

Обзоры литературы

© Коллектив авторов, 2018

УДК 616-005.1-08:616.155.2

*А.Н. Свешникова*¹⁻³, *А.А. Якушева*¹⁻³, *А.А. Рябых*^{1,3}, *О.Е. Ушакова*^{1,2}, *А.А. Абаева*²,
*С.И. Обыденный*¹, *Д.Ю. Нечипуренко*¹⁻³, *М.А. Пантелеев*¹⁻³

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РЕГУЛЯЦИИ ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, ул. Саморы Машела, 1, Москва, 117997, Российская Федерация;

² ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук», ул. Косыгина, 4, Москва, 119991, Российская Федерация;

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991, Москва, микрорайон Ленинские горы, 1, стр. 2, Российская Федерация

Свешникова Анастасия Никитична, канд. физ.-мат. наук, заведующий лабораторией,
orcid.org/0000-0003-4720-7319;

Якушева Александра Антоновна, науч. сотр., orcid.org/0000-0001-5292-2312;

Рябых Александр Андреевич, науч. сотр., orcid.org/0000-0001-6565-7052;

Ушакова Оксана Евгеньевна, лаборант-исследователь,
orcid.org/0000-0002-8342-2190;

Абаева Анастасия Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.,
orcid.org/0000-0001-5288-6518;

Обыденный Сергей Иванович, науч. сотр., orcid.org/0000-0002-2930-8768;

Нечипуренко Дмитрий Юрьевич, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр.,
orcid.org/0000-0002-8677-129X;

Пантелеев Михаил Александрович, доктор физ.-мат. наук, профессор, заведующий лабораторией,
orcid.org/0000-0002-8128-7757

Тромбоциты – безъядерные клеточные фрагменты крови, главной задачей которых считается остановка кровотоков посредством формирования агрегатов. Несмотря на относительно простую задачу, устройство тромбоцитов весьма сложно. Они имеют почти полноценный набор органелл и других компонентов, включая эндоплазматический ретикулум, митохондрии, гликоген, актиновый и тубулиновый цитоскелет и миозиновые сократительные механизмы. При активации тромбоциты секретируют разнообразные гранулы и вступают во взаимодействия с белками плазмы и клеток крови и других тканей; сама их активация управляется более чем сотней рецепторов и сложными сигнальными каскадами. В последние годы были выявлены новые ключевые механизмы функционирования тромбоцитов, которые привели к существенному пересмотру представлений о регуляции гемостатического ответа, патологического тромбообразования и других функций тромбоцитов. Наиболее существенные новые представления включают в себя: гетерогенность тромбов и гемостатических агрегатов, роль тромбоцитов в поддержании целостности сосудов, формирование прокоагулянтных тромбоцитов при активации вследствие нового типа клеточной смерти, новые роли тромбоцитов в иммунитете и развитии тканей, активация контактного пути тромбоцитами в процессе артериального тромбоза и другие. Эти представления служат основой для разработки новых методов диагностики и терапии.

Ключевые слова: гемостаз; тромбоз; тромбоциты; внутриклеточная сигнализация; интегральные тесты гемостаза.

Для цитирования: Свешникова А.Н., Якушева А.А., Рябых А.А., Ушакова О.Е., Абаева А.А., Обыденный С.И., Нечипуренко Д.Ю., Пантелеев М.А. Современные представления о регуляции тромбоцитарного гемостаза. *Креативная кардиология*. 2018; 12 (3): 260–74. DOI: 10.24022/1997-3187-2018-12-3-260-274

Для корреспонденции: Пантелеев Михаил Александрович, e-mail: mapanteleev@yandex.ru

A.N. Sveshnikova¹⁻³, A.A. Yakusheva¹⁻³, A.A. Ryabykh^{1,3}, O.E. Ushakova^{1,2}, A.A. Abaeva^{1,2},
S.I. Obydennyi¹, D.Yu. Nechipurenko¹⁻³, M.A. Panteleev¹⁻³

MODERN VIEWS ON THE REGULATION OF PLATELET-DEPENDENT HEMOSTASIS

¹ Dmitry Rogachev National Research Center for Paediatric Hematology, Immunology and Oncology, of Ministry of Health of the Russian Federation, ulitsa Samory Mashela, 1, Moscow, 117997, Russian Federation;

² Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, ulitsa Kosygina, 4, Moscow, 119991, Russian Federation;

³ M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, mikrorayon Leninskie Gory, 1, stroenie 2, Moscow, 119991, Russian Federation

Anastasia N. Sveshnikova, Head of Laboratory, Cand. Phys. Math. Sc., orcid.org/0000-0003-4720-7319;

Aleksandra A. Yakusheva, Researcher, orcid.org/0000-0001-5292-2312;

Aleksandr A. Ryabykh, Researcher, orcid.org/0000-0001-6565-7052;

Oksana E. Ushakova, Research Assistant, orcid.org/0000-0002-8342-2190;

Anastasia A. Abaeva, Senior Researcher, Cand. Biol. Sc., orcid.org/0000-0001-5288-6518;

Sergey I. Obydennyi, Researcher, orcid.org/0000-0002-2930-8768;

Dmitry Yu. Nechipurenko, Senior Researcher, Cand. Phys. Math. Sc., orcid.org/0000-0002-8677-129X;

Mikhail A. Panteleev, Head of Laboratory, Doctor Phys. Math. Sc., Professor, orcid.org/0000-0002-8128-7757

Platelets are non-nuclear cellular fragments of blood, whose main task is to stop bleeding by forming aggregates. Despite the relatively simple task, their organization is very complex. They have an almost complete set of organelles and other components, including endoplasmic reticulum, mitochondria, glycogen, actin and tubulin cytoskeleton and myosin contractile mechanisms. When activated, platelets secrete a variety of granules and interact with plasma proteins and blood cells and other tissues; their activation is controlled by more than one hundred receptors and complex signal cascades. In recent years, new key mechanisms for the functioning of platelets have been identified, which led to a significant revision of the concept of the regulation of the hemostatic response, pathological thrombosis and other functions of platelets. The most significant new views include: heterogeneity of thrombi and hemostatic aggregates, the role of platelets in maintaining vascular integrity, the formation of procoagulant platelets upon activation due to a new type of cell death, the new role of platelets in immunity and tissue development, activation of platelet contact during arterial thrombosis and others. These advances serve as a basis for the development of new methods of diagnosis and therapy.

Keywords: hemostasis; thrombosis; platelets; cell signal transduction; integral assays of hemostasis.

For citation: Sveshnikova A.N., Yakusheva A.A., Ryabykh A.A., Ushakova O.E., Abaeva A.A., Obydennyi S.I., Nechipurenko D.Yu., Panteleev M.A. Modern views on the regulation of platelet-dependent hemostasis. *Creative Cardiology*. 2018; 12 (3): 260–74 (in Russ.). DOI: 10.24022/1997-3187-2018-12-3-260-274

Funding. Mikhail A. Panteleev, e-mail: mapanteleev@yandex.ru

Acknowledgements. The work of the authors was supported by RFBR grants 16-34-01342, 16-34-00651, 16-04-01163 и 17-00-00141 (17-00-00138/17-00-00140), and by Russian Federation President Grant for Young Scientists MD-229.2017.4 and MD-2706.2017.4.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received July 19, 2018
Accepted August 09, 2018

Введение

Тромбоциты – небольшие клетки крови или, скорее, безъядерные клеточные фрагменты. Их главной ролью традиционно считается остановка кровотечения – гемостаза. Другие звенья гемостаза, такие как локальная вазоконстрикция или свертывание крови, в высшей степени зависят от тромбоцитов: вазоконстрикция регулируется секрецией тромбоцитарных гранул,

а ключевые реакции свертывания крови проходят на мембранах тромбоцитов.

