

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 13.05.2019

Принята к печати 10.06.2019

# Обратимая агрегация тромбоцитов в присутствии ионов кальция: механизмы и потенциальная значимость

А.А. Филькова<sup>1, 2</sup>, М.А. Пантелеев<sup>1, 2, 3, 4</sup>, А.Н. Свешникова<sup>1, 2, 3, 5</sup><sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва<sup>2</sup> ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва<sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва<sup>5</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва

**Контактная информация:**  
Пантелеев Михаил Александрович,  
д-р физ.-мат. наук, профессор,  
зав. лабораторией 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: mapanteleev@yandex.ru

Нарушения функционирования тромбоцитов – клеток крови, ответственных за образование тромбов и остановку кровотечения, – наблюдаются как самостоятельные заболевания, как осложнение онкологических и гематологических заболеваний или как следствие терапии. Тестирование агрегации тромбоцитов методом агрегометрии – практически единственный диагностический инструмент оценки функциональности тромбоцитов. Существует несколько разновидностей агрегометрии, которые различаются по методу регистрации образования тромбоцитарных агрегатов, а также способу подготовки тромбоцитов для эксперимента. В большинстве лабораторий принято проводить агрегометрию в богатой тромбоцитами плазме в присутствии ионов цитрата. В этом случае снижается концентрация ионов кальция в плазме, что предотвращает образование тромбина и свертывание плазмы крови. С другой стороны, известно, что агрегация тромбоцитов в ответ на АДФ в присутствии ионов кальция (в плазме крови, взятой на гепарин или гирудин, также блокирующие свертывание плазмы) обратима: через 1–5 мин после добавления активатора начинается распад агрегатов вплоть до полного возвращения светопропускания раствора (концентрации тромбоцитов) на исходный уровень. Этот феномен называют «обратимой» агрегацией тромбоцитов (деагрегацией); в некоторых случаях она наблюдается и в агрегометрии в цитратной плазме, особенно у педиатрических пациентов, однако обычно деагрегация не считается нормой и рассматривается как признак дисфункции тромбоцитов. В настоящем обзоре рассмотрены известные механизмы деагрегации тромбоцитарных агрегатов в присутствии и отсутствии кальция в среде. Обсуждается роль вторичной активации тромбоцитов как потенциальной причины необратимой агрегации, а также возможные варианты интерпретации результатов агрегометрии, в которой наблюдается обратимая агрегация тромбоцитов.

**Ключевые слова:** агрегометрия, обратимая агрегация, тромбоциты, кальций, вторичная активация тромбоцитов, аспирин, АДФ, серотонин, адреналин

Филькова А.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 120–129.  
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-120-129

© 2019 by NMRC PHOI

Received 13.05.2019

Accepted 10.06.2019

## Reversible platelet aggregation in the presence of calcium ions: mechanisms and potential value

А.А. Filkova<sup>1, 2</sup>, М.А. Panteleev<sup>1, 2, 3, 4</sup>, А.Н. Sveshnikova<sup>1, 2, 3, 5</sup><sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow<sup>2</sup> Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences, Moscow<sup>3</sup> Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology,

Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

<sup>4</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow<sup>5</sup> Sechenovskiy University, Moscow

**Correspondence:**  
Mikhail A. Panteleev, PhD, DSc,  
Head of the Laboratory of cellular  
hemostasis and thrombosis  
of Dmitry Rogachev National  
Medical Research Center  
of Pediatric Hematology, Oncology,  
Immunology Ministry of Healthcare  
of Russian Federation.  
Address: Russia 117997, Moscow,  
Samory Mashela st., 1  
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

Disorders in the functions of platelets – blood cells responsible for the blood clots formation and prevention – are observed as independent diseases, as a complication of cancer and hematological diseases or as a result of a therapy. Nowadays, a test of platelet aggregation by aggregometry is the only diagnostic method for assessing the platelets functions. There are several varieties of aggregometry, which differ both in the method of recording the formation of platelet aggregates and in the method of preparing platelets for the experiment. In most laboratories, it is customary to conduct aggregometry in platelet-rich plasma in the presence of citrate ions. In this case, the concentration of calcium ions in plasma decreases, it prevents the thrombin formation and the plasma coagulation. On the other hand, it has long been known that platelet aggregation in response to ADP in the presence of calcium ions (in blood plasma collected in heparin or hirudin tubes, also blocking plasma clotting) is reversible: after 1–5 minutes after the addition of the activator, the disaggregation begins until the light transmission of the solution (platelet concentration) returns to its original level. This phenomenon is called "reversible" platelet aggregation. Reversible aggregation ("disaggregation") is sometimes observed in aggregometry of citrate plasma, especially in pediatric patients. However, it is usually not considered normal and is considered a sign of platelet dysfunction. This review considers the known mechanisms of disaggregation in the presence or absence of calcium ions in the medium. The role of secondary activation of platelets as a potential cause of irreversible aggregation is discussed, as well as possible versions for explaining the results of aggregometry, when reversible platelet aggregation is observed.

**Key words:** aggregometry, reversible aggregation, platelets, calcium, secondary activation of platelets, aspirin, ADP, serotonin, adrenaline

Filkova A.A., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 120–129.  
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-120-129

Для поддержания нормального гемостаза (остановки кровотечения в случае повреждения сосуда) необходимы специализированные клетки крови – тромбоциты. Эти клетки способны адгезировать к поврежденным тканям и агрегировать друг с другом, образуя гемостатическую пробку, перекрывающую повреждение. Способность тромбоцитов к адгезии и агрегации определяется их специфическими мембранными гликопротеинами, в первую очередь интегрином  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , активирующимся при контакте тромбоцита с местом повреждения или при появлении растворимых активаторов. Среди активаторов тромбоцитов широко известны такие агонисты, как АДФ, тромбоксан А<sub>2</sub>, коллаген, тромбин. Они отличаются по механизму действия на тромбоцит и степени его активации, поэтому для качественной оценки функциональности тромбоцитов в клинической практике исследуют ответ тромбоцитов пациента на различные индукторы агрегации [1].

