

«Укутанные» тромбоциты – НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ лабораторной диагностики нарушений тромбообразования

А.А. Шабалина, М.В. Костырева, М.М. Танамян

ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва)

Обрисованы основные диагностические ориентиры использования методики определения субпопуляции «укутанных» тромбоцитов. Повышение их уровня более 45% ассоциируется с протромботическим потенциалом сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза и может быть предиктором развития тромботических состояний, повторных инсультов и ТИА, тогда как их сниженный (менее 20%) уровень – маркером развития кровотечений.

Ключевые слова: «укутанные» тромбоциты, гиперкоагуляция, тромбоз, предикторы тромбообразования.

Введение

Рост числа тромбозов, обычно резко ухудшающих течение заболевания, отмечается в разных областях медицины, делая более актуальными проблемы ранней диагностики и исследования предикторов нарушения тромбообразования.

Оценка состояния гемостаза и исследование факторов риска как тромботических, так и геморрагических состояний – одна из самых сложных диагностических проблем. В задачи лабораторной диагностики входит не только исследование уже известных показателей сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и стандартных коагулологических тестов, но и разработка, автоматизация и совершенствование новых методов определения биомаркеров нарушений гемостаза. По результатам современных исследований, таким новым маркером – предиктором нарушения тромбообразования можно считать наличие в крови пациентов субпопуляции активированных коллагеном и тромбином прокоагулянтных или так называемых «укутанных» тромбоцитов, поддерживающих прокоагулянтную активность крови, известных как СОАТ-platelets [11, 25, 28, 29, 32].

Физиология гемостаза. Общие представления

В нормальных условиях гемостаз обеспечивается тремя функционально-структурными компонентами:

1. Стенка кровеносных сосудов.
2. Клетки крови, в основном тромбоциты.
3. Ферментные и неферментные системы плазмы.

Особенно тесно связаны между собой первые два компонента, которые обеспечивают один механизм гемостаза – первичный (сосудисто-тромбоцитарный), потому что он первым включается в остановку кровотечения (рис. 1).

Первая волна агрегации тромбоцитов начинается с адгезии (приклеивания) рецепторами гликопротеинов I и II тромбоцитов к фактору Виллебранда, фибронектину и коллагену субэндотелия поврежденных (в т.ч. поврежденных атеро-

склеротической бляшкой) сосудов. Вторая волна агрегации тромбоцитов обусловлена высвобождением АДФ из плотных гранул тромбоцитов, образованием тромбосана А2 в их мембране, взаимодействием мембранных гликопротеинов IIb и IIIa рецепторов тромбоцитов с фибриногеном. При этом большую часть второй волны агрегации тромбоцитов обеспечивают тромбосан А2 и тромбин.



Нормальные тромбоциты в кровотоке



Изменение формы, вазоконстрикция, адгезия тромбоцитов к поврежденному эндотелию и активация



Агрегация тромбоцитов и тромбообразование



Формирование тромбоцитарного агрегата

рис. 1. Сосудисто-тромбоцитарный (первичный) гемостаз.

Однако однозначного определения функций и механизма действия «укутанных» тромбоцитов пока не существует. Это связано с тем, что при активации тромбоцитов различными агонистами отделяющаяся субпопуляция не всегда имеет фиксированный набор свойств, отличающих ее от остальных тромбоцитов. Чаще всего «укутанными» – проагрегантными тромбоцитами называют субпопуляцию клеток с большим количеством α -гранулярных белков и фосфатидилсерина на поверхности, появляющуюся при сильной активации тромбоцитов (тромбином, конвульксином, тромбином с конвульксином) [3, 8, 11, 13, 19, 22, 29, 33].

В литературе можно встретить и другие названия «укутанных» тромбоцитов: некротические тромбоциты [13], SCIP-тромбоциты (тромбоциты, индуцированные повышенной концентрацией внутриклеточного кальция) [16], прокоагулянтные тромбоциты [10] (рис. 3, 4).

Общеизвестна иницирующая роль тромбоцитов в процессах свертывания крови. Однако именно «укутанные» тромбоциты способны в большей степени удерживать на своей поверхности не только белки α -гранул, но и белки свертывания крови: факторы VIII, VIIIa, IX, IXa, и именно на поверхности прокоагулянтных тромбоцитов происходят основные реакции плазменного звена системы свертывания крови [14, 17, 20, 33]. Иначе говоря, на поверхности «укутанных» тромбоцитов происходит «стыковка» тромбоцитарно-сосудистого и плазменного звеньев гемостаза, что указывает на физиологическую важность прокоагулянтных тромбоцитов.

