

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 24.12.2018

Принята к печати 08.04.2019

# Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики

Е.А. Пономаренко<sup>1,2</sup>, А.А. Игнатова<sup>1</sup>, Д.В. Федорова<sup>1</sup>, П.А. Жарков<sup>1</sup>, М.А. Пантелеев<sup>1,2,3,4</sup><sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва<sup>3</sup> ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва<sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва

## Контактная информация:

Пономаренко Евгения Александровна,  
мл. науч. сотрудник лаборатории  
клеточного гемостаза и тромбоза  
НМИЦ детской гематологии, онкологии  
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева  
Минздрава России.  
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,  
ул. Саморы Машела, 1  
E-mail: pappe@bk.ru

Тромбоциты выполняют многочисленные важные функции не только в процессах нормального функционирования системы гемостаза, но и в других физиологических процессах: регуляции целостности сосудистой стенки, регенерации повреждений, воспалительном ответе. Нарушение их работоспособности происходит при многих заболеваниях и состояниях (включая онкогематологические, воспалительные, аутоиммунные заболевания, солидные опухоли, сепсис), провоцируется травмами, лекарственными препаратами и может вести к опасным последствиям – кровоизлияниям и тромбозам. Однако инструменты для оценки функциональной активности тромбоцитов крайне ограничены, да и представление о том, что такое функциональная активность тромбоцита, не достаточно четкое. В данном обзоре рассмотрены функции тромбоцитов, их нарушения, возможности их оценки существующими методами, а также перспективные направления их развития.

**Ключевые слова:** функция тромбоцитов, гемостаз, проточная цитометрия, кровотечение, тромбоз, тромбоцитопения

Пономаренко Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 112–119.  
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-112-119

© 2019 by NMRC PHOI

Received 24.12.2018

Accepted 08.04.2019

## Platelet functional activity: physiology and laboratory diagnostic methods

E.A. Ponomarenko<sup>1,2</sup>, A.A. Ignatova<sup>1</sup>, D.V. Fedorova<sup>1</sup>, P.A. Zharkov<sup>1</sup>, M.A. Panteleev<sup>1,2,3,4</sup><sup>1</sup> Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow<sup>2</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow<sup>3</sup> Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences, Moscow<sup>4</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow

Platelets perform numerous important functions not only in the process of normal functioning of hemostatic system, but also in other physiological processes, such as: vessel wall integrity regulation, wound healing, inflammatory response. Its malfunction can be found in various diseases and conditions (including oncohematological disorders, solid tumors, inflammatory diseases, sepsis, autoimmune disorders), is triggered by injury or medications and can lead to dangerous consequences, such as bleeding and thrombosis. However, platelets functional activity quantity assessment tools are extremely limited, the perception what platelet functional activity is about is also quite unclear. This review considers platelets function, its' abnormalities, possibilities for its' assessment by existing methods as well as promising directions for their development.

**Key words:** platelets function, hemostasis, flow cytometry, bleeding, thrombosis, thrombocytopenia

Ponomarenko E.A., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 112–119.  
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-112-119

**В** оценке роли тромбоцитов в современной медицине существует некий парадокс. С одной стороны, важность их роли несомненна: при многих состояниях, заболеваниях, влиянии патогенных факторов, выполнении ряда процедур нарушение функционирования тромбоцитов приводит к тяжелым последствиям (например, при онкогематологических заболеваниях [1], сепсисе [2], травмах [3], у недоношенных новорожденных [4]). С другой стороны, в подавляющем большинстве случаев паци-

енту назначают общий анализ крови, дающий представление лишь о количестве тромбоцитов. Тесты функциональной активности тромбоцитов назначают только при наследственных дефектах их функции и проводят в специализированных диагностических центрах.

В настоящем обзоре освещена проблема оценки функциональной активности тромбоцитов и рассмотрены перспективные направления развития в этой области.

### **Физиология гемостаза: что такое функциональная активность тромбоцитов?**

Представления о механизмах гемостаза были существенно пересмотрены за последние 10 лет. Гемостазом называют совокупность всех физиологических процессов, обеспечивающих остановку кровотечения при ранениях, ушибах, нарушении целостности межклеточных контактов сосудистой стенки и любых других ситуациях, связанных с кровотечениями и кровоизлияниями, поддержание реологии крови и растворение тромбов, выполнивших свою функцию. В зависимости от типа кровотечения возможны различные сценарии развития дальнейших событий.