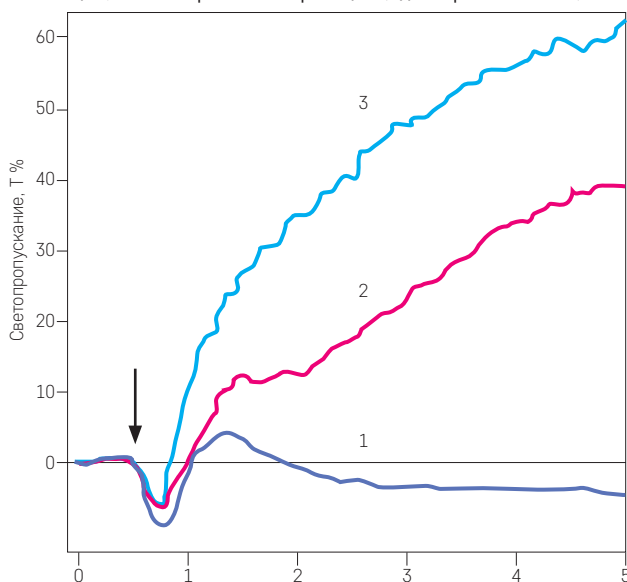
Наиболее распространенный в клинической практике тест активности тромбоцитов – агрегометрия [1]. Этот тест заключается в регистрации изменения прозрачности суспензии тромбоцитов после добавления в нее активатора, вызывающего «слипание» тромбоцитов – их агрегацию, и следовательно, увеличение светопропускания суспензии (рисунок 1). Чем быстрее образуются агрегаты, тем успешнее активировались тромбоциты. В большинстве лабораторий тест агрегометрии ставится в богатой тромбоцитами плазме, полученной из цельной крови, взятой на цитрат. При этом в среде значительно снижена концентрация свободных ионов кальция, что исключает влияние плазменного звена свертывания крови на работу тромбоцитов. Типичные агрегационные кривые цитратной плазмы имеют необратимый характер, часто – с характерным перегибом, обозначающим момент второй волны активации тромбоцитов (рисунок 1).

Однако в физиологических условиях агрегация тромбоцитов происходит в присутствии 1–2 мМ свободных ионов кальция (концентрация в плазме крови). Чтобы сохранить плазменную концентрацию кальция, но не инициировать свертывание плазмы крови при ее взятии, необходимо использовать другой антикоагулянт, например, гепарин, активирующий анти-тромбин III, который ингибирует основные ферменты свертывания. Альтернатива гепарину, в некоторых случаях способному активировать тромбоциты [3], – гирудин, прямой ингибитор тромбина. Альтернативой гепариновой (гирудиновой) плазме является постановка агрегометрии в суспензии отмытых тромбоцитов с добавлением в раствор фибриногена, при этом ионный состав раствора можно легко контролировать [4]. Интересно, что ответ тромбоцитов в присутствии ионов кальция слабее: на слабые индукторы (АДФ,

серотонин в комбинации с адреналином) наблюдается обратимая агрегация, как на низкие концентрации АДФ (рисунок 1, кривая 1).

#### Рисунок 1

Характерный агрегационный ответ на активацию АДФ богатой тромбоцитами плазмы, взятой на цитрат: 1 – обратимая агрегация на низкие концентрации АДФ; 2 – появление второй волны активации; 3 – необратимая агрегация (адаптировано из [2])



В настоящем обзоре рассмотрены известные механизмы дезагрегации тромбоцитарных агрегатов в присутствии и отсутствии кальция в среде. Обсуждается роль вторичной активации тромбоцитов как потенциальной причины необратимой агрегации, а также возможные варианты интерпретации результатов агрегометрии, в которой наблюдается обратимая агрегация тромбоцитов.

**Молекулярные механизмы агрегации тромбоцитов.** Начальный элемент в запуске тромбообразования – адгезия неактивированного тромбоцита к коллагену межклеточного матрикса, сначала через фактор Виллебранда, это становится возможным после повреждения стенок сосуда. Это высокомолекулярные белки, способные многократно связываться со своими рецепторами на поверхности тромбоцита. Во всех процессах адгезии и агрегации тромбоцитов задействованы трансмембранные гетеродимерные рецепторы – интегрины, состоящие из двух цепей ( $\alpha$  и  $\beta$ ) и способные к кластеризации. За адгезию (прикрепление) тромбоцита к коллагену отвечает рецептор  $\alpha_2\beta_1$ . Предполагается, что тромбоциты адгезируют к коллагену за счет данного рецептора, а затем активируются при дополнительном связывании коллагена с рецептором гликопротеином VI (GPVI). После активации тромбоцита в нем происходит синтез и секреция дополнительных активаторов (АДФ, тромбоксан А<sub>2</sub> и др.), которые могут активировать соседние тромбоциты. Внешне активация

тромбоцита выражается в изменении его формы за счет перестройки актинового цитоскелета.

Одно из важнейших следствий активации тромбоцита – переход специфичных для тромбоцита интегринов  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (гликопротеин IIb/IIIa) на мембране в активированное состояние. В этом состоянии рецептор способен связать полипептидную цепь белка фибриногена, через который идет связь двух активированных тромбоцитов, образуя «мостик». Связываясь друг с другом таким образом, тромбоциты способны агрегировать и образовывать устойчивый тромб.

Интересно, что образующийся в ответ на слабые активаторы (АДФ, серотонин) агрегат неустойчив и способен самопроизвольно разваливаться на одиночные тромбоциты или агрегаты меньших размеров [5]. Примечательно, что данный эффект наблюдается только при наличии кальция в среде [4]. Этот феномен был обнаружен в тесте агрегометрии.

**Диагностика функциональности тромбоцитов методом агрегометрии.** Тест на агрегацию тромбоцитов – широко распространенный и доступный способ оценки функциональности тромбоцитов, но при этом очень важно умение точно трактовать полученные в тесте результаты. Существует несколько разновидностей агрегометрии, которые отличаются по методу регистрации образования тромбоцитарных агрегатов, а также способу подготовки тромбоцитов для эксперимента. Наиболее распространенным методом регистрации агрегации остается турбидиметрический (от англ. *turbidity* – мутность) метод Борна и О'Брайена, основанный на изменении светопропускания [1]. В агрегометре луч света проходит через кювету с исследуемым образцом (суспензией тромбоцитов) и попадает на регистрирующий фотоэлемент. В начальный момент времени суспензия тромбоцитов, которая с постоянной

скоростью перемешивается магнитной мешалкой, содержит одиночные тромбоциты в концентрации от 150 до 400 тыс./мкл. При данных условиях луч света рассеивается; интенсивность света, доходящего до датчика, принимают за нулевой уровень (рисунок 2).

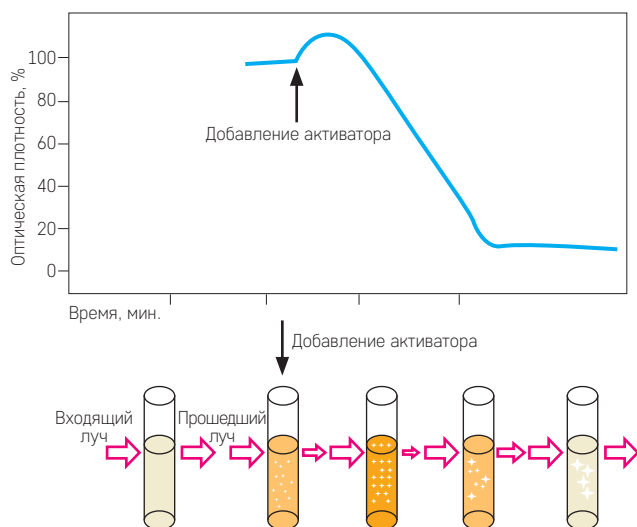
При добавлении к тромбоцитам активатора (в стандартном тесте агрегометрии это АДФ, тромбин, арахидоновая кислота, коллаген, ТХА2) происходит образование агрегатов из одиночных тромбоцитов; светопропускающая способность суспензии при этом растет, так как количество светорассеивающих центров уменьшается. За максимальный (100%-й) уровень агрегации тромбоцитов принимают светопропускающую способность раствора без тромбоцитов. Перед выполнением теста необходимо производить калибровку прибора. Для измерения агрегации в богатой тромбоцитами плазме контролем является бедная тромбоцитами плазма; для отмытых тромбоцитов – буферный раствор, в котором они ресуспендированы. Для количественного описания агрегации оценивают такие параметры, как максимальный уровень светопропускания и максимальная скорость агрегации (изменение уровня светопропускания за период времени).