Напротив, избыточная функция тромбоцитов или иные (не связанные исходно с тромбоцитами) нарушения могут привести к некорректному формированию агрегата – тромбозу.

В последние 10 лет многие представления о тромбоцитах претерпели революционное изменение. Даже само по себе классическое

формирование гемостатических агрегатов сейчас пересматривается в свете новых данных о гетерогенной структуре тромбов [1], существования субпопуляций тромбоцитов [2, 3] или роли воспаления в кровоточивости при тромбоцитопении [4]. Выявляются совершенно новые жизненно важные функции тромбоцитов, такие как их центральная роль в разделении кровеносной и лимфатической систем в ходе эмбриогенеза [5]. Ранее известные функции тромбоцитов как регуляторов роста тканей, регенерации, участников иммунного ответа сейчас активно изучают и расширяют.

Здесь мы рассмотрим современные представления об устройстве тромбоцита, а также наиболее прорывные направления связанных с ними исследований и разработок.

Структура тромбоцита

Тромбоциты существуют исходно в виде двояковыпуклых дисков размером 2–4 микрона в диаметре (рис. 1). При активации они становятся амебоидными. Форма тромбоцита поддерживается системой цитоскелетов. Присутствие F-актина в покоящихся тромбоцитах остается под вопросом, однако при активации образуется мощная сеть актинового цитоскелета (рис. 2) [6].



Рис. 1. Тромбоциты. Трансмиссионная электронная микрофотография неактивированных тромбоцитов

Fig. 1. Platelets. Transmission electron microscopy of non-activated platelets

Цитоплазма тромбоцитов содержит многочисленные гранулы нескольких типов. В первую очередь это плотные гранулы и альфа-гранулы.

Критическим свойством тромбоцита является активация, при которой происходит секреция гранул, экспонирование прокоагулянтной поверхности, активация рецепторов агрегации и другие изменения.

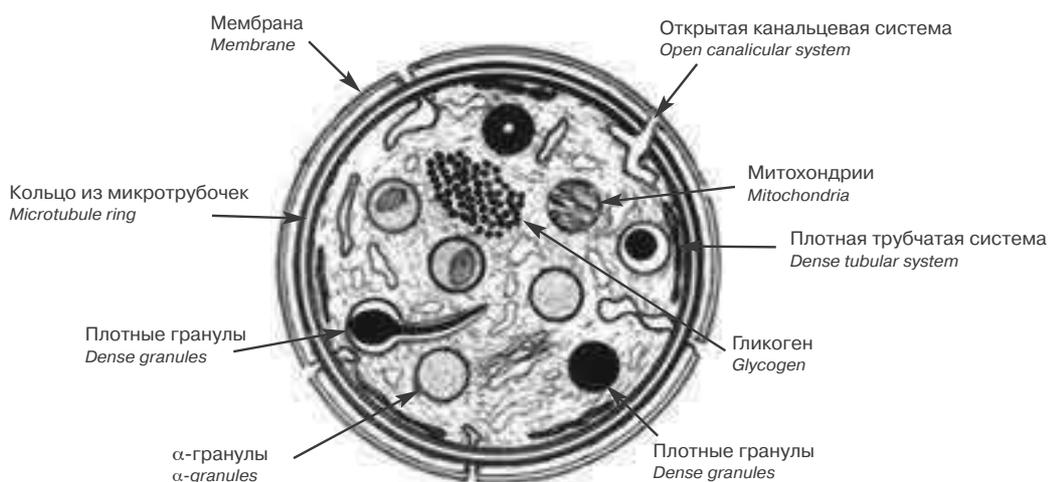


Рис. 2. Структура тромбоцита (основные элементы)

Fig. 2. Platelet structure (main elements)

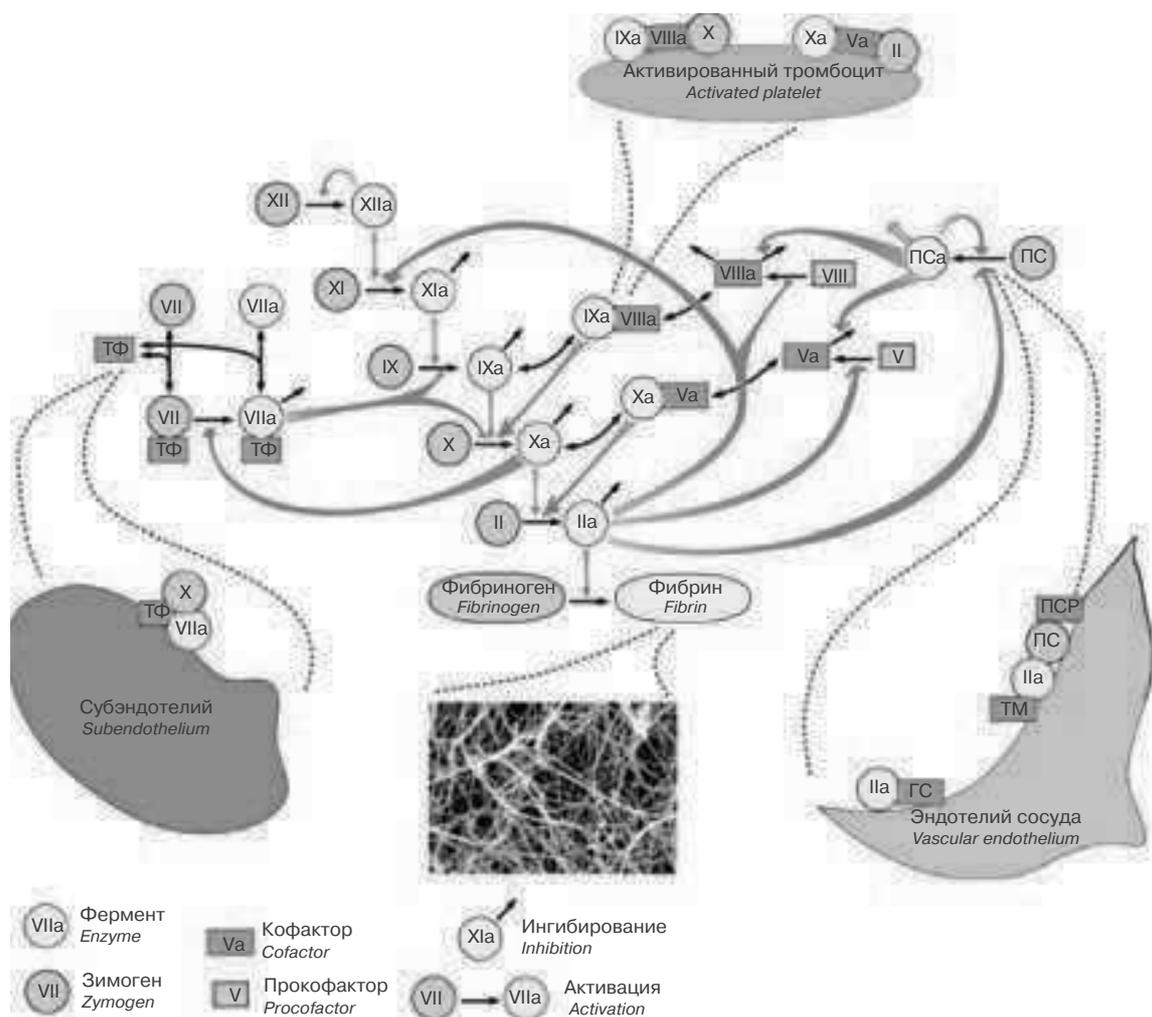


Рис. 3. Основные реакции каскада свертывания крови. Физиологическая активация свертывания обусловлена контактом крови с обнажившимся тканевым фактором (ТФ) на субэндотелии. Черные стрелки обозначают реакции превращения, красные – катализ, пунктир – зависимость реакций от мембраны.