Классический гемостаз при ранении включает три основных механизма: вазоконстрикция, формирование тромбоцитарного агрегата и формирование фибринового сгустка в результате активации каскада свертывания [5]. Тромбоциты полностью реализуют второй пункт и играют важные роли в двух других – и вазоконстрикция, и свертывание крови в огромной степени регулируются тромбоцитами. Формирование патологических тромбов, происходящее в отсутствие повреждения сосудистой стенки, по-видимому, проходит по сценариям, не вполне совпадающим с формированием тромбов в случае повреждения сосудистой стенки при нормальной работе системы гемостаза [6]. Кроме того, есть ряд негемостатических функций тромбоцита (участие в процессах ангиогенеза [7], воспаления [8], регенерации [9]), которые не обсуждаются в данном обзоре.

**Тромбоцитарный гемостаз.** Основные этапы классического гемостаза: торможение тромбоцитов в месте повреждения, их активация, стабилизация первичной адгезии, торможение новых тромбоцитов при столкновении с уже прикрепившимися тромбоцитами, их активация и стабилизация получившегося агрегата.

После повреждения сосудистой стенки белки субэндотелиального матрикса приходят в контакт с кровью. Циркулирующий в крови фактор Виллебранда связывается с коллагеном и разворачивается потоком крови, работая как механосенсор и «тормозной канат» для тромбоцитов. Тромбоциты связываются с фактором Виллебранда через адгезионный рецептор гликопротеин (ГП) Iba [10]. Это взаимодействие достаточно слабое, оно позволяет тромбоцитам медленно (1–4 мкм/сек) катиться по месту повреждения, но не дает стабильной адгезии [11]. После этого первичного шага происходит активация тромбоцитов (предположительно, с помощью коллагенового рецептора ГП VI) [10, 12]. Это ведет к активации рецепторов-интегринов, которые поддерживают стабильность адгезии за счет связывания со своими лигандами на стенке сосуда (интегрин  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 – с фактором Виллебранда, интегрин  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 –

с фибронектином, интегрин  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 – с коллагеном) [13].

Дальнейший рост тромбоцитарного агрегата происходит по той же схеме адгезии, что и его инициация: стабильно закрепленные тромбоциты связывают из крови фактор Виллебранда, а новые тромбоциты связываются с ним. Разница состоит только в том, что активация происходит не от коллагена (так как он закрыт первым слоем тромбоцитов), а от растворимых активаторов аденозиндифосфата (АДФ) и тромбоксана A2 (ТХА2), которых тромбоциты выбрасывают при активации. Стабильная адгезия достигается преимущественно благодаря  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, соединяющему тромбоциты через фибриногеновые «мостики». Дополнительно остановку кровотечения обеспечивает вазоконстрикция, вызванная ТХА2 и серотонином, секретлируемыми из тромбоцитов [14].

Наконец, активация свертывания крови обеспечивает формирование прочного гемостатического барьера из фибринового геля. Тромбоциты участвуют в свертывании крови тремя способами: экспонирование прокоагулянтной поверхности [15], секреция фактора V из  $\alpha$ -гранул [16] и прямая активация свертывания по контактному пути [17].

**Активация тромбоцитов.** Поскольку активация тромбоцита – критический компонент его физиологии, ее следует рассмотреть отдельно. Взаимодействие ГП VI с субэндотелиальным коллагеном вызывает формирование активационного сигнала и передачу его внутрь тромбоцитов с помощью системы вторичных посредников. В результате происходит мобилизация ионов кальция из внутриклеточных мест хранения – плотной тубулярной системы. Кальций участвует в различных процессах внутриклеточной сигнализации, а также приводит к выходу отрицательно заряженных фосфолипидов на поверхность тромбоцитов. Отрицательный заряд внешнего слоя мембраны необходим для превращения протромбина в тромбин через каскад свертывания [18].

Кроме того, происходит экзоцитоз содержимого  $\alpha$ - и плотных гранул. Выброшенные вещества, в свою очередь, по принципу обратной связи воздействуют на свои рецепторы на поверхности тромбоцитов, усиливая их активацию, а также активируют соседние покоящиеся тромбоциты. Еще один способ привлечения тромбоцитов – синтез ТХА2 *de novo*. Пожалуй, самый наглядный результат активации тромбоцитов – это изменение их формы с дискоидной на сферическую с образованием множества псевдоподий, которое происходит за счет реорганизации актинового цитоскелета [19].

Наконец, активация тромбоцитов приводит к конформационному переходу ГП IIb/IIIa из неактивной в активную форму, в результате чего он получает способность связывать растворимый фибриноген плазмы крови [20].