С помощью турбидиметрического метода можно также наблюдать изменение формы тромбоцитов по некоторому снижению уровня светопропускания непосредственно после добавления агониста. Этот эффект хорошо различим для отмытых тромбоцитов при активации АДФ в отсутствие фибриногена (рисунок 3). Изменение формы при активации наблюдается в ответ на все агонисты, кроме адреналина [6].

Для регистрации слабых ответов на малые концентрации агонистов или спонтанной активации применяется метод флуктуаций светопропускания (ФСП метод) [7]. Относительная дисперсия ФСП

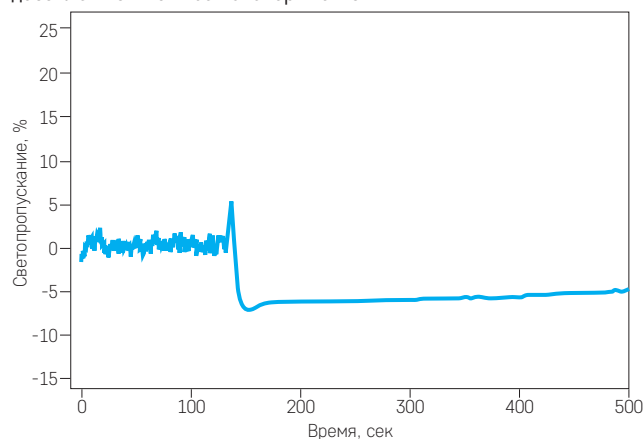
**Рисунок 2**

Схема исследования агрегации тромбоцитов на оптическом агрегометре по методу Борна и О'Брайена [1]



**Рисунок 3**

Изменение формы отмытых тромбоцитов в ответ на 5 мкМ АДФ в отсутствие фибриногена (собственные данные). Типичный результат для здорового донора. Отмывание тромбоцитов от белков плазмы проводилось тройным центрифугированием по методу, описанному ранее (26). Тромбоциты ресуспендированы в буфере Тирода (26) до концентрации 200 тыс./мкл; активатор добавлен на 120-й сек эксперимента



пропорциональна среднему количеству тромбоцитов в агрегате. Данный метод, в отличие от турбидиметрического анализа, чувствителен к маленьким агрегатам, состоящим из нескольких тромбоцитов (рисунки 4).

Используют также импедансный метод, основанный на изменении сопротивления суспензии тромбоцитов при пропускании через нее электрического тока. При опускании в цельную кровь электродов и активации тромбоцитов они «налипают» на поверхность электрода, что имитирует гемостатический сгусток на поверхности сосудистого повреждения. Данный метод считается наиболее приближенным к физиологическим условиям [8]. Однако, так как механизмы адгезии тромбоцитов к электродам отличаются от механизмов адгезии тромбоцитов друг к другу, обратимая агрегация в импедансном методе наблюдается крайне редко, поэтому мы не будем рассматривать здесь этот метод.

**Ответы на различные индукторы агрегации в агрегометрии.** В тесте агрегации для оценки функциональности тромбоцитов одного донора используют сразу несколько агонистов с целью получения полной картины тромбоцитарного ответа. В стандартный набор агонистов для теста входят АДФ, тромбин, адреналин, серотонин, коллаген, ТХА<sub>2</sub>, арахидоновая кислота. Каждый из перечисленных агонистов имеет специализированные рецепторы на мембране тромбоцита.

**АДФ** – один из основных физиологических индукторов активации – содержится в плотных грану-

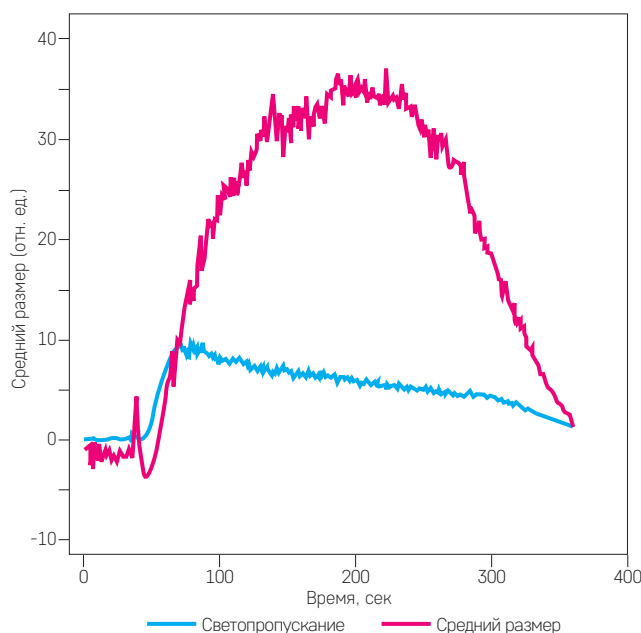
лах, а также выходит из поврежденных эритроцитов и других клеток. Он связывается с пуриnergическими рецепторами на тромбоците – P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> и P2X<sub>1</sub>, при этом P2X<sub>1</sub> мгновенно десенситизируется (считается, что в тесте агрегометрии он не работает). Специфичным для тромбоцита является ассоциированный с G<sub>i</sub>-белком рецептор P2Y<sub>12</sub>; связывание его с АДФ приводит к снижению концентрации АМФ в тромбоците, тем самым усиливая ответ и стабилизируя агрегаты. Одиночная активация данного рецептора приводит к слабой активации гликопротеина (ГП) IIb/IIIa; изменения формы тромбоцитов в ответ на этот рецептор не происходит [9]. P2Y<sub>12</sub>-индуцированная активация также запускает фосфоинозитидную сигнализацию, что ведет к частичной агрегации тромбоцитов у трансгенных P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup> мышей.