ГС – гепаран сульфат; ПС – путь протеина С; ТМ – тромбомодулин; ТФ – тканевый фактор; РПС – рецептор протеина С.

Fig. 3. The main reactions of the coagulation cascade. The black arrows denote the transformation reactions, the red ones indicate catalysis, the dotted lines indicate the dependence of the reactions on the membrane.

ГС – heparan sulfate; ПС – protein C pathway; РПС – the protein C receptor; ТМ – thrombomodulin; ТФ – tissue factor

Она стимулируется рядом активаторов, главными из которых являются тромбин, коллаген, аденозиндифосфат, тромбоксан А2.

Тромбоциты, прокоагулянтные тромбоциты и свертывание крови

Значительная часть процессов, происходящих при активации, направлена не на агрегацию как таковую, а на поддержку

процессов свертывания крови. Оно представляет собой каскад реакций в плазме крови (рис. 3). Главным физиологическим механизмом его активации считается контакт крови с трансмембранным белком тканевым фактором, который в норме присутствует на всех клетках организма, кроме клеток крови и сосудистого русла. Тканевый фактор является кофактором сериновой

протеиназы фактора свертывания VIIa, и их комплекс способен активировать факторы свертывания путем частичного протеолиза. Связывание сериновой протеиназы фактора VIIa с ТФ ведет к переходу VIIa в активную конформацию, которая расщепляет и активирует факторы IX и X. Это активирует сложный регуляторный каскад реакций, последний фермент которого – тромбин – активирует белок фибриноген, превращая его в фибрин, который полимеризуется и формирует трехмерную сетку молекул, желеобразующую плазму крови. Все сериновые протеиназы свертывания инактивируются ингибиторами плазмы крови (антитромбин III, альфа2-макроглобулин и другие), а кофакторы – факторы V и VIII – разрушаются активным протеином C. Каскад свертывания жестко регулируется многочисленными ингибиторами, положительными и отрицательными обратными связями. Здоровый эндотелий несет на своих клетках молекулы-регуляторы гепаран сульфат и тромбомодулин, которые резко увеличивают скорость работы антитромбина III и активацию протеина C тромбином соответственно. Второй путь активации каскада свертывания – контактный, через фактор свертывания XII. Этот путь играет ключевую роль в активации *in vitro*, но его физиологическая и патологическая роли плохо ясны.

Время жизни фибринового сгустка определяется системой фибринолиза, отвечающей за его разрушение. Она также представляет собой каскад реакций, который запускается двумя короткоживущими молекулами – тканевым и урокиназным активаторами плазминогена. В присутствии фибрина они могут активировать белок плазминоген в плазмин, который разрушает фибрин и ведет к растворению фибринового сгустка.

На схеме показано, что все ключевые реакции свертывания проходят на мембранах клеток крови и сосудистого русла: активация происходит на субэндотелии, сборка комплексов теназы и протромбина-

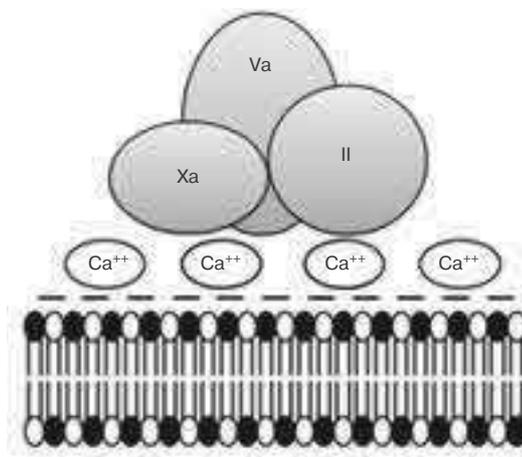


Рис. 4. Мембранные реакции свертывания крови. На иллюстрации изображен комплекс протромбиназы, состоящий из факторов Xa, Va, II, находящийся на поверхности бислойной мембраны

Fig. 4. Membrane blood clotting reactions. The illustration shows a complex of prothrombinase, consisting of factors Xa, Va, II, located on the surface of the bilayer membrane

зы – на активированных тромбоцитах, путь протеина C (ПС) и инактивация тромбина антитромбином при участии гепарансульфата – на здоровом эндотелии. В частности, основные реакции каскада происходят на мембранах активированных тромбоцитов, с которыми белки свертывания взаимодействуют посредством кальциевых мостиков (рис. 4). Активация тромбоцитов ведет к появлению фосфатидилсерина во внешнем слое мембраны тромбоцитов. Факторы свертывания связываются с такими мембранами, формируя комплексы белков, в которых реакции свертывания ускоряются на порядки. Интересно, что только часть тромбоцитов при активации становится прокоагулянтной [7] и, более того, на этих тромбоцитах реакции свертывания также проходят неравномерно, концентрируясь в небольшой зоне.

Регуляция активации тромбоцитов

Активация тромбоцита, как и любой другой клетки, начинается с поверхности, со связывания лиганда-активатора с рецептором к нему. Это ведет к изменениям

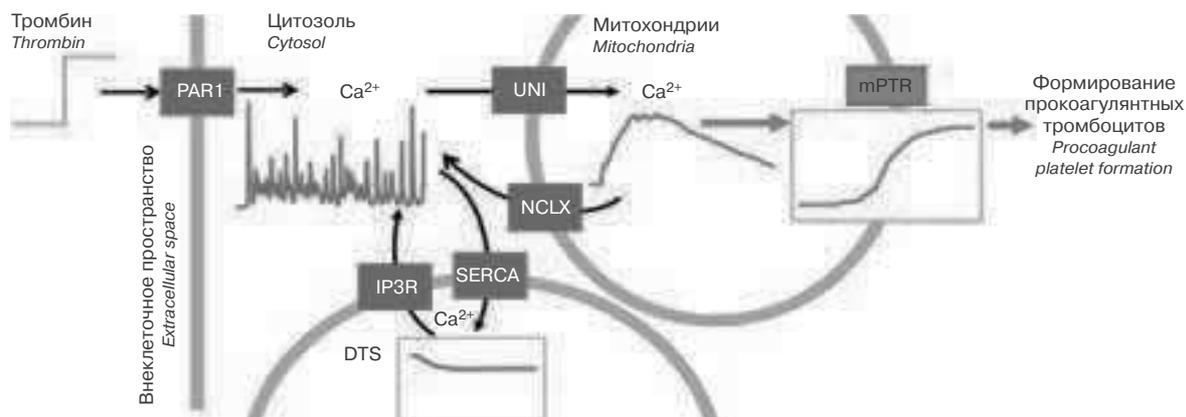


Рис. 5. Пути активации тромбоцитов. Основные этапы кальциевой сигнализации, динамика осцилляций и взаимодействие между компартментами.