Таким образом, открытие гетерогенности активированных тромбоцитов усложнило понимание их участия в процессах свертывания крови. Анализ мировой литературы показывает, что реально в свертывании участвует лишь несколько процентов активированных тромбоцитов, остальные же по своим прокоагулянтным качествам не отличаются от неактивированных [7, 19, 21]. При этом особенностью прокоагулянтных тромбоцитов считалась их неспособность к агрегации в основном из-за отсутствия у них активированных рецепторов GPIIb/IIIa [7, 8, 13, 16, 18]. Так, в 2004 г. С. Кулкарни и С. Джексон показали, что образование прокоагулянтных тромбоцитов в монослое, сформированном на поверхности, ухудшает адгезию к ним неактивированных тромбоцитов. С помощью конфокального микроскопа они исследовали рост тромба при прокачивании цельной крови с добавленным антикоагулянтом через микрокапилляры с покрытыми коллагеном стенками. Ингибирование образования «укутанных» тромбоцитов приводило к существенному увеличению скорости и степени роста тромба [16].

Однако в недавней работе А.О. Якименко и соавт. было показано возможное вовлечение «укутанных» тромбоцитов в агрегаты за счет связывания свободных концов молекул фибриногена прокоагулянтных тромбоцитов активированными гликопротеиновыми рецепторами GPIIb/IIIa на поверхности непрокоагулянтных тромбоцитов [34]. Таким образом, еще одной важной функцией белкового покрытия «укутанных» тромбоцитов является их участие в формировании тромбоцитарной пробки [9, 14, 28].

Методы исследования «укутанных» тромбоцитов

Учеными разработан ряд методов исследования уровня, функций, взаимодействий субпопуляций и структуры белкового покрытия «укутанных» тромбоцитов. Для внед-

рения в повседневную лабораторную практику наиболее подходят методы исследования количества «укутанных» тромбоцитов с использованием проточной цитофлуориметрии.

Методы отличаются:

- различными флуоресцентно-мечеными антителами;
- активаторами тромбоцитов (тромбин, коллаген, конвульксин, тромбин+конвульксин);
- выделением тромбоцитов (при помощи гель-фильтрации или исследованием богатой тромбоцитами плазмы).

Клинические области применения методики определения «укутанных» тромбоцитов

У здоровых доноров уровень прокоагулянтных тромбоцитов варьирует в среднем от 30 до 33% [23].

На сегодняшний день основными диагностическими модальностями в ангионеврологии являются методы ангионейровизуализации [6]. При этом было установлено, что определение уровня прокоагулянтных тромбоцитов в сочетании с ультразвуковым исследованием брахиоцефальных артерий может повысить чувствительность и диагностическую точность прогноза развития атеротромботического инсульта по сравнению с моделью, учитывающей только наличие стеноза по ультразвуковым критериям. При этом статистическим анализом был определен пороговый уровень 45% как пограничный для прокоагулянтных тромбоцитов в комбинации со стенозом более 50% для прогнозирования развития инсульта или ТИА. Чувствительность этого метода составляет 0,78, специфичность – 0,92 [15, 26].

Пациентов со стенозом более 50% относят к группе низкого риска развития инсульта или ТИА, если уровень «укутанных» тромбоцитов у них менее 45%, и в категорию высокого риска, если уровень «укутанных» тромбоцитов выше 45%. Эти данные демонстрируют, что уровень «укутанных» тромбоцитов можно расценивать, как потенциальный биомаркер для прогнозирования развития инсульта или ТИА у пациентов с асимптомными и симптомными каротидными стенозами.

В ряде работ проводилась оценка клинического значения повышенного уровня «укутанных» тромбоцитов у пациентов с ишемическим инсультом. Было показано, что увеличение их количества более чем на 50% – предиктор развития повторных атеротромботических инсультов [24, 26].

Важным патогенетическим фактором развития ишемического инсульта по типу гемореологической микроокклюзии являются миелопролиферативные заболевания [2]. Показано, что «укутанные» тромбоциты варьируют у больных с миелопролиферативными заболеваниями от 2 до 55%, однако их более высокие уровни (40–55%) наблюдаются у пациентов, в анамнезе которых есть артериальные и венозные тромбозы [12, 28, 31].

Актуальность прогноза различных геморрагических осложнений в ангионеврологии также очень важна, в т.ч. при планировании тромболитической терапии. Показано, что сниженный до 20% уровень прокоагулянтных тромбоцитов коррелирует с геморрагическими осложнениями ишемического инсульта и может быть использован как прогностический маркер геморрагии [25]. Также было обнаружено,

что при геморрагических инсультах уровень «укутанных» тромбоцитов значительно снижен [24, 25]. Статистический анализ выявил, что у больных с геморрагическими осложнениями снижение уровня «укутанных» тромбоцитов ниже 27% ассоциируется со смертельным исходом в течение 30 дней [27].