P2Y<sub>1</sub> – рецептор, ассоциированный с G<sub>q</sub>-белком; его активация приводит к запуску кальциевой сигнализации в тромбоците, изменению формы, активации интегринов и частичному выбросу гранул. Эксперименты на трансгенных мышах с увеличенной на 83% концентрацией рецептора P2Y<sub>1</sub> на мембране тромбоцита показали, что при увеличении рецепторов данного типа в ответ на АДФ наблюдается секреция гранул [10]. Это означает, что недостаточная концентрация P2Y<sub>1</sub> может объяснять слабый ответ тромбоцитов на АДФ.

Известно, что через некоторое время после активации тромбоцитов АДФ они становятся рефрактерными, что увеличивает риск кровоточивости

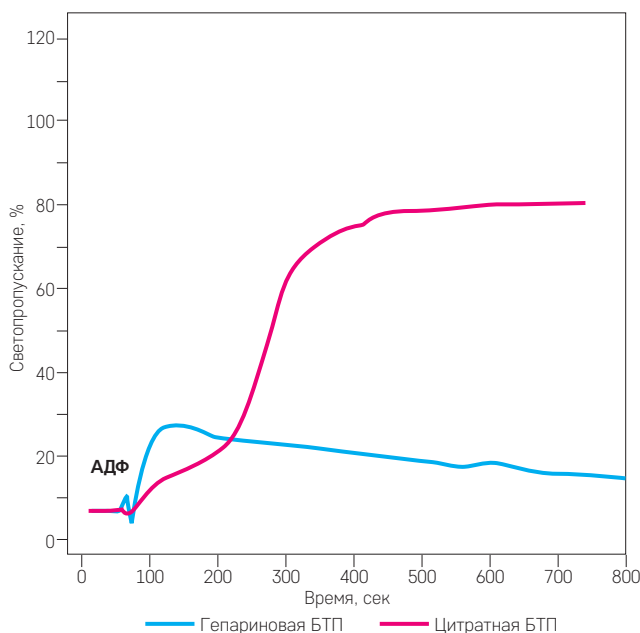
#### Рисунок 4

Оценка агрегации тромбоцитов турбидиметрическим (красная кривая) и методом оценки размера (ФСР, см. текст, синяя кривая) (собственные данные). Условия эксперимента аналогичны описанным в подписи к рисунку 3. Буфер Тирода дополнен 200 мкг/мл человеческого фибриногена; активатор (5 мкМ АДФ) добавлен на 35-й сек эксперимента



#### Рисунок 5

Агрегация тромбоцитов в ответ на 5 мкМ АДФ (собственные данные). Богатая тромбоцитами плазма (БТП) получена из цельной крови здоровых доноров путем центрифугирования (26). Концентрация тромбоцитов доведена до 200 тыс./мкл свободной от тромбоцитов плазмой из того же образца крови; активатор добавлен на 50-й сек эксперимента



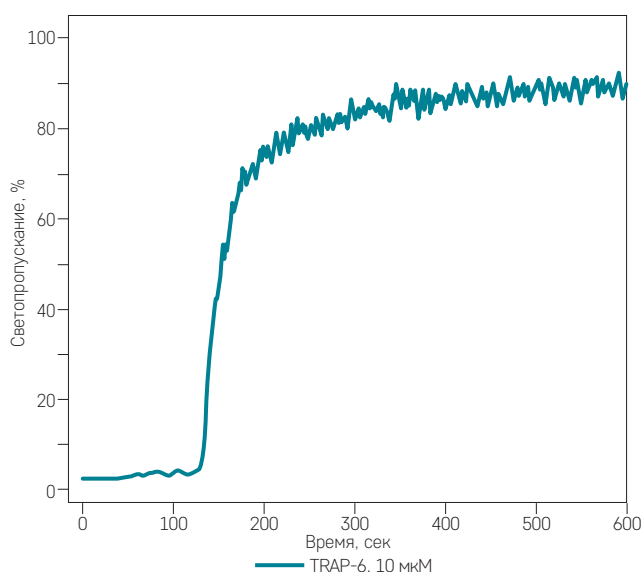
после операций. Этот эффект связывают с десенситизацией рецептора  $P2Y_1$  после его активации. Интересно, что  $P2Y_{12}$  при тех же условиях остается функциональным [11]. Выявлено, что оба рецептора после активации уходят внутрь тромбоцита, однако с разным характерным временем и с помощью разных механизмов. В результате часть рецепторов  $P2Y_{12}$  остается на мембране, что обуславливает его функциональность [12]. Оба типа рецептора играют важную роль в агрегации тромбоцитов [9].

АДФ – слабый активатор, в частности, для индуцирования агрегации АДФ необходимо наличие экзогенного фибриногена. В плазме, взятой на цитрат, наблюдается необратимая двухволновая агрегация, перед которой хорошо различимо изменение формы тромбоцита [13]. В суспензии тромбоцитов в присутствии в среде ионов кальция в ответ на АДФ наблюдается обратимая агрегация тромбоцитов (рисунки 5).

**Тромбин** – не только ключевой фактор плазменного каскада свертывания, он способен активировать тромбоциты через специальные рецепторы на поверхности: PAR-1 (*protease activated receptors* – рецепторы, активируемые протеазами), PAR-4, GPIIb-V-IX. PAR-4 вносит ощутимый вклад в активацию тромбоцитов в условиях ингибирования и десенситизации PAR-1 – главного высокоаффинного рецептора [14]. Для эффективной агрегации в ответ на тромбин не требуется наличия экзогенного фибриногена, так как при сильной активации тромбоциты секретируют значительное количество эндогенного белка.

#### Рисунок 6

Агрегация тромбоцитов в цитратной БТП в ответ на 10 мкМ TRAP-6 (собственные данные). Экспериментальная постановка аналогична описанной в подписи к рисунку 5; активатор добавлен на 125-й сек эксперимента



Тромбин – сильный активатор, вызывающий необратимую агрегацию с секрецией гранул (рисунки 6).

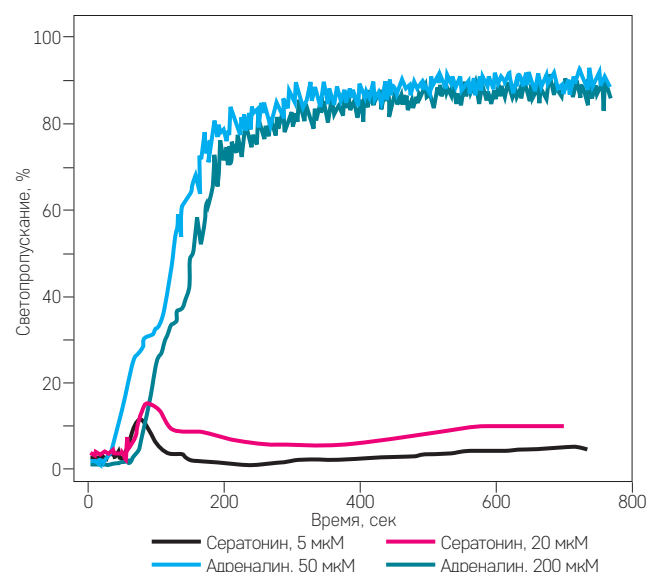
Тромбин используется для активации только отмытых тромбоцитов, так как в богатой тромбоцитами плазме (БТП) присутствует фибриноген – основная мишень тромбина в плазменном свертывании. При необходимости проведения теста в БТП либо при селективной активации рецепторов тромбина используют TRAP (*thrombin receptor activating peptides* – пептиды, активирующие рецептор тромбина).