DTS – плотная трубчатая система (эндоплазматический ретикулум); IP3R – инозитол-3-фосфатный рецептор; mPTR – митохондриальная пора; NCLX – натрий-кальциевый обменник; PAR1 – активируемые протеазами рецепторы; SERCA – кальциевая АТФаза саркоплазматического ретикулума; UNI – кальциевый унипортер

Fig. 5. Platelet activation pathways. Main steps of calcium signalling.

DTS – dense tubular system; IP3R – inositol trisphosphate receptor; mPTR – mitochondrial permeability transition pore; NCLX – sodium calcium exchanger; PAR1 – protease-activated receptor 1; SERCA – sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase; UNI – uniporter

в структуре фермента, что вызывает каскад реакций внутри клетки. Основной особенностью сигнализации в тромбоците является ее скорость: тромбоциту необходимо среагировать на активатор за доли секунды. В этих условиях классические пути, ведущие к факторам транскрипции, в тромбоците играют минорное значение, а приоритет приобретают каскады, способные к быстрому ответу: тирозин-киназная и кальциевая сигнализация.

Центральным управляющим элементом в системе внутриклеточной сигнализации тромбоцита считается концентрация ионов кальция в цитоплазме (рис. 5) [10]. В норме она поддерживается на низком уровне (десятки наномоль на литр) благодаря работе двух главных насосов, PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase, кальциевая АТФаза плазматической мембраны) на плазматической мембране и SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase, кальциевая АТФаза саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума) на мембране эндоплазматического ретикулума. Стимуляция основных рецепторов приводит к активации фосфолипазы С [8],

которая далее расщепляет фосфатидилинозитолбисфосфат с генерацией двух вторичных мессенджеров, триацилглицерола и инозитолтрифосфата. Инозитолтрифосфат связывается со своим рецептором, точнее лиганд-управляемым кальциевым каналом на эндоплазматическом ретикулуме или плазматической мембране. В результате кальций выходит в цитоплазму тромбоцита, что приводит к резкому возрастанию его уровня в случае коллагена или запуску осцилляций концентрации кальция, параметры которых определяют активационный ответ тромбоцита [9].

Как стало недавно ясно, важную роль в регуляции ответа тромбоцита играют митохондрии [10], работающие аккумуляторами-интеграторами кальциевого ответа. При их перегрузке кальцием запускается механизм клеточной смерти [11], ведущий к появлению прокоагулянтной активности.

Кальций является ведущим сигналом активации, а циклические АМФ и ГМФ в тромбоците работают как основной регулятор порога и интенсивности ответа. Их уровень повышается под действием PG12 (для цАМФ) и NO (для цГМФ), вырабатываемых

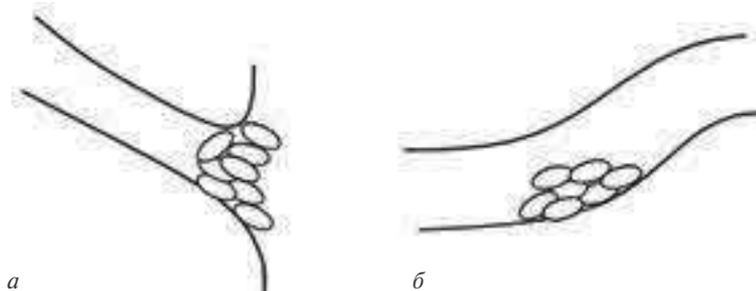


Рис. 6. Гемостаз и тромбоз:
a – гемостатический агрегат, перекрывающий разорванный сосуд; *б* – тромб, нарушающий кровоснабжение
Fig. 6. Hemostasis and thrombosis:
a – hemostatic aggregate; *b* – thrombus that disrupts blood flow

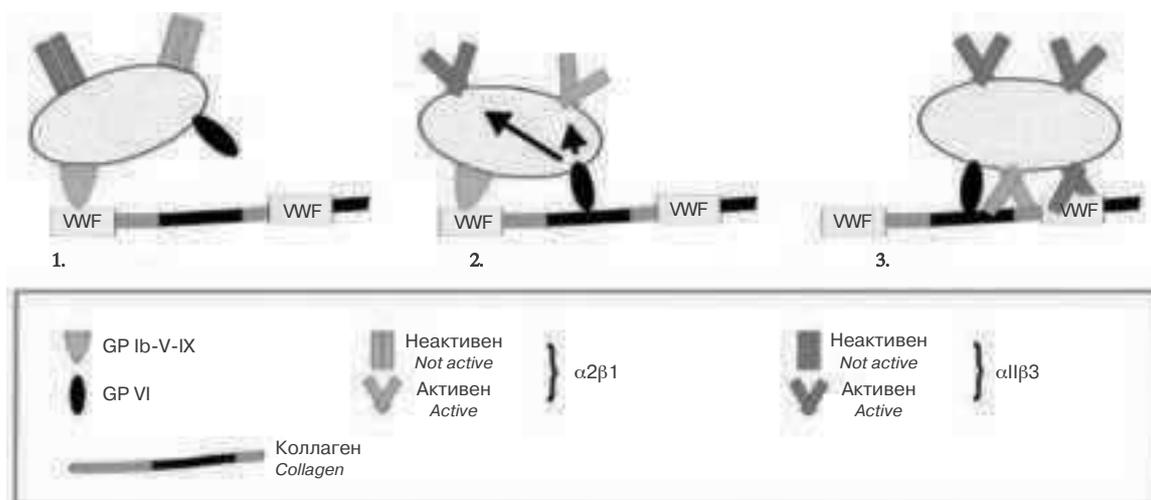


Рис. 7. Основной механизм начального роста тромбоцитарного тромба.
 VWF – фактор фон Виллебранда
Fig. 7. The basic mechanism of the initial growth of platelet thrombus.
 VWF – von Willebrand factor

здоровым эндотелием, в то время как активация тромбоцитов АДФ и адреналином ведет к его падению. Как и в большинстве других клеток, мишенью циклических мононуклеотидов являются протеин киназы А и G, способные фосфорилировать большинство белков-участников внутриклеточной сигнализации в тромбоците.

Функции тромбоцитов в гемостазе и тромбозе

На рисунке 6 наглядно показан предполагаемый режим работы тромбоцитов в гемостазе, когда они формируют плотный агрегат тромбоцитов, закрывающий повреждение; а также «тромботический» режим работы системы тромбоцитарного гемостаза, когда в отсутствие отверстия формируется агрегат тромбоцитов внутри сосуда – артериальный тромб.

мируется агрегат тромбоцитов внутри сосуда – артериальный тромб.

Каждый из этапов образования тромба является объектом тщательной регуляции и включает множество шагов. Многие из них пока плохо понятны: так, неизвестны механизмы, регулирующие процесс окклюзии [12]. На рисунке 7 показана первая стадия формирования тромба: адгезию тромбоцитов к коллагену, экспонированному в месте повреждения. Она включает в себя несколько ключевых этапов: процесс начинается с первичного торможения тромбоцитов на факторе Виллебранда, затем идет активация под действием гликопротеина VI и стабильная адгезия через активированные интегрины [13]. Первичное закрепление тромбоцита в месте повреждения

происходит путем взаимодействия главного адгезионного рецептора гликопротеина Ib-V-IX с молекулой-посредником фактором фон Виллебранда (VWF), закрепленным на обнажившемся коллагене (шаг 1). Затем сигнальный рецептор гликопротеин VI связывается с коллагеном, что ведет к активации тромбоцитов (шаг 2). Активация агрегационных рецепторов интегринов $\alpha 2\beta 1$ (служит для связывания коллагена) и $\alpha II\beta 3$ (для связывания через фибриногеновые мостики с другими тромбоцитами) способствует закреплению активированного тромбоцита на коллагене (шаг 3) и создает основу для дальнейшего роста тромба.