### **Нарушение функции тромбоцитов: что важно?**

Практически на все перечисленные выше функции тромбоцита могут оказывать влияние генетические нарушения, приобретенные заболевание, травмы и терапевтические воздействия. При генетических нарушениях дефекты функций тромбоцитов могут быть как изолированными (тромбастения Гланцмана, обусловленная дефицитом интегрин  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ), так и сочетанными (нарушения сигнальных путей, ведущие к дефектам активации) [21]. Лекарственные воздействия (например, ингибирование активации тромбоцитов ибрутинином) подавляют широкий круг тромбоцитарных функций, зависящих от активации коллагеном. Нарушения функции тромбоцитов у недоношенных новорожденных, при травмах, аутоиммунных и онкогематологических заболеваниях обычно носят комплексный характер и могут быть связаны в том числе и с рефрактерностью или преадаптированностью.

Нарушения функций тромбоцитов неразрывно связаны с проблемой их концентрации: нормальный диапазон составляет 150–450 тыс. в микролитре; тромбоцитопению диагностируют (с оговорками) при значениях менее 100 тыс./мкл, но граница клинических проблем в большинстве случаев лежит в области ниже 30 тыс./мкл. Таким образом, в среднем у человека в 10 раз больше тромбоцитов, чем необходимо. Можно предположить, что благодаря этому в значительной степени сглаживаются дефекты тромбоцитов. Это ведет к тому, что большая часть врожденных изолированных нарушений функции тромбоцитов, даже относительно серьезных, таких как тромбастения Гланцмана (отсутствие ведущего рецептора агрегации), имеет мягкий и редко угрожающий жизни фенотип кровотечений. При неизолированных нарушениях это приводит к тому, что клинически значимые дефекты функции тромбоцитарного гемостаза в подавляющем большинстве случаев оказываются комбинацией собственно дефекта тромбоцитов и снижения их концентрации. Это одна из самых серьезных проблем при использовании агрегометрии, которая не работает при низких концентрациях тромбоцитов.

Практически все перечисленные выше функции требуют оценки для определения состояния тромбоцитарного гемостаза. И эту задачу следует отделять от задачи постановки диагноза. Исключение составляют те случаи, когда нарушение функции тромбоцитов (как правило, генетическое) напрямую и однозначно связано с заболеванием, при этом оценка тромбоцитарной функции может помочь поставить диагноз. В большинстве случаев ситуация обратная: диагноз уже установлен и не связан с тромбоцитами, нарушение функции которых происходит в ответ на терапию заболевания (например, при лечении хронического

лимфоцитарного лейкоза ибрутинином [22], который является обратимым ингибитором тирозинкиназы Брутона). Несмотря на высокую эффективность и хорошую переносимость этого препарата, у большого числа пациентов в качестве побочного эффекта возникают кровотечения, в основном на слизистых оболочках и коже [23]. Было показано, что этот препарат нарушает активацию тромбоцитов *in vitro* [24]; отмечено также, что у пациентов нарушен ответ тромбоцитов на коллаген и снижена адгезия к фактору Виллебранда *ex vivo* [25]. В этом случае определение функциональной активности тромбоцитов необходимо для оценки рисков кровотечений и контроля терапии.

### **Методы лабораторной диагностики функциональной активности тромбоцитов**

Существует большое разнообразие методов лабораторной диагностики, позволяющих оценить гемостатические функции тромбоцитов. Золотым стандартом считается метод оптической агрегометрии, который позволяет *in vitro* оценить способность тромбоцитов к агрегации за счет их соединения друг с другом с помощью ГП IIb/IIIa. В качестве среды используется обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) [26]. В состоянии покоя тромбоциты распределены в плазме однородно, при этом наблюдается максимальная оптическая плотность. Добавление агониста приводит к активации тромбоцитов, что в свою очередь вызывает изменение их формы, в результате чего оптическая плотность плазмы падает. При образовании тромбоцитарных агрегатов оптическая плотность плазмы падает, а светопропускание возрастает. В зависимости от используемых агонистов агрегация может быть необратимой, при этом кривая агрегации выходит на плато, либо обратимой, тогда кривая стремится вернуться к исходным значениям. Использование различных агонистов позволяет выявить разнообразные нарушения функции тромбоцитов.

Наиболее частые агонисты агрегации тромбоцитов в оптической агрегометрии – АДФ, адреналин, коллаген, арахидоновая кислота и ристоцетин. Слабые агонисты вызывают агрегацию без секреции гранул (например, АДФ), а сильные (например, коллаген) – и агрегацию, и секрецию гранул.