**Адреналин** относится к слабым индукторам агрегации. Он действует на альфа-2 адренорецептор, ассоциированный с  $G_z$ -белком, предположительно вызывая ингибирование аденилат-циклазы. В цитратной БТП адреналин вызывает необратимую агрегацию [15], однако в БТП с физиологической концентрацией кальция агрегации не наблюдается. При этом в суспензии отмытых тромбоцитов ответ вариативный. Адреналин напрямую не изменяет вязкость внешней мембраны, не влияет на уровень внутриклеточного кальция, связывание фибриногена или фосфорилирование белков [15]. Однако при добавлении адреналина совместно с другим активатором данные процессы усиливаются. Таким образом, адреналин чаще используют как модулирующий агент, а не самостоятельный активатор.

**Серотонин** находится в плотных гранулах тромбоцитов и высвобождается из них после активации сильными агонистами. Он специфичен к 5HT<sub>2A</sub>-рецепторам и является слабым агонистом, который поддерживает ответ остальных индукторов агрегации.

#### Рисунок 7

Агрегация тромбоцитов в цитратной БТП в ответ на 5–20 мкМ серотонина либо 5–20 нг/мл адреналина (собственные данные). Экспериментальная постановка аналогична описанной в подписи к рисунку 5; активаторы добавлены до 20-й сек эксперимента





ции. Самостоятельно способен вызывать обратимую агрегацию (рисунк 7) [16, 17].

**Коллагены всех типов** локализованы в разных слоях сосудистой стенки. Рецепторами служат ГП VI и ГП Ib/IIa. Коллагены I и III типов – сильные активаторы, они стимулируют секрецию гранул и синтез ТХА2. Для эффективной агрегации в ответ на коллаген не требуется наличия экзогенного фибриногена [18, 19].

**Синтез ТХА2** запускается при кальций-зависимой активации фосфолипазы А2. Его рецептором является TP-рецептор (*Thromboxane Prostanoid* – тромбоксановый простаноидный). В связи с тем что ТХА2 – нестабильное короткоживущее соединение, в экспериментах используют его стабильный аналог – U46619 либо арахидоновую кислоту, которая в тромбоците превращается в ТХА2 под действием циклооксигеназы. Данные агонисты считаются сильными и способны вызывать необратимую агрегацию в отсутствие экзогенного фибриногена [20, 21]. Многообразие путей активации обеспечивает большой запас прочности для реакции активации и последующей агрегации тромбоцитов. Для полноценной оценки функциональности клетки в тесте агрегометрии необходимо видеть всю картину ответов тромбоцита. Важную роль приведенных выше активаторов подтверждают эксперименты по агрегометрии в присутствии ингибиторов рецепторов тромбоцита к ним.

У пациентов, принимающих антагонисты P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, ацетилсалициловую кислоту, регистрируют

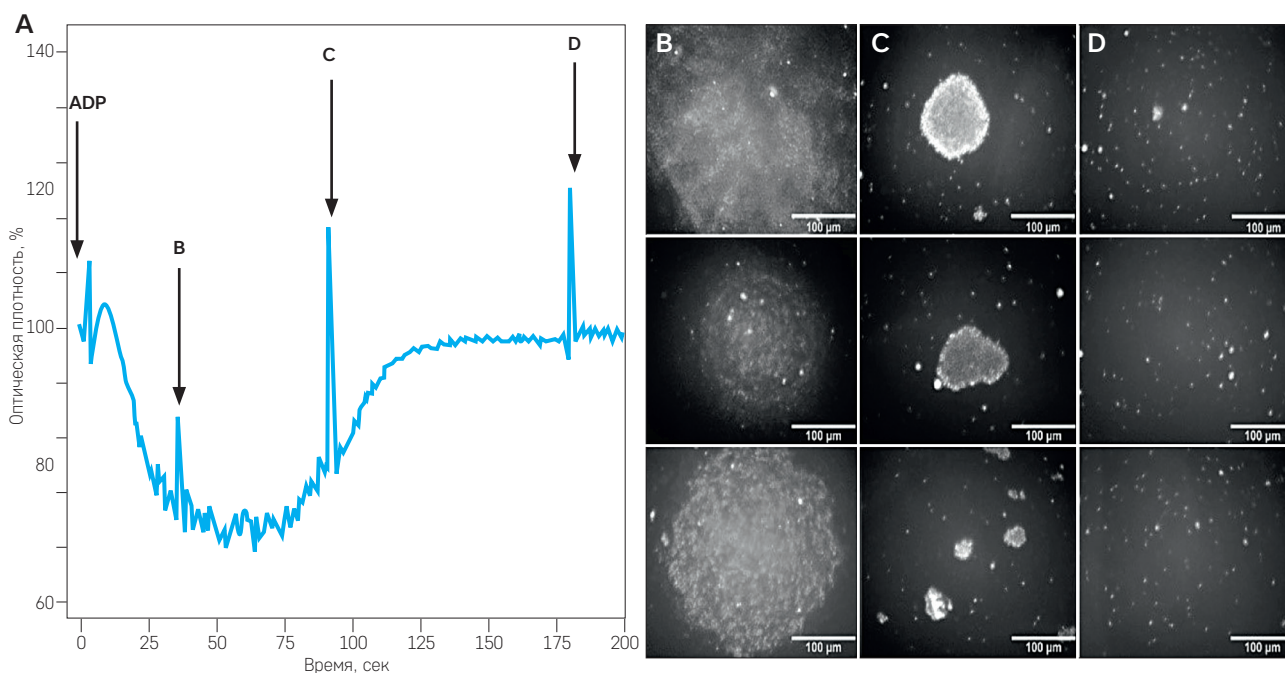
подавление агрегации, изменение необратимой агрегации на обратимую. Эффект ослабления агрегационной способности используется при назначении пациентам комплексного приема лекарств [22, 23]. При этом антагонисты рецептора ГП IIb/IIIa полностью подавляют агрегацию тромбоцитов.

**Вариации агрегометрии.** В большинстве лабораторий агрегометрию смотрят на богатой тромбоцитами плазме, взятой на цитрат. Однако в такой постановке, во-первых, присутствуют белки плазменного звена свертывания крови, которые могут повлиять на активацию тромбоцитов, во-вторых, снижена концентрация ионов кальция, необходимых для нормального связывания фибриногена с интегринами.

