: fifty years in the making. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007;35(1):125–33.
  25. Heemskerk J.W., Mattheij N.J., Cosemans J.M. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost* 2013;11(1):2–16.
  26. Tosenberger A., Ataulakhanov F., Bessonov N. et al. Modelling of thrombus growth in flow with a DPD-PDE method. *J Theor Biol* 2013;337:30–41.
  27. Bäck J., Sanchez J., Elgue G. et al. Activated human platelets induce factor XIIa-mediated contact activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(1):11–7.
  28. Müller F., Mutch N.J., Schenk W.A. et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators *in vivo*. *Cell* 2009;139(6):1143–56.
  29. Faxälv L., Boknäs N., Ström J.O. et al. Putting polyphosphates to the test: evidence against platelet-induced activation of factor XII. *Blood* 2013;122(23):3818–24.
  30. Hagedorn I., Schmidbauer S., Pleines I. et al. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation* 2010;121(13):1510–7.
  31. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y. et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 2007;97(3):425–34.
  32. Hargett L.A., Bauer N.N. On the origin of microparticles: From «platelet dust» to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ* 2013;3(2):329–40.
  33. Riedl J., Pabinger I., Ay C. Platelets in cancer and thrombosis. *Hamostaseologie* 2014;34(1):54–62.
  34. Sharma D., Brummel-Ziedins K.E., Bouchard B.A., Holmes C.E. Platelets in tumor progression: a host factor that offers multiple potential targets in the treatment of cancer. *J Cell Physiol* 2014;229(8):1005–15.