Тромбоцитарный гемостаз и тромбоз: фундаментальные проблемы

Контактный путь и артериальный тромбоз

Одна из самых «горячих» и проблемных областей в современной науке о тромбоцитах — их способность (а также способность их микровезикул [14]) активировать контактный путь и связанная с этим роль контактного пути в артериальном тромбозе.

Контактный путь свертывания был известен с незапамятных времен как главный способ активации крови *in vitro*. Однако открытие активации свертывания тканевым фактором постепенно стало считаться главным физиологическим способом активации свертывания в гемостазе. Начиная с конца 1970-х годов контактный путь активации свертывания крови исследовали все меньше и меньше и считали не очень важным, так как дефициты фактора XII и других его компонентов не связаны с выраженными клиническими проявлениями.

Намеки на ренессанс в этой области появились в середине 2000-х годов в связи с тем, что выведенные нокаутные по фактору XII мыши имели резистентность к артериальному тромбозу. Это было тем более удивительным, что артериальный тромбоз с незапамятных времен ассоциировался в сознании врачей с тромбоцитарным ге-

мостазом, а не со свертыванием крови в каком бы то ни было виде. Наконец, в 2010 г. команда исследователей из Германии показала, что селективное ингибирование фактора XII может подавить артериальный тромбоз без влияния на гемостаз [15]. Это положило начало многочисленным исследованиям на разных организмах и разных моделях тромбоза, в попытке создать антитромботические лекарства нового поколения.

Но что активирует контактный путь в артериальном тромбозе? Практически одновременно было обнаружено, что сами тромбоциты способны активировать контактный путь, выбрасывая из плотных гранул полифосфаты [16]. Эти два наблюдения было логично связать, и сейчас полифосфаты рассматриваются как ключевой посредник между тромбоцитами и свертыванием в артериальном тромбозе, а контактный путь — как главная мишень для новых препаратов [17]. Следует отметить, что в работе ряда групп, включая нашу, многие из наблюдений о роли полифосфатов не подтверждаются [18–20].

В этой области в любом случае есть немало загадок. Какую роль играет запущенное контактным путем свертывание в артериальном тромбозе? Зачем вообще природа создала такую связку, которая не работает в гемостазе, а только в тромбозе?

Субпопуляции тромбоцитов, гемостаз и артериальный тромбоз

На протяжении многих лет активированные тромбоциты считались одинаковыми. Только отдельные работы намекали на то, что лишь некоторые клетки проявляют прокоагулянтную активность. Поворотным событием в этой области считаются работы Лоренцо Альберико, показавшие наличие двух субпопуляций при сильной стимуляции тромбоцитов [21, 22]. Прокоагулянтные тромбоциты несли «шубу» из белков альфа-гранул. При этом парадоксальным образом на их поверхности не было активных интегринов. При других

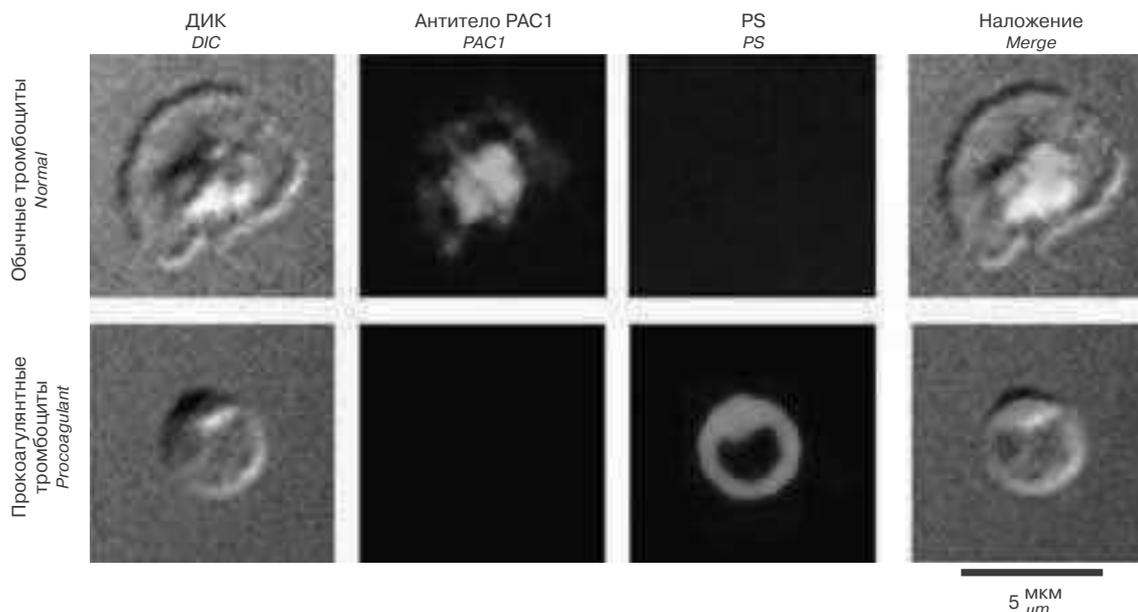


Рис. 8. Субпопуляции тромбоцитов. Две субпопуляции тромбоцитов, образующиеся при активации: одна несет на себе активные интегрины (зеленый), вторая связывает аннексин V, маркер фосфатидилсерина (красный).

ДИК – дифференциальный интерференционный контраст; PS – фосфатидилсерин

Fig. 8. Subpopulations of platelets. Two subpopulations of platelets formed during activation: one carries active integrins (green), the second binds annexin V, a marker of phosphatidylserine (red).

DIC – differential interference contrast; PS – phosphatidylserine

условиях прокоагулянтные тромбоциты также были показаны [7, 23].

Как сейчас понятно, эти тромбоциты формируются при сильной активации в ходе особого типа запрограммированной клеточной смерти, митохондриального некроза [10, 11, 24] (см. рис. 5). Этот процесс дополнительно регулируется рядом сигнальных путей, таких как цАМФ-зависимая сигнализация [23, 25–27]. В результате они приобретают характерную сферовидную форму, с «шапкой» – специальной структурой, с которой связаны альфа-гранулярные адгезионные белки и факторы свертывания [2, 3] (рис. 8). Цитоскелет при этом разрушается, и адгезионные белки больше с ним не связаны [28]. Благодаря «шапке», прокоагулянтные тромбоциты могут связываться с агрегатами обычных тромбоцитов, но не могут образовывать агрегаты сами [29]. Их патофизиологическая роль является предметом интенсивных исследований и бурных споров, но предва-

рительные клинические исследования указывают на их важность как для тромбоза, так и для гемостаза [30, 31].

Тромбоциты и венозный тромбоз

В отличие от артериального тромбоза, венозный тромбоз всегда считался связанным исключительно со свертыванием крови. Однако в последние годы механизмы его активации проявились, и, в частности, было выявлено, что несколько ключевых этапов в нем реализуется тромбоцитами [32].