Чтобы исключить влияние составляющих плазмы, тромбоциты отмывают от белков плазмы. Наиболее распространены два подхода к отмыванию тромбоцитов: гель-фильтрация и серия последовательных центрифугирований. В первом случае используют метод хроматографии на колонке с сефарозой 2В [24]. Это позволяет полностью очистить тромбоциты от белков плазмы, ассоциированных с ними (фактор Виллебранда, фибриноген, факторы свертывания плазмы и др.), однако практически всегда приводит к небольшой активации тромбоцитов. При втором подходе богатая тромбоцитами плазма центрифугируется при пониженном значении pH (6,5), после этого осадок ресуспендируется в буферном растворе, содержащем ингибиторы активации тромбоцитов (простациклин, апираза и др.), – этот процесс про-

## Рисунок 8

Характерный вид агрегатов тромбоцитов в кювете агрегометра [26, адаптировано]: агрегация гирудиновой БТП инициировалась 2 мкМ АДФ в начальный момент времени (А); в моменты времени В–D из кюветы забирали 5 мкл суспензии для непосредственного анализа на темнопольном микроскопе (В–D); в точке В обычно наблюдались большие агрегаты (диаметром > 100 мкм); в точке С – средние (диаметром 20–100 мкм); после полной деагрегации (D) наблюдались отдельные тромбоциты и маленькие агрегаты (диаметром < 10 мкм)



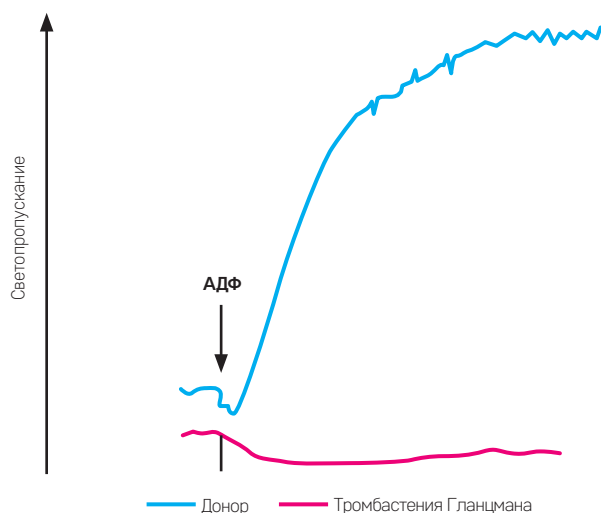
исходит 1–2 раза [4]. Однако при отмывании тромбоцитов даже самым щадящим методом их ответ на агрегацию все равно существенно ниже, чем ответ БТП на те же концентрации агониста. По-видимому, процесс отмывания тромбоцитов вне зависимости от используемого протокола влияет на активацию тромбоцитов [4].

Независимо от протокола работы в ответ на АДФ в присутствии ионов кальция в среде наблюдается обратимая агрегация тромбоцитов. При наблюдении суспензии тромбоцитов под микроскопом было подтверждено, что снижение светопропускания соответствует дезагрегации тромбоцитов (рисунк 8). Обратимая агрегометрия наблюдается в ответ на такие слабые активаторы, как серотонин, АДФ, либо на комплекс адреналин + серотонин в присутствии кальция. Считается, что при обратимой агрегации не происходит второй волны активации тромбоцитов, то есть не идет секреция гранул со вторичными активаторами и/или не происходит синтеза тромбоксана. Роль секреции гранул показана в эксперименте с обратимой агрегацией в ответ на тромбин при ингибировании АДФ [25].

На данный момент существует несколько гипотез молекулярного механизма обратимой агрегации [26]. Согласно одной из них, в отсутствие ионов кальция синтезируется тромбоксан A<sub>2</sub>, который дополнительно активирует тромбоциты и поддерживает рецепторы ГП IIb/IIIa в активированном состоянии, что не дает агрегату развалиться. При наличии кальция в среде синтез тромбоксана A<sub>2</sub> частично ингибируется, рецепторы не поддерживаются в активированном состоянии, сгусток разваливается на отдельные тромбоциты [27]. Другая теория основана на том, что у ГП IIb/IIIa существует промежуточная конформация,

#### Рисунок 9

Отсутствие агрегационного ответа на АДФ у пациента с тромбастенией Гланцмана (ТГ) по сравнению со здоровым донором [2]



с которой фибриноген может связываться обратимо. За счет этого при высоких скоростях перемешивания суспензии тромбоцитов связи в агрегатах недостаточно сильны, и агрегат разваливается на одиночные тромбоциты. Третья теория: АДФ перестает поддерживать тромбоциты в активированном состоянии, так как происходит десенситизация рецептора P2Y<sub>1</sub> и частично P2Y<sub>12</sub> [12].

#### Типичные результаты агрегометрии, наблюдаемые при тромбоцитопатиях

**Тромбастения Гланцмана** — это врожденный дефицит или дисфункция гликопротеина IIb/IIIa, аутосомно-рецессивное заболевание, которое сопровождается кровотечениями кожи и слизистых оболочек. Агрегационный ответ наблюдается только при добавлении высоких доз ристоцетина (рисунки 9, 10) [28], что подтверждает ключевую роль ГП IIb/IIIa в агрегации тромбоцитов.

**Синдром Бернара–Сулье** — врожденный дефицит или дефект комплекса гликопротеинов Ib/IX/V тромбоцитов; наследуется как аутосомно-рецессивный признак с тяжелыми кровотечениями. Агрегация тромбоцитов в норме при индукции АДФ, коллагена, адреналина и арахидоновой кислоты, но отсутствует после добавления ристоцетина (рисунк 10) [28].