Заключение

Таким образом, обрисованы основные диагностические ориентиры использования методики определения субпопуляции «укутанных» тромбоцитов. Повышение их уровня более 45% ассоциируется с протромботическим потенциалом сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза и может быть предиктором развития тромботических состояний,

повторных инсультов и ТИА, тогда как их сниженный (менее 20%) уровень – маркером развития кровотечений.

Данная технология исследования уровня «укутанных» тромбоцитов, не являясь очень трудоемкой, может служить новым дополнительным критерием оценки риска развития тромботических и/или геморрагических состояний и использоваться в лабораторной диагностике гемостаза. Определение этого показателя может быть внесено в программы обследований пациентов с рисками развития тромбозов или кровотечений. Вместе с тем необходимы дальнейшие исследования количественных, качественных и функциональных характеристик «укутанных» тромбоцитов для уточнения их прогностической значимости с лечебной и профилактической целями.

Список литературы

1. Козинец Г.И., Макаров В.А. Исследование системы крови в клинической практике. М.: Триада-Х, 1998; 454–455.
2. Танашиян М.М., Кузнецова П.И., Лагода О.В. и др. Миелопролиферативные заболевания и ишемический инсульт. *Анналы клинич. и эксперим. неврологии*. 2014; 8 (2): 41–45.
3. Alberio L., Safa O., Clemetson K.J. et al. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets. Effects of ionophore A23187, thrombin, collagen and convulxin. *Blood* 2000; 95: 1694–1702.
4. Behnke O., Forer A. Blood platelet heterogeneity. Evidence for two classes of platelets in man and rat. *Br J Haematol* 1993; 84: 686–693.
5. Behnke O. Blood platelet heterogeneity: a functional hierarchy in the platelet population. *Br J Haematol* 1995; 91: 991–999.
6. Brott T.G., Halperin J.L., Abbara S. et al. 2011 ASA/ACCF/AHA/AANN/AANS/ACR/ASNR/CNS/SAIP/SCAI/SIR/SNIS/SVM/SVS Guideline on the Management of Patients With Extracranial Carotid and Vertebral Artery Disease A Report of the American College of Cardiology With the American Academy of Neurology and Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2011. 57 (8): e16–94.
7. Dale G.L., Friese P., Batar P. et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature* 2002, 415: 175–179.
8. Dale G.L., Friese P., Batar P. et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature* 2002; 415: 175–179. DOI: 10.1038/415175a/
9. Feng P., Tracy P.B. Not all platelets are equivalent procoagulants. *Blood* 1998; 92: 350a (Abstract).
10. Heemskerk J.W., Mattheij N.J., Cosemans J.M. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost*. 2012.
11. Heemskerk J.W.M., Vuist W.M.J., Feijge M.A.H et al. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca²⁺ responses. *Blood* 1997; 90: 2615–2625.
12. Holmes C.E., Bouchard B.A., Barbick R.R. et al. The existence of platelet subpopulations in patients with myeloproliferative disease: preliminary correlation with clinically abnormal hemostasis. *Blood* 2003; 102: 787a (Abstract).
13. Jackson S.P., Schoenwaelder S.M. Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood* 2010, 116: 2011–2018.
14. Kempton C.L., Hoffman M., Roberts H.R., Monroe D.M. Platelet heterogeneity: variation on coagulation complex on platelet subpopulations. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular. Biology* 2005, 25: 861–866.
15. Kirkpatrick A.C., Tafur A.J., Dale G.L., Prodan C.I. Coated-Platelets Improve Prediction of Stroke and Transient Ischemic Attack in Asymptomatic Internal Carotid Artery Stenosis Stroke. 2014 Oct; 45 (10): 2995–3001. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006492. Epub 2014 Sep 2.
16. Kulkarni S., Jackson S.P. Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin alphaIIb beta3 adhesive function and thrombus growth. *J Biol Chem*. 2004, 279 (29): 30697–30706.
17. London F.S., Marcinkiewicz M., Walsh P.N. A subpopulation of platelets responds to thrombin- or SFLLRN-stimulation with binding site for factor IXa. *Journ. of Biological Chem*. 2004, 279 (19): 19854–19859.
18. Mattheij N.J., Gilio K., Kruchten R.V. et al. Dual mechanism of integrin alphaIIb beta3 closure in procoagulant platelets. *J. Biol. Chem* 2013.
19. Munnix I.C., Kuijpers M.J., Auger J. et al. Segregation of platelet aggregatory and procoagulant microdomains in thrombus formation regulation by transient integrin activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007, 27: 1–7.
20. Panteleev 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. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005, 3: 2545–2553.
21. Patel D., Väänänen H., Jirousková M. et al. Dynamics of GPIIb/IIIa-mediated platelet-platelet interactions in platelet adhesion/thrombus formation on collagen in vitro as revealed by videomicroscopy. *Blood* 2003; 101: 929–936.
22. Pasquet J.M., Dachary-Prigent J., Nurden A.T. Microvesicle release is associated with extensive protein tyrosine dephosphorylation in platelets stimulated by A23187 or a mixture of thrombin and collagen. *Biochem J* 1998; 333: 591–599.
23. Pecci A., Carlo L. Balduini I Platelets & thrombopoiesis: Desmopressin and super platelets March 20, 2014; *Blood*: 123 (12).
24. Prodan C.I., Joseph P.M., Vincent A.S., Dale G.L. Coated-platelets in ischemic stroke: differences between lacunar and cortical stroke. *J Thromb Haemost*. 2008 Apr; 6 (4): 609–614. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02890.x. Epub 2008 Jan 8.
25. Prodan C.I., Stoner J.A., Cowan L.D., Dale G.L. Lower coated-platelet levels are associated with early hemorrhagic transformation in patients with non-lacunar brain infarction *Journ. of Thrombosis and Haemostasis* Volume 8, Issue 6, p. 1185–1190, June 2010.
26. Prodan C.I., Stoner J.A., Cowan L.D., Dale G.L. Higher coated-platelet levels are associated with stroke recurrence following nonlacunar brain infarction. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013 Feb; 33 (2): 287–292. doi: 10.1038/jcbfm.2012.168. Epub 2012 Nov 14.
27. Prodan C.I., Stoner J.A., Dale G.L. Lower coated-platelet levels are associated with increased mortality after spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2015; 46: 1819–1825.