Ристоцетин облегчает связывание фактора Виллебранда с комплексом ГП IIb/IX/V. Для нормального результата необходимо присутствие функционального фактора Виллебранда и комплекса ГП IIb/IX/V. Таким образом, агрегация тромбоцитов с ристоцетином позволяет выявить как болезнь Виллебранда, так и нарушения функций тромбоцитов (например, синдром Бернара–Суллье) [27]; агрегация с коллагеном – недостаточность секреции тромбоцитов, а агрегация

с адреналином позволяет определить гиперреактивность тромбоцитов. Агрегация с обоими агонистами в низких дозах применяется для мониторинга лечения аспирином и антагонистами P2Y<sub>12</sub> рецепторов [28].

Среди недостатков метода можно назвать необходимость подготовки пробы с ОТП. Кроме того, использование оптических агрегометров затруднено при малом количестве тромбоцитов, например, при иммунной тромбоцитопенической пурпуре (ИТП) в связи с низкой оптической плотностью плазмы. Мелкие агрегаты из малого количества тромбоцитов можно обнаружить с помощью лазерного агрегометра. Прибор определяет изменение оптической плотности ОТП и средний размер агрегата, что дает возможность оценить способность тромбоцитов к активации и агрегации. Высокая чувствительность метода позволяет использовать его при исследовании агрегации при действии низких концентраций агонистов [29].

Оптическая многоканальная агрегометрия в 96-луночном планшете (*Optimul*) имеет тот же принцип работы, что и оптическая агрегометрия. Панель агонистов (АДФ, агонист рецептора тромбина TRAP-6, адреналин, арахидоновая кислота и ристоцетин) в разных концентрациях добавляют в отдельные лунки 96-луночного планшета для микротитрования. В ходе анализа в лунки к агонистам добавляют ОТП, и помещают планшет в считыватель для определения величины светопропускания плазмы [30]. Метод позволяет одновременно анализировать большее, чем в оптической агрегометрии, количество образцов, а также расширить панель используемых агонистов и их концентраций [31]. На сегодняшний день этот метод недостаточно стандартизован и применяется только в специализированных лабораториях [30, 32].

В методе импедансной агрегометрии, в отличие от оптической агрегометрии, в качестве среды используют цельную кровь. При этом, во-первых, отпадает необходимость проведения предварительной подготовки образцов, а во-вторых, оценка функции тромбоцитов проводится в более физиологичных условиях. При добавлении в среду агониста происходит образование агрегатов с тромбоцитами, осажденными на электродах агрегометра, что, в свою очередь, приводит к увеличению сопротивления (импеданса) системы. Способность тромбоцитов к агрегации оценивают на основе оценки изменения импеданса [33].

В тех случаях, когда нет возможности обратиться в лабораторию, используют устройства, позволяющие быстро оценить способность тромбоцитов к агрегации в цельной крови. К таким устройствам относятся системы *VerifyNow* (ITC, США) и *Plateletworks* (*Helena Laboratories*, США), имеющие сходный принцип работы. В системе *VerifyNow* тромбоциты под действи-

ем агонистов агрегируют на картридж с шариками, покрытыми фибриногеном, пропорционально числу активированных ГП IIb/IIIa [34], что вызывает возращание оптического сигнала светопропускания. В системе *Plateletworks* с помощью гемоанализатора производится подсчет количества тромбоцитов до и после агрегации на трубочки, покрытые АДФ или арахидоновой кислотой [35]. Основные достоинства этих методов – простота исполнения и отсутствие необходимости проведения дополнительных манипуляций с кровью. Оба метода используют для мониторинга антиагрегантной терапии [36, 37].

Работа анализатора PFA-100 (*Siemens*, Германия) основана на способности тромбоцитов к адгезии в условиях высоких скоростей сдвига и агрегации в присутствии агониста. Оценку функциональной активности тромбоцитов проводят в цельной крови с помощью симуляции первичного гемостаза на картриджах [38]. Кровь при высоких скоростях сдвига проходит через капилляр, имеющий на конце мембрану, покрытую коллагеном, на который нанесено микроскопическое отверстие, покрытое АДФ либо адреналином. В условиях высоких скоростей сдвига и присутствия агонистов происходит образование тромбоцитарного агрегата, закрывающего это отверстие. Время, за которое тромбоциты закупоривают отверстие и блокируют ток крови, называют временем закупоривания апертуры (*closure time*) – это показатель всего тромбоцитарного гемостаза. Использование анализатора позволяет определить, чем были вызваны нарушения функциональной активности тромбоцитов – внешними причинами (например, терапией аспирином) или дефектами самих тромбоцитов (например, синдром Бернара–Сулье или тромбастения Гланцмана) [39, 40].