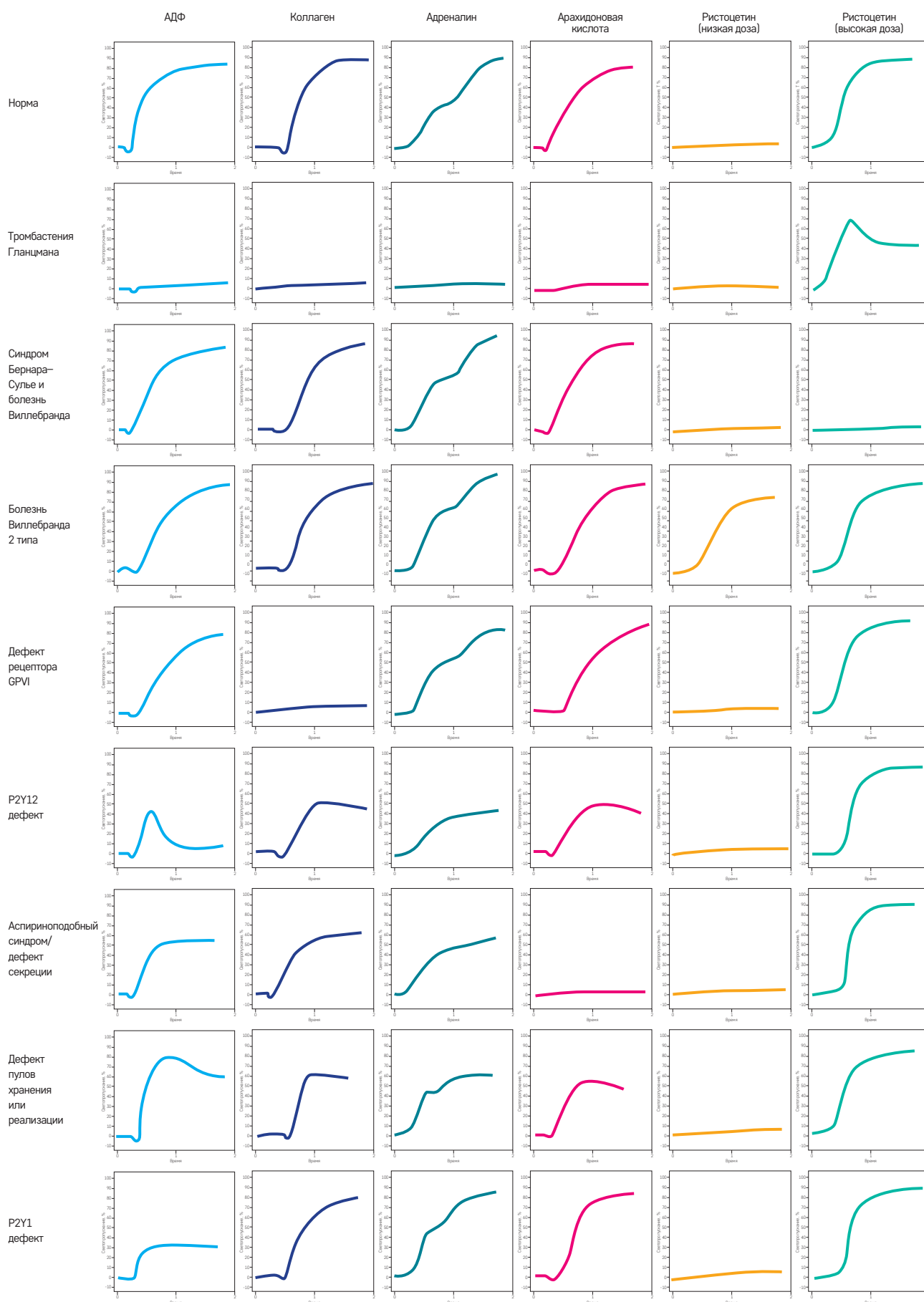
**Болезнь Виллебранда** характеризуется генетическими мутациями, приводящими к количественным и/или качественным изменениям фактора Виллебранда и угнетению реакций тромбоцитов, зависящих от взаимодействий с этим белком. При данном заболевании рекомендуется проведение импедансной агрегометрии с ристоцетином [8].

**Дефекты секреции** могут быть обусловлены либо дефицитом тромбоцитарных гранул, либо дефектом в сигнальном пути, регулирующем секрецию и агрегацию тромбоцитов. Дефект плотных гранул наблюдается при синдромах Чедиака–Хигаси, Германского–Пудлака. Агрегационный ответ снижается в ответ на АДФ, адреналин и коллаген, при этом агрегация с ристоцетином в норме [8]. При дефиците α-гранул («синдром серых тромбоцитов»), когда α-гранулы отсутствуют или их число снижено, нарушена коллаген-индуцированная агрегация. При дефекте α-гранул нарушен белковый состав этих гранул и снижена адреналин-индуцированная агрегация [29]. На рисунке 10 видно, что при нарушениях секреции гранул необратимая агрегация сменяется на обратимую в ответ на АДФ и арахидоновую кислоту, значит, обратимая агрегация сигнализирует об отсутствии вторичной активации тромбоцитов.

Агрегометрия — тест, чувствительный к начальной концентрации тромбоцитов; агрегационный ответ пропорционально возрастает при увеличении концентрации тромбоцитов [30], поэтому при проведении

# Рисунок 10

Типичные кривые агрегометрии в цитратной плазме в ответ на индукторы агрегации у пациентов с различными заболеваниями (по оси ординат – светопропускание; по оси абсцисс – время) [28]





теста у пациентов с тромбоцитозом рекомендуется разбавлять богатую тромбоцитами плазму до стандартных значений. При тромбоцитопении ответ на все индукторы агрегации снижен [31]. При сильном снижении концентрации тромбоцитов (менее 100 тыс. клеток в 1 мкл) агрегационная кривая уже не достоверна; рекомендуется оценивать агрегацию по среднему размеру агрегатов (ФСП метод) с помощью таких агрегометров, как Биола [32].

При исследовании приобретенных тромбоцитопатий у детей 3–14 лет выявлено снижение степени агрегации по сравнению со взрослыми пациентами: в тестах с АДФ снижение наблюдалось у 70% детей; в тестах с адреналином – у 80%. При этом у 60% детей выявили комбинированные нарушения. При использовании в качестве индуктора агрегации ристоцетина показатель степени агрегации был в пределах нормы [33]. У здоровых детей не выявлено различий в агрегации цитратной богатой тромбоцитами плазмы в зависимости от возраста, однако нам известно только одно подобное сообщение; необходимо провести сравнение с данными из других лабораторий [34].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе анализа агрегационного ответа тромбоцитов у пациентов с различными заболеваниями можно сделать предположение о механизмах обра-

тимой агрегации тромбоцитов. Дезагрегация тромбоцитов с течением времени наблюдается при отсутствии вторичной активации тромбоцитов, а также в присутствии аспирина либо при лечении аспирином. Таким образом, выявляется зависимость необратимой, устойчивой агрегации тромбоцитов от синтеза тромбоксана А2. В присутствии ионов кальция в ответ на АДФ и серотонин в комбинации с адреналином всегда наблюдается обратимая агрегация, это говорит о том, что синтез тромбоксана А2 в присутствии ионов кальция подавлен.