Венозные тромбы сами по себе являются фибриновыми, то есть создаются системой свертывания крови в области застойного кровотока. Однако до самого последнего времени молекулярная природа активатора свертывания оставалась загадкой. Начиная с 2012 г., работы разных групп на мышах [33] и людях [34] обнаружили, что главным стимулятором тромбоза глубоких вен являются нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) (neutrophil

extracellular traps (NET)). Эти ловушки представляют собой комплексы ДНК и белков, выбрасываемые нейтрофилами в процессе особого вида клеточной смерти – нетоза. Эти ловушки сильнейшим образом активируют контактный путь свертывания крови. По-видимому, самые первые шаги венозного тромбоза в области воспаленного эндотелия могут быть связаны с тканевым фактором (предположительно на моноцитах, которые прикрепляются к месту воспаления), но для любого дальнейшего развития тромба необходима дальнейшая активация с помощью НВЛ [35]. А нейтрофилы в свою очередь «рекрутируются» в тромб и выбрасывают свои ловушки благодаря взаимодействиям с тромбоцитами [35], которые преимущественно опосредованы Р-селектинами. Что активирует сами тромбоциты в ходе венозного тромбоза, не изучено до конца, но есть данные, что они активируются через недавно открытый рецептор CLEC-2.

Для того чтобы использовать эти новые представления в терапии венозного тромбоза, сейчас разрабатываются препараты против отдельных компонентов этой схемы. Так, аптамер против Р-селектина в исследованиях на обезьянах показал лучшие эффекты при профилактике и терапии венозных тромбозов, чем гепарин – без каких-либо отрицательных эффектов на гемостаз и следовательно без риска кровотечений (в отличие от гепарина) [36].

Проблема поддержания целостности сосудов

Одним из наиболее ярких открытий последнего десятилетия было выявление роли иммунной системы не только в венозном тромбозе, но и в кровотечениях при тромбоцитопениях и тромбоцитопатиях. Как и для венозного тромбоза, пионерская работа по этой теме была выполнена в лаборатории Денизы Вагнер в США [4]. Этой группой и другими было показано, что кровотечения при недостатке тромбоцитов возникают (и предотвращаются у здоровых

людей) по совершенно иному механизму, чем при ранениях. Они связаны с локальным воспалением и активностью нейтрофилов, нарушающих соединения между клетками эндотелия сосудов; в отсутствие нейтрофилов тромбоцитопения не ведет к спонтанным кровотечениям. Тромбоциты прикрепляются к этим местам подножке, без формирования агрегатов, и активируются посредством гликопротеина VI. Несмотря на то что активация тромбоцитов очень нужна для поддержания целостности сосудов, механизмы этого процесса не ясны до конца и, по-видимому, различаются между органами. Так, секреция тромбоцитов, вероятно, необходима для предотвращения кровоизлияний в мозг, но не коже.

К вопросу о гликопротеине VI, его роль в функции тромбоцитов в целом не до конца ясна. С одной стороны, он отлично активируется коллагеном и логично является главным кандидатом на роль первичного активатора тромбоцитов [13]. Недавно две ведущих команды в этой области (лаборатория Стива Уотсона в Англии [37] и лаборатория Пьера Манжина во Франции [38]) независимо сообщили о его новой роли, активации тромбоцитов полимеризованным фибрином. С другой стороны, его дефицит у людей и нокаутирование у мышей не связаны с явными гемостатическими нарушениями (кроме целостности сосудов, описанной выше). Таким образом, не очень ясно, что активирует первый слой тромбоцитов в процессе гемостаза.

Еще более загадочен его родственник, недавно открытый CLEC-2. Его основной функцией является жизненно важная сигнализация в процессе эмбрионального развития: благодаря активации им тромбоцитов, происходит разделение лимфатической и кровеносной систем [5]. Кроме того, он также может участвовать в поддержании целостности сосудов. Его патологическая роль сказывается в описанном выше сценарии венозного тромбоза, а также в синдроме Казабаха–Меррит.

Гетерогенность тромбов и гемостатических агрегатов

Вплоть до 2013 г. структура гемостатического агрегата и тромбоцитарного тромба считалась относительно гомогенной. Описанная выше проблема прокоагулянтных тромбоцитов (и связанная с ней проблема фибрина) до некоторой степени нарушала эту однородность, но из-за общей неопределенности с прокоагулянтными тромбоцитами не оказывала сильного влияния.

Работа лаборатории Лоренса Брасса из университета Пенсильвании перевернула эти представления. Концепция структуры тромба «ядро—оболочка» сейчас захватила весь мир, и доказательства такого устройства тромбов сейчас обнаруживаются в самых разных постановках и экспериментальных моделях. Есть основания считать, что «оболочка» из слабоактивированных обратимо связанных тромбоцитов может играть ключевую роль в механизмах прототвращения окклюзии.

Интегральные тесты гемостаза и поток

Одной из ведущих тенденций в современной диагностике гемостаза является разработка и применение так называемых «глобальных» или «интегральных» тестов. Их идея заключается в том, чтобы имитировать *in vitro* ключевые процессы, происходящие в организме при гемостазе или тромбозе. Идеология этого подхода заключается в том, что подобная имитация позволит диагностировать все нарушения функций гемостаза в той степени, в какой они существенны для организма.

С точки зрения тромбоцитарного гемостаза, интегральные тесты делятся на две категории — тесты свертывания крови и тесты тромбоцитарной функции.

Для первой категории подходов главным является процесс плазменного свертывания, а функция тромбоцитарного гемостаза играет либо вспомогательную роль, либо детектируется только через влияние на свертывание. Два примера таких

подходов — тест генерации тромбина и тромбэластография. Первый из них заключается в регистрации концентрации тромбина как функции времени при активации свертывания крови в образце. Тромбоциты, выставляющие фосфатидилсерин для связывания факторов свертывания и секретирующие факторы свертывания, влияют на генерацию тромбина; поэтому существует вариант этого теста для богатой плазмы и косвенной оценки тромбоцитарной функции. В тромбэластографии и других реологических тестах тромбоциты участвуют еще более прямым образом, поскольку их агрегация способна оказывать прямое влияние на механические свойства образца. На основе TEG даже разработан вариант Platelet Mapping, специально направленный на оценку функции тромбоцитов, в частности при антитромбоцитарной терапии.

Однако сейчас становится ясно, что адекватно оценить функцию тромбоцитов в приближенных к организму условиях могут только методы, где происходит адгезия тромбоцитов по схеме, описанной выше. В таких подходах кровь прокачивается через картриджи, губки, проточные камеры с коллагеном или иным активатором, и по формированию тромбов (либо чисто тромбоцитарных, либо смешанных фибриново-тромбоцитарных) делается заключение о состоянии гемостаза. Регистрация осуществляется либо видеомикроскопически, либо по нарастанию гидродинамического сопротивления в канале. Пример тромбов, выращенных *in vitro* в таком тесте, показан на рисунке 9. Тромбоциты в цельной крови здорового донора были загружены флуоресцентной краской, чувствительной к митохондриям (DIOC6). Кровь прокачивали через проточную камеру с иммобилизованным фибриллярным коллагеном толщиной 100 мкм в течение 10 мин, скорость сдвига 200 с⁻¹, после чего камеру промывали буфером Тирода и производили регистрацию (верхняя панель дифференциальный интерференционный контраст, средняя панель



Рис. 9. Тромбообразование в плоско-параллельной проточной камере (а–в)
Fig. 9. Thrombosis in a plane-parallel flow chamber (a–c)

флуоресценция, нижняя панель совмещенные). Максимальная высота тромбов – 10,7 мкм. Степень покрытия поверхности тромбами – 50%.

В настоящее время исследование адгезии тромбоцитов в таких системах используется все чаще и приносит важные результаты, часто противоречащие данным классических методов.