Способность тромбоцитов к адгезии и агрегации оценивают также с помощью анализатора IMPACT (*DiaMed*, Швейцария) [41]. Тромбоциты адгезируют на полистероловой подложке в условиях высоких скоростей сдвига, которые обеспечиваются вращением конуса. Исследование полностью автоматизировано: анализатор проводит окрашивание, а также измеряет процент поверхности, покрытой тромбоцитарными агрегатами, как показатель способности тромбоцитов к адгезии, и средний размер агрегатов – показатель способности тромбоцитов к агрегации. Требуется дополнительные исследования для оценки роли анализатора в диагностике врожденных и приобретенных нарушений функций тромбоцитов.

Еще один метод лабораторной диагностики функции тромбоцитов, учитывающий влияние скорости сдвига, – проточные камеры [42]. Современные камеры изготовлены из полидиметилсилоксана (PDMS). В качестве субстратов в основном используют коллаген I или III типа, фактор Виллебранда, фибриноген,

тканевый фактор, фибронектин [43, 44]. Благодаря возможности контроля потока жидкости через камеру можно имитировать и изучать процесс роста тромба в условиях заданных скоростей сдвига [45]. Использование проточных камер позволяет также изучать пути  $Ca^{2+}$  сигнализации, активации интегринов и секреции тромбоцитов – этапов образования тромба [46, 47]. Тем не менее этот метод пока не включен в рутинную клиническую диагностическую практику, в основном из-за отсутствия стандартизации его использования и сборки камер [48]. Кроме того, для анализа в нескольких камерах требуется довольно большой объем крови – 5 мл и более [49].

Проточная цитометрия – метод анализа клеток и их компонентов с помощью антител, меченных флуоресцентным красителем [50]. Внутри проточного цитометра клетки в суспензии проходят через поток обжимающей жидкости, которая создает ламинарный поток, позволяя клеткам по отдельности проходить через источник света. От источника, обычно лазера, исходит луч монохромного света, он проходит через клетку. Антитела, конъюгированные с флуоресцентными красителями, могут связываться со специфическими белками на клеточной мембране или внутри клетки. Когда такая меченая клетка проходит через луч света, происходит возбуждение флуоресцентных молекул, в результате они переходят на более высокий энергетический уровень. При возврате на свой нормальный энергетический уровень флуорохромы испускают световую энергию. Использование нескольких флуорохромов, имеющих сходные длины волн возбуждения, но разные длины волн эмиссии, либо разные длины волн возбуждения (или «цветов»), позволяет одновременно измерять несколько характеристик клетки [51]. Свет, который клетка испускает в ответ, расходится во всех направлениях; оптическая система собирает его и направляет на различные фильтры и зеркала, которые изолируют лучи с определенной длиной волны. Световые сигналы регистрирует фотоумножитель и переводит их в цифровую форму для дальнейшего компьютерного анализа. Информация отображается обычно в виде гистограмм или двумерных дот-плотов.

С помощью проточной цитометрии измеряют оптические и флуоресцентные характеристики отдельных клеток, а также любых других частиц, например, ядер, микроорганизмов, хромосом. Физические характеристики, такие как размер и внутреннее строение, помогают разделить клетки на различные популяции.

Единственная группа заболеваний, при которых проточная цитометрия тромбоцитов является устоявшейся и неотъемлемой частью структуры лабораторной диагностики, – это классические тромбоцито-

патии. Когда они однозначно связаны с отсутствием или недостатком тех или иных рецепторов (ГП Ib – для синдрома Бернара–Сулье; интегрин  $\alpha IIb\beta 3$  – для тромбастении Гланцмана 1-го и 2-го типов и др.), цитометрия без всякой дополнительной стимуляции тромбоцитов (по факту – просто иммунофенотипирование) – высоконадежный тест как для скрининга, так и для постановки окончательного диагноза. В меньшей степени это утверждение справедливо для тех тромбоцитопатий, которые «заметны» только после активации тромбоцитов: синдром Скотта, тромбастения Гланцмана 3-го типа. Такая проточная цитометрия гораздо реже применяется в клинике, поскольку в данном случае выбор параметров (в первую очередь типа активации и маркеров) не обоснован ни фундаментальными данными по физиологии и патофизиологии, ни сколько-нибудь обширными клиническими испытаниями. Однако, учитывая высокую редкость четко определенных тромбоцитопатий, этот метод обладает нулевой коммерческой привлекательностью и не стандартизован нигде в мире. Фактически каждая лабораторно-клиническая команда (которых не так много) налаживает иммунофенотипирование тромбоцитов самостоятельно. Сегодня понятие «наследственная тромбоцитопатия» резко расширилось: сюда вошли разнообразные дефекты рецепторов и сигнализации, которые раньше не детектировались, но именно в этих случаях надо четко понимать, как активировать тромбоциты и какие ответы могут наблюдаться.