28. Szasz R., Dale G.L. COAT platelets. Current opinion in hematology. 2003; 10: 351–355.
29. Szasz R., Dale G.L. Thrombospondin and fibrinogen bind serotonin-derivatized proteins on COAT-platelets. Blood 2002, 100: 2827–2831.
30. 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. British Journal of Haematology 2012, 157 (1): 105–115.
31. Valaydon Z.S., Lee P., Dale G.L. et al. Increased coated-platelet levels in chronic haemodialysis patients. Nephrology (Carlton) 2009, 14: 148–154.

32. Webber A.J., Firkin B.G. Two populations of platelets. Nature 1965; 205: 1332.
33. Weiss H.J., Hoyer L.W., Rickles F.R. et al. Quantitative assay of a plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content. J Clin Invest. 1973, 52 (11): 2708–2716.
34. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N. et al. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. Biophys. J. 2012, 102, 2261–2269.

New capabilities of laboratory diagnosis of thromboses

A.A. Shabalina, M.M. Tanashyan, M.V. Kostyreva

Research Center of Neurology (Moscow)

Keywords: COAT-platelets, hypercoagulation, thrombosis, predictor of thrombosis.

The growing number of thromboses has been observed in various fields of medicine, which makes the issues of early diagnosis and investigation of thrombotic condition predictors more topical. Evaluation of hemostasis and investigation of risk factors of both thrombotic and hemorrhagic states is one of the most complex diagnostic problems. The objectives of laboratory diagnosis include not only studying of already known indicators of thrombovascular hemostasis and standard coagulation tests but also

developing, automating, and improving of new methods for detection of biomarkers of hemostasis disturbances. According to the results of modern research, a high level of the subpopulation of procoagulant or coated platelets, known as COAT-platelets, in patient blood can be considered as this new marker for predicting thrombosis. COAT-platelets are a subpopulation of collagen- and thrombin-activated platelets maintaining a high procoagulant activity of blood.

Контактный адрес: Шабалина Алла Анатольевна – канд. мед. наук, рук. лаб. гемореологии и нейроиммунологии с клинической лабораторной диагностикой ФГБНУ НЦН. 125367, Москва, Волоколамское ш., д. 80. Тел.: +7 (495) 490-20-41; e-mail: ashabalina@yandex.ru;

Костырева М.В. – врач лаб. гемореологии и нейроиммунологии с клинической лабораторной диагностикой ФГБНУ НЦН;

Танашян М.М. – зам. директора по научной и лечебной работе ФГБНУ НЦН.