Искусственные тромбоциты

Одним из важных направлений прикладных исследований является производство тромбоцитов из стволовых клеток. В настоящее время схема тромбоцитогенеза достаточно хорошо изучена и даже в принципе воспроизведена *in vitro*, так что нет принципиальной проблемы в том, чтобы для каждого человека сделать «родные» тромбоциты из его собственных стволовых клеток или из клеток совместимого донора из банка стволовых клеток. Такие тромбоциты будут безопасны с точки зрения передачи инфекции и с точки зрения реакции иммунной системы, смогут быть наработаны в любом количестве по мере необходимости, снимая потребность в ежедневном донорстве. Однако несмотря на то что технически проблема решена уже более десяти лет назад, в клиническую практику этот подход пока не внедрен.

Современное состояние дел в области создания таких «тромбоцитарных фабрик» подробно освещено в недавнем обзоре [39]. Список проблем довольно длинный. Нет гарантий, что сгенерированные *in vitro* тромбоциты эквивалентны настоящим по

всем своим функциям, скорее есть данные против. Отлаживание производства тромбоцитов по современным нормам безопасности и проведение клинических испытаний требует существенного времени. Но самое главное – высокая стоимость делает такие тромбоциты пока совершенно нерентабельными, особенно если учесть, что мегакариоциты *in vitro* производят на порядки меньше тромбоцитов.

Интересной альтернативой является переливание мегакариоцитов (также сделанных из стволовых клеток) с тем, чтобы они дальше генерировали тромбоциты уже *in vivo*. Судя по первым экспериментам, такие тромбоциты получаются лучше сделанных в пробирке, совершенно неотличимыми от нормальных. Такой подход представляется крайне привлекательным идейно: он лишен большинства недостатков переливания тромбоконцентратов и в то же время не является таким тяжелым и рискованным, как трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Другая ветвь исследований связана с созданием полностью «неживых» тромбоцитов. Первые работы по их лиофилизации начались в 1950-х годах. Очевидно, что в случае успеха такой подход имел бы колоссальные преимущества перед остальными, особенно в условиях скорой помощи, чрезвычайных ситуаций или военного полевого госпиталя, так как лиофилизованные клетки не требуют охлаждения до криотемператур и фактически могут храниться без охлаждения, при охлаждении срок хранения удлинится практически

неограниченно, а их регидратация может протекать достаточно быстро и не требует специального оборудования. Однако тщательные эксперименты по переливанию регидратированных концентратов лиофилизированных тромбоцитов животным в конце 1950-х годов не смогли подтвердить первоначально заявленную гемостатическую эффективность [40].

Эксперименты с лиофилизацией тромбоцитов были надолго приостановлены. Но в середине 1990-х годов в университетах Восточной Каролины и Северной Каролины (США), были созданы новые технологии лиофилизации, основанные на фиксации 1,8% параформальдегидом, заморозке в 5% альбумине и сушке при температуре от -20 до -40°C на протяжении суток. Это позволило сохранить структурные и некоторые функциональные свойства тромбоцитов, они были способны встраиваться в гемостатический сгусток, а их переливание в десятки раз сокращало время кровотечения у крыс с тромбоцитопенией. С тех пор были проведены многочисленные подтверждающие исследования гемостатической эффективности и безопасности на разнообразных животных моделях. Недостатком лиофилизированных препаратов оказалось сравнительно короткое время жизни в кровотоке, составляющее 5–6 ч. Дальнейшие исследования выявили, что после лиофилизации и регидратации сохраняется довольно много тромбоцитарных рецепторов и способность ускорять плазменное свертывание. В лиофилизированных тромбоцитах сохранены даже некоторые элементы системы внутриклеточной сигнализации и способность реагировать на стимуляцию тромбином, хотя нет ясности, насколько это можно считать полноценной активацией. Однако они не могут вызвать ретракцию и не способны агрегировать в ответ на АДФ и коллаген, хотя способны встраиваться в агрегаты в присутствии свежих тромбоцитов. Впрочем, есть данные, что такая неполноценность является выгодной клинически, пре-

дотвращая формирование патологических тромбов при переливании [41].

В последние годы работа над лиофилизированными тромбоцитами сменила свой статус с исследовательской на промышленную и клиническую. Их разработчики создали компанию Entegriion, которая занимается производством лиофилизированных тромбоцитов под названием «тромбоцитарные частицы Stasix». Они позиционируются как независимое средство для остановки кровотечений или как носитель для лекарственных препаратов. Разработка идет достаточно медленно (уже почти четырнадцать лет), но непрерывно. Успешные результаты испытаний на животных были опубликованы в 2009 г. По последним сведениям, в 2014 г. они получили грант от Пентагона на доведение своего препарата до возможности испытаний на людях, которые должны были начаться в 2016 г. [42]. Предполагается, что в случае успеха к 2020 г. может быть получено разрешение на клиническое применение.

Другие возможные кандидатуры на роль «полностью искусственных» тромбоцитов включают в себя тромбоцитарные микровезикулы, эритроциты с «пришитым» фибриногеном или RGD-пептидами, альбуминовые микрокапсулы с фибриногеном, липосомы с адгезионными белками и «загруженные» дополнительными молекулами типа АДФ [43].

Финансирование. Работа авторов поддержана грантами РФФИ 16-34-01342, 16-34-00651, 16-04-01163 и 17-00-00141 (17-00-00138/17-00-00140), а также грантами Президента для молодых ученых МД-229.2017.4 и МК-2706.2017.4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Stalker T.J., Traxler E.A., Wu J., Wannemacher K.M., Cermignano S.L., Voronov R. et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network.