В области негенетических нарушений тромбоцитарной функции (от сепсиса и онкологии до недоношенных новорожденных и передозировки антиагрегантных препаратов) пока существуют только отдельные разработки, выполненные разными командами [52–54].

Метод определения функциональной активности тромбоцитов (ФАТ) основан на сравнении данных проточной цитометрии покоящихся и активированных тромбоцитов. В качестве активатора используется смесь агонистов (пептид, активирующий рецептор тромбина (TRAP-6), пептид, родственник коллагену (CRP) и  $CaCl_2$ ). Используемые панели антител позволяют получить информацию о количестве и активности ряда интегринов, участвующих в осуществлении основных функций тромбоцита. PAC-1, сцепленный с флуоресцентным красителем флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), связывается с активированной формой интегрин  $\alpha IIb\beta 3$ , рецептора фибриногена. CD42b, сцепленный с фикоэритрином (PE), связывается с ГП Ib, рецептором фактора Виллебранда. Аннексин V, меченный красителем Alexa647, – это маркер фосфатидилсерина, выходящего на поверхность тромбоцитов при их активации. CD61-PE связывается с ГП IIIa; CD62P-Alexa647 – с P-селектином, основным

веществом  $\alpha$ -гранул. Мепакрин не является антителом, однако обладает собственной флуоресценцией и используется для оценки степени выброса плотных гранул [55]. Тест проводится в цельной крови, таким образом обеспечивая более физиологические условия и отсутствие этапа пробоподготовки. Кроме того, для его выполнения требуется небольшой объем крови (20 мкл), поэтому этот тест удобен для использования в педиатрии. Среди достоинств метода отметим также возможность использования его для анализа низких концентраций тромбоцитов (например, при ИТП), а среди недостатков – плохую стандартизацию.

Существуют исследования, в которых сообщают о наличии корреляции между возникновением кровотечений и результатами теста функциональной активности тромбоцитов пациентов [56, 57]. Метод используется для оценки изменений функциональной активности тромбоцитов в результате терапии ромиплостимом при ИТП [58], а также для оценки качества тромбоцитов в тромбоцитарных концентратах [59].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лабораторные методы оценки функции тромбоцитарного гемостаза претерпевают резкое изменение своего статуса. В связи с тем, что понимание гемостаза меняется с каждым годом, понятие «физиологическая функция тромбоцитов» стало более определенным и наполнено молекулярным смыслом. Можно надеяться, что в ближайшее время будут разработаны тесты, которые смогут давать полноценную информацию о способности тромбоцитов выполнять свои физиологические задачи.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом фонда «Врачи, инновации, наука – детям» и грантами РФФИ 18-34-20026, 17-00-00140, 17-04-01309.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### ORCID

**Ponomarenko E.A.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8697-7570>

**Ignatova A.A.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5217-3937>

**Fedorova D.V.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4567-1871>

**Zharkov P.A.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4384-6754>

**Panteleev M.A.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

## Литература

- Athale U.H., Chan A. Hemorrhagic complications in pediatric hematologic malignancies. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33 (4): 408–15.
- Yaguchi A., Lobo F.L., Vincent J.L., Pradier O. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004; 2 (12): 2096–102.
- Ramsey M.T., Fabian T.C., Shahan C.P., Sharpe J.P., Mabry S.E., Weinberg J.A., et al. A prospective study of platelet function in trauma patients. *J Trauma Acute Care Surgery* 2016; 80 (5): 726–33.
- Balashova E., Koltsova E., Ignatova A., Polokhov D., Kuprash A., Kirtbaya A., et al. Laboratory Parameters of Blood Coagulation and Platelet Functional Activity in Premature Neonates. *Am J Perinatol* 2016; 33: A015.
- Panteleev M.A., Dashkevich N.M., Ataullakhanov F. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb Res* 2015; 136 (4) 699–711.
- Rodvien R., Mielke C.H. Role of Platelets in Hemostasis and Thrombosis. *West J Med* 1976; 125 (3): 181–6.
- Yoo S.Y., Kwon S.M. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediat Inflammation* 2013; 1.
- Thachil J. Platelets in Inflammatory Disorders: A Pathophysiological and Clinical Perspective. *Semin Thromb Hemost* 2015; 41 (6): 572–81.
- Walsh T.G., Metharom P., Berndt M. The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis. *Platelets* 2015; 26 (3): 199–11.
- Ruggeri Z. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 611–6.
- Ruggeri Z. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res* 2007; 120 (Suppl 1): S5–9.
- Nieswandt B., Brakebusch C., Bergmeier W., Schulte V., Bouvard D., Mokhtari-Nejad R., et al. Glycoprotein VI but not  $\alpha$ 2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20 (9): 2120–30.
- Hou Y., Carrim N., Wang Y., Gallant R.C., Marshall A., Ni H. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *J Biomed Res* 2015; 30: 29.
- Golino P., Crea F., Willerson J. How to study the effects of platelet aggregation and thrombosis on coronary vasomotion and their clinical relevance. *Ital Hear J* 2002; 3 (4): 220–5.
- Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kurasawa J.H., Sarafanov A.G., Chambost H., Vasil'ev S.A., et al. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1858 (6): 1216–27.
- Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N.,