Исследование механизмов обратимой агрегации важно для оценки получаемых данных агрегации у пациентов, по результатам которых можно предположить дефекты в пути синтеза тромбоксана А2 и вторичной активации тромбоцитов.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФ 17-74-20045.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ORCID

Filkova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0448-3981>

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

Sveshnikova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

## Литература

- BORN G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature England* 1962 Jun; 194: 927–9.
- Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. Литтерра, 2011.
- Gao C., Boylan B., Fang J., Wilcox D.A., Newman D.K., Newman P.J. Heparin promotes platelet responsiveness by potentiating  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -mediated outside-in signaling. *Blood American Society of Hematology* 2011 May 5; 117 (18): 4946–52.
- Cazenave J.-P., Ohlmann P., Cassel D., Eckly A., Hechler B., Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol. United States* 2004; 272: 13–28.
- Zhou L., Schmaier A.H. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma: Description of Procedures With the Aim to Develop Standards in the Field. *Am J Clin Pathol* 2005 Jan 2; 123 (2): 172–83.
- Singh S., Malm C.J., Ramström S., Hesse C., Jeppsson A. Adrenaline enhances in vitro platelet activation and aggregation in blood samples from ticagrelor-treated patients. *Res Pract Thromb Haemost. John Wiley and Sons Inc* 2018 Sep; 30 (4): 718–25.
- Мансуровна Р.Д. Методы определения спонтанной агрегации тромбоцитов. *Вестник современной клинической медицины* 2017; 3.
- Saniabadi A.R., Lowe G.D., Forbes C.D., Prentice C.R., Barbenel J.C. Platelet aggregation studies in whole human blood. *Thromb Res United States* 1983 Jun; 30 (6): 625–32.
- Kauffenstein G., Bergmeier W., Eckly A., Ohlmann P., Leon C., Cazenave J.P., et al. The P2Y<sub>12</sub> receptor induces platelet aggregation through weak activation of the  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  integrin – a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett England* 2001 Sep; 505 (2): 281–90.
- Hechler B., Zhang Y., Eckly A., Cazenave J.-P., Gachet C., Ravid K. Lineage-specific overexpression of the P2Y<sub>1</sub> receptor induces platelet hyper-reactivity in transgenic mice. *J Thromb Haemost England* 2003 Jan; 1 (1): 155–63.
- Baurand A., Raboisson P., Freund M., Leon C., Cazenave J.P., Bourguignon J.J., et al. Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist. *Eur J Pharmacol Netherlands* 2001 Feb; 412 (3): 213–21.
- Baurand A., Eckly A., Hechler B., Kauffenstein G., Galzi J.-L., Cazenave J.-P., et al. Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? *Mol Pharmacol United States* 2005 Mar; 67 (3): 721–33.

13. Li Z., Zhang G., Le Breton G.C., Gao X., Malik A.B., Du X. Two waves of platelet secretion induced by thromboxane A2 receptor and a critical role for phosphoinositide 3-kinases. *J Biol Chem United States* 2003 Aug; 278 (33): 30725–31.
14. Duvernay M., Young S., Gailani D., Schoenacker J., Hamm H.E. Protease-activated receptor (PAR) 1 and PAR4 differentially regulate factor V expression from human platelets. *Mol Pharmacol United States* 2013 Apr; 83 (4): 781–92.
15. Lanza F., Beretz A., Stierle A., Hanau D., Kubina M., Cazenave J.P. Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. *Am J Physiol United States* 1988 Dec; 255 (6 Pt 2): H1276–88.
16. Cerrito F., Lazzaro M.P., Gaudio E., Arminio P., Aloisi G. 5HT<sub>2</sub>-receptors and serotonin release: their role in human platelet aggregation. *Life Sci Netherlands* 1993; 53 (3): 209–15.
17. Abajo F. Effects of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors on Platelet Function Mechanisms. *Clinical Outcomes and Implications for Use in Elderly Patients* 2011; 28: Drugs & aging: 345–67 p.
18. Roberts D.E., McNicol A., Bose R. Mechanism of Collagen Activation in Human Platelets *J Biol Chem* 2004 May 7; 279 (19): 19421–30.
19. Puett D., Wasserman B.K., Ford J.D., Cunningham L.W. Collagen-mediated platelet aggregation. Effects of collagen modification involving the protein and carbohydrate moieties. *J Clin Invest* 1973 Oct; 52 (10): 2495–506.
20. Paul B.Z., Jin J., Kunapuli S.P. Molecular mechanism of thromboxane A<sub>2</sub>-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem. United States* 1999 Oct; 274 (41): 29108–14.
21. Hirata T., Ushikubi F., Kakizuka A., Okuma M., Narumiya S. Two thromboxane A<sub>2</sub> receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest United States* 1996 Feb; 97 (4): 949–56.
22. Hechler B., Leon C., Vial C., Vigne P., Frelin C., Cazenave J.P., et al. The P2Y<sub>1</sub> receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood United States* 1998 Jul; 92 (1): 152–9.
23. Baurand A., Eckly A., Bari N., Leon C., Hechler B., Cazenave J.P., et al. Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y<sub>1</sub> and P2cyc receptors. *Thromb Haemost Germany* 2000 Sep; 84 (3): 484–91.
24. Fine K.M., Ashbrook P.C., Brigden L.P., Maldonado J.E., Didishelm P. Gel-filtered human platelets. Ultrastructure, function, and role of proteins in inhibition of aggregation by aspirin. *Am J Pathol* 1976 Jul; 84 (1): 11–24.
25. Trumel C., Payraastre B., Plantavid M., Hechler B., Viala C., Presek P., et al. A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood United States* 1999 Dec; 94 (12): 4156–65.
26. Filkova A.A., Martyanov A.A., Garzon Dasgupta A.K., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments *Sci Rep* 2019; 9 (1): 6217.
27. Ni R., Vaezzadeh N., Zhou J., Weitz J.I., Cattaneo M., Gross P.L. Effect of Different Doses of Acetylsalicylic Acid on the Antithrombotic Activity of Clopidogrel in a Mouse Arterial Thrombosis Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol United States* 2018 Oct; 38 (10): 2338–44.
28. Столяр М.А., Ольховский И.А. К вопросу определения границ нормальной реакции тромбоцитов в тесте импедансной агрегометрии. *Клиническая лабораторная диагностика* 2016; 6.
29. Савченко А.П., Медведев И.Н. Механизмы функционирования тромбоцитарного гемостаза. *Фундаментальные исследования* 2009; 10.
30. Coêlho M.J.D., Monteiro T. de C., Vasquez F.G., Silva K.L.T., Dos Santos K.S.B., de Oliveira V.M.A., et al. Platelet aggregation and quality control of platelet concentrates produced in the Amazon Blood Bank. *Rev Bras Hematol Hemoter. Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2011; 33 (2): 110–4.
31. Rocca B., Bellacosa A., De Cristofaro R., Neri G., Della Ventura M., Maggiano N., et al. Wiskott-Aldrich syndrome: report of an autosomal dominant variant. *Blood United States* 1996 Jun; 87 (11): 4538–43.
32. Козловский В.И., Ковтун О.М., Сепухова О.П., Детковская И.Н., Козловский И.В. Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. *Фокус на спонтанную агрегацию. Вестник ВГМУ* 2013; 4.
33. Ходулева С.А., Зайцева Л.П., Ромашевская И.П. Некоторые аспекты диагностики тромбоцитопатий у детей. *Проблемы здоровья и экологии* 2007; 4: 34–8.
34. Bonduel M., Frontroth J.P., Hepner M., Sciuccati G., Feliu-Torres A. Platelet aggregation and adenosine triphosphate release values in children and adults. Vol. 5, *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH England*; 2007: 1782–3.