- Blood*. 2013; 121 (10): 1875–85. DOI: 10.1182/blood-2012-09-457739.
2. Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N., Obydenny 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. DOI: 10.1074/jbc.M113.474163.
 3. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D.Y. et al. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood*. 2016; 128 (13): 1745–55. DOI: 10.1182/blood-2016-02-696898.
 4. Goerge T., Ho-Tin-Noe B., Carbo C., Benarafa C., Remold-O'Donnell E., Zhao B.Q. et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood*. 2008; 111 (10): 4958–64. DOI: 10.1182/blood-2007-11-123620.
 5. Osada M., Inoue O., Ding G., Shirai T., Ichise H., Hirayama K. et al. Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2012; 287 (26): 22241–52. DOI: 10.1074/jbc.M111.329987.
 6. White J.G. Electron microscopy methods for studying platelet structure and function. *Methods Mol. Biol.* 2004; 272: 47–63. DOI: 10.1385/1-59259-782-3:047.
 7. Panteleev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataulakhanov F.I., Saenko E.L. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3 (11): 2545–53. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x.
 8. Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N. et al. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J. Thromb. Haemost.* 2016; 14 (10): 2045–57. DOI: 10.1111/jth.13442.
 9. Balabin F.A., Sveshnikova A.N. Computational biology analysis of platelet signaling reveals roles of feedbacks through phospholipase C and inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in controlling amplitude and duration of calcium oscillations. *Math. Biosci.* 2016; 276: 67–74. DOI: 10.1016/j.mbs.2016.03.006.
 10. Sveshnikova A.N., Ataulakhanov F.I., Panteleev M.A. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1. *Mol. Biosyst.* 2015; 11 (4): 1052–60. DOI: 10.1039/c4mb00667d.
 11. Obydenny S.I., Sveshnikova A.N., Ataulakhanov F.I., Panteleev M.A. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J. Thromb. Haemost.* 2016; 14 (9): 1867–81. DOI: 10.1111/jth.13395.
 12. Belyaev A.V., Panteleev M.A., Ataulakhanov F.I. Threshold of microvascular occlusion: injury size defines the thrombosis scenario. *Biophys J.* 2015; 109 (2): 450–6. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.06.019.
 13. Nieswandt B., Brakebusch C., Bergmeier W., Schulte V., Bouvard D., Mokhtari-Nejad R. et al. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J.* 2001; 20 (9): 2120–30. DOI: 10.1093/emboj/20.9.2120.
 14. Lipets E., Vlasova O., Urnova E., Margolin O., Soloveva A., Ostapushchenko O. et al. Circulating contact-pathway-activating microparticles together with factors IXa and XIa induce spontaneous clotting in plasma of hematology and cardiologic patients. *PLoS One.* 2014; 9 (1): e87692. DOI: 10.1371/journal.pone.0087692.
 15. Hagedorn I., Schmidbauer S., Pleines I., Kleinschnitz C., Kronthaler U., Stoll G. et al. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation.* 2010; 121 (13): 1510–7. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.924761.
 16. Muller F., Mutch N.J., Schenk W.A., Smith S.A., Esterl L., Spronk H.M. et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell.* 2009; 139 (6): 1143–56. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.001.
 17. Kenne E., Nickel K.F., Long A.T., Fuchs T.A., Stavrou E.X., Stahl F.R. et al. Factor XII: a novel target for safe prevention of thrombosis and inflammation. *J. Intern. Med.* 2015; 278 (6): 571–85. DOI: 10.1111/joim.12430.
 18. Faxalv L., Boknas N., Strom J.O., Tengvall P., Theodorsson E., Ramstrom S. et al. Putting polyphosphates to the test: evidence against platelet-induced activation of factor XII. *Blood.* 2013; 122 (23): 3818–24. DOI: 10.1182/blood-2013-05-499384.
 19. Smith S.A., Choi S.H., Davis-Harrison R., Huyck J., Boettcher J., Rienstra C.M. et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood.* 2010; 116 (20): 4353–9. DOI: 10.1182/blood-2010-01-266791.
 20. Zakharova N.V., Artemenko E.O., Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Demina I.A., Ataulakhanov F.I. et al. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. *PLoS One.* 2015; 10 (2): e0116665. DOI: 10.1371/journal.pone.0116665.
 21. Alberio L., Safa O., Clemetson K.J., Esmon C.T., Dale G.L. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood.* 2000; 95 (5): 1694–702.
 22. Dale G.L., Friese P., Batar P., Hamilton S.F., Reed G.L., Jackson K.W. et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature.* 2002; 415 (6868): 175–9. DOI: 10.1038/415175a.

23. Kotova Y.N., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the P2Y12 receptor. *J. Thromb. Haemost.* 2008; 6 (9): 1603–5. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03052.x.
24. Jobe S.M., Wilson K.M., Leo L., Raimondi A., Molkentin J.D., Lentz S.R. et al. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood.* 2008; 111 (3): 1257–65. DOI: 10.1182/blood-2007-05-092684.
25. Shakhidzhanov S.S., Shaturny V.I., Pantelev M.A., Sveshnikova A.N. Modulation and pre-amplification of PAR1 signaling by ADP acting via the P2Y12 receptor during platelet subpopulation formation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015; 1850 (12): 2518–29. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.09.013.
26. Topalov N.N., Kotova Y.N., Vasil'ev S.A., Pantelev M.A. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation. *Br. J. Haematol.* 2012; 157 (1): 105–15. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.09021.x.
27. Topalov N.N., Yakimenko A.O., Canault M., Artemenko E.O., Zakharova N.V., Abaeva A.A. et al. Two types of procoagulant platelets are formed upon physiological activation and are controlled by integrin alpha(IIb)beta(3). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32 (10): 2475–83. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.253765.
28. Artemenko E.O., Yakimenko A.O., Pichugin A.V., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. Calpain-controlled detachment of major glycoproteins from the cytoskeleton regulates adhesive properties of activated phosphatidylserine-positive platelets. *Biochem J.* 2016; 473 (4): 435–48. DOI: 10.1042/BJ20150779.
29. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys J.* 2012; 102 (10): 2261–9. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.04.004.
30. Kirkpatrick A.C., Tafur A.J., Vincent A.S., Dale G.L., Prodan C.I. Coated-platelets improve prediction of stroke and transient ischemic attack in asymptomatic internal carotid artery stenosis. *Stroke.* 2014; 45 (10): 2995–3001. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.006492.
31. Daskalakis M., Colucci G., Keller P., Rochat S., Silzle T., Biasiutti F.D. et al. Decreased generation of procoagulant platelets detected by flow cytometric analysis in patients with bleeding diathesis. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2014; 86 (6): 397–409. DOI: 10.1002/cyto.b.21157.
32. Kimball A.S., Obi A.T., Diaz J.A., Henke P.K. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Front. Immunol.* 2016; 7: 236. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00236.
33. Brill A., Fuchs T.A., Savchenko A.S., Thomas G.M., Martinod K., De Meyer S.F. et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J. Thromb. Haemost.* 2012; 10 (1): 136–44. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x.
34. Savchenko A.S., Martinod K., Seidman M.A., Wong S.L., Borissoff J.I., Piazza G. et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J. Thromb. Haemost.* 2014; 12 (6): 860–70. DOI: 10.1111/jth.12571.
35. Von Bruhl M.L., Stark K., Steinhart A., Chandraratne S., Konrad I., Lorenz M. et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* 2012; 209 (4): 819–35. DOI: 10.1084/jem.20112322.
36. Diaz J.A., Wroblewski S.K., Alvarado C.M., Hawley A.E., Doornbos N.K., Lester P.A. et al. P-selectin inhibition therapeutically promotes thrombus resolution and prevents vein wall fibrosis better than enoxaparin and an inhibitor to von Willebrand factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2015; 35 (4): 829–37. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304457.
37. Alshehri O.M., Hughes C.E., Montague S., Watson S.K., Frampton J., Bender M. et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood.* 2015; 126 (13): 1601–8. DOI: 10.1182/blood-2015-04-641654.
38. Mammadova-Bach E., Ollivier V., Loyau S., Schaff M., Dumont B., Favier R. et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood.* 2015; 126 (5): 683–91. DOI: 10.1182/blood-2015-02-629717.
39. Nurhayati R.W., Ojima Y., Taya M. Recent developments in ex vivo platelet production. *Cytotechnology.* 2016; 68 (6): 2211–21. DOI: 10.1007/s10616-016-9963-4.
40. Firkin B.G., Arimura G., Harrington W.J. A method for evaluating the hemostatic effect of various agents in thrombocytopenic rats and mice. *Blood.* 1960; 15 388–94.
41. Fischer T.H., Merricks E.P., Bode A.P., Bellinger D.A., Russell K., Reddick R. et al. Thrombus formation with rehydrated, lyophilized platelets. *Hematology.* 2002; 7 (6): 359–69. DOI: 10.1080/1024533021000047954.
42. RTP's Entegron awarded \$7.8M to develop freeze-dried platelets. <http://www.newsobserver.com/news/business/article10094855.html> (дата обращения 20.10.2017 / accessed October 20, 2017).
43. Mohanty D. Current concepts in platelet transfusion. *Asian J. Transfus. Sci.* 2009; 3 (1): 18–21. DOI: 10.4103/0973-6247.45257.