- Obydenyy S.I., Yakimenko A.O., Podoplelova N.A., 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.
17. Zakharova N.V., Artemenko E.O., Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Demina I.A., Ataullakhanov F.I., et al. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. *PLoS One* 2015; 20 (1): e0116665.
  18. Clemetson K. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res Elsevier Ltd* 2012; 129 (3): 220–4.
  19. Brass L.F., Tomaiuolo M., Stalker T. Harnessing the platelet signaling network to produce an optimal hemostatic response. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013; 27 (3): 381–09.
  20. Varga-Szabo D., Pleines I., Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arter Thromb Vasc Biol* 2008; 28 (3): 403–12.
  21. Nurden A.T., Freson K., Seligsohn U. Inherited platelet disorders. *Haemophilia* 2012; 18 (Suppl 4): 154–60.
  22. Luu S., Gardiner E.E., Andrews R. Bone Marrow Defects and Platelet Function: A Focus on MDS and CLL. *Cancers (Basel)* 2018; 10 (5): pii: E147.
  23. Winqvist M., Askid A., Andersson P.O., Karlsson K., Karlsson C., Lauri B., et al. Real-world results of ibrutinib in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: data from 95 consecutive patients treated in a compassionate use program. A study from the Swedish Chronic Lymphocytic Leukemia Group. *Haematologica* 2016; 101 (12): 1573–80.
  24. Bye A.P., Unsworth A.J., Vaiyapuri S., Stainer A.R., Fry M.J., Gibbins J. Ibrutinib Inhibits Platelet Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Outside-In Signaling and Thrombus Stability But Not Adhesion to Collagen. *Arter Thromb Vasc Biol* 2015; 35 (11): 2326–35.
  25. Levade M., David E., Garcia C., Laurent P.A., Cadot S., Michallet A.S., et al. Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood* 2024; 124 (26): 3991–5.
  26. Born G. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927–9.
  27. Gadisseur A., Hermans C., Berneman Z., Schroyens W., Deckmyn H., Michiels J. Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease. *Acta Haematol* 2009; 121 (2–3): 71–84.
  28. Jennings L.K., McCabe White M. Platelet aggregation. *Platelets/ed. Michelson*. Boston: Academic Press, 2007, 495–507.
  29. Филиппова О.И., Колосков А.В., Столица А.А. Методы исследования функциональной активности тромбоцитов (обзор литературы). *Трансфузиология* 2012; 13: 493–514.
  30. Chan M.V., Armstrong P.C.J., Papalia F., Kirkby N.S., Warner T. Optical multi-channel (optimul) platelet aggregometry in 96-well plates as an additional method of platelet reactivity testing. *Platelets* 2011; 22 (7): 485–94.
  31. Armstrong P.C., Leadbeater P.D., Chan M.V., Kirkby N.S., Jakubowski J.A., Mitchell J.A., et al. In the presence of strong P2Y<sub>12</sub> receptor blockade, aspirin provides little additional inhibition of platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (3): 552–61.
  32. Cattaneo M., Hayward C.P., Moffat K.A., Pugliano M.T., Liu Y., Michelson A. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (6): 1029.
  33. Cardinal D.C., Flower R. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980; 3 (2): 135–58.
  34. Smith J.W., Steinhubl S.R., Lincoff A.M., Coleman J.C., Lee T.T., Hillman R.S., et al. Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation* 1999; 99 (5): 620–5.
  35. Campbell J., Ridgway H., Carville D. Plateletworks: a novel point of care platelet function screen. *Mol Diagn Ther* 2008; 12 (4): 253–8.
  36. Lennon M.J., Gibbs N.M., Weightman W.M., McGuire D., Michalopoulos N. A comparison of Plateletworks and platelet aggregometry for the assessment of aspirin-related platelet dysfunction in cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2004; 18 (2): 136–40.
  37. Craft R.M., Chavez J.J., Snider C.C., Muenchen R.A., Carroll R. Comparison of modified Thrombelastograph and Plateletworks whole blood assays to optical platelet aggregation for monitoring reversal of clopidogrel inhibition in elective surgery patients. *J Lab Clin Med* 2005; 145 (6): 309–15.
  38. Favaloro E.J., Mohammed S. Platelet function testing: auditing local practice and broader implications. *Clin Lab Sci* 2010; 23 (1): 21–31.
  39. Hayward C.P., Harrison P., Cattaneo M., Ortel T.L., Rao A.K. Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (2): 312–9.
  40. Homoncik M., Jilma B., Hergovich N., Stohlawetz P., Panzer S., Speiser W. Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost* 2000; 83 (2): 316–21.
  41. Varon D., Dardik R., Shenkman B., Kotev-Emeth S., Farzame N., Tamarin I., et al. A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions. *Thromb Res* 1997; 85 (4): 283–94.
  42. Sakariassen K.S., Hanson S.R., Cadroy Y. Methods and models to evaluate shear-dependent and surface reactivity-dependent antithrombotic efficacy. *Thromb Res* 2001; 104 (3): 149–74.
  43. Heemskerk J.W., Sakariassen K.S., Zwaginga J.J., Brass L.F., Jackson S.P., Farndale R.W., et al. Collagen surfaces to measure thrombus formation under flow: possibilities for standardization. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (4): 856–8.
  44. Cosemans J.M., Kuijpers M.J., Lecut C., Loubele S.T., Heeneman S., Jandrot-Perrus M., et al. Contribution of platelet

- glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 2005; 181 (1): 19–27.
45. Jackson S.P., Nesbitt W.S., Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl 1): 17–20.
  46. Cosemans J.M., Iserbyt B.F., Deckmyn H., Heemskerk J. Multiple ways to switch platelet integrins on and off. *J Thromb Haemost* 2008; 6 (8): 1253–61.
  47. Jackson S. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109 (12): 5087–95.
  48. Roest M., Reininger A., Zwaginga J.J., King M.R., Heemskerk J.W. Biorheology Subcommittee of the SSC of the ICTH. Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (11): 2322–4.
  49. Van Kruchten R., Cosemans J.M., Heemskerk J. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers – a practical guide. *Platelets* 2012; 23 (3): 229–42.
  50. Сироткина О.В., Боганькова Н.А., Ласковец А.Б., Кухарчик Г.А., Гайковая Л.Б., Вавилова Т.В. Иммунологические методы в оценке функциональной активности тромбоцитов у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. *Медицинская иммунология* 2010; 12 (3): 213–8.
  51. Brown M., Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 2000; 46 (8, pt. 2): 1221–9.
  52. Södergren A.L., Ramström S. Platelet subpopulations remain despite strong dual agonist stimulation and can be characterised using a novel six-colour flow cytometry protocol. *Sci Rep* 2018; 8 (1): 1441.
  53. Michelson A.D., Barnard M.R., Krueger L.A., Frelinger A.L. 3rd F.M. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 2000; 21 (3): 259–70.
  54. Rochat S., Alberio L. Formaldehyde-fixation of platelets for flow cytometric measurement of phosphatidylserine exposure is feasible. *Cytom A* 2015; 87 (1): 32–6.
  55. Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Polokhov D.M., Suntsova E.V., Zharkov P.A., Fedorova D.V., et al. Flow cytometry for pediatric platelets. *Platelets* 2018; 4: 1–10.
  56. Федорова Д.В., Жарков П.А., Игнатова А.А., Федотов А.Ю., Полохов Д.М., Полетаев А.В. и соавт. Диагностика тромбоцитопатий у детей: корреляции исследования функциональной активности тромбоцитов с клинической картиной и результатами агрегометрии. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2018; 17 (1): 16–22.
  57. Жарков П.А., Демина И.А., Пантелев М.А. Использование метода функциональной активности тромбоцитов для диагностики тромбоцитопатий у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2016; 15 (2): 40–6.
  58. Suntsova E.V., Demina I.M., Ignatova A.A., Ershov N.M., Trubina N.M., Dobrynina J., et al. Bleeding tendency and platelet function during treatment with romiplostim in children with severe immune thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2017; 105 (6): 841–8.
  59. Ignatova A.A., Karpova O.V., Trakhtman P.E., Rumiantsev S.A., Pantelev M.A. Functional characteristics and clinical effectiveness of platelet concentrates treated with riboflavin and ultraviolet light in plasma and in platelet additive solution. *Vox Sang* 2016; 110 (3): 244–52.