

Тромбоцитарные микровезикулы и их роль в обеспечении гемостатического потенциала (обзор литературы)

А.П. Момот¹, Н.О. Царигородцева², Д.В. Фёдоров², К.М. Бишевский²,
Н.В. Вострикова², Е.Е. Климова²

¹ *Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России, Алтайский филиал*

656045, г. Барнаул, ул. Ляпидевского, 1, корп. 2

² *Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России*

656038, г. Барнаул, просп. Ленина, 40

Резюме

В последние годы активно изучается роль микровезикул в передаче сигналов эндокринной системы, в обеспечении межклеточного взаимодействия, в переносе белков и нуклеиновых кислот из одной клетки в другую, в регуляции ангиогенеза, в воспалительных реакциях и в метастазировании опухолей. В данной публикации рассматриваются механизмы их образования, строение и потенциальное значение в качестве биологических маркеров. В числе фундаментальных реакций, связанных с микровезикулами, выделяется их прямое участие в обеспечении гемостатических реакций, направленных на остановку кровотечения при нарушении, в силу разных причин, целостности сосудистой стенки. Важная роль в этом отводится микровезикулам тромбоцитарного происхождения, что подтверждено рядом экспериментальных и клинических исследований. В обзоре оцениваются перспективы клинического применения одного из современных компонентов крови – криопреципитата – в качестве источника тромбоцитарных микровезикул.

Ключевые слова: тромбоцитарные микровезикулы, система гемостаза, кровотечения, криопреципитат.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Автор для переписки. Момот А.П., e-mail: xyzan@yandex.ru

Для цитирования: Момот А.П., Царигородцева Н.О., Фёдоров Д.В., Бишевский К.М., Вострикова Н.В., Климова Е.Е. Тромбоцитарные микровезикулы и их роль в обеспечении гемостатического потенциала (обзор литературы). *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40 (2): 4–14. doi: 10.15372/SSMJ20200201

Platelet microvesicles and their role in providing hemostatic capacity (literature review)

A.P. Momot¹, N.O. Tsarigorodtseva², D.V. Fedorov², K.M. Bishevski²,
N.V. Vostrikova², E.E. Klimova²

¹ *Altai Branch of National Research Center for Hematology of Minzdrav of Russia*
656045, Barnaul, Lyapidevskogo str., 1, bldg. 2

² *Altai State Medical University of Minzdrav of Russia*
656038, Barnaul, Lenina av., 40

Abstract

In recent years the role of microvesicles in endocrine system transmission, in providing cellular connectivity, in transportation of proteins and nucleic acids from one cell to another, in angiogenesis regulation, in inflammatory reactions and in dissemination of tumors is actively studied. This article reviews the mechanisms of microvesicle formation, the structure of microvesicles and their potential value as biomarkers. Among all essential reactions involving microvesicles

one thing especially stands out: their direct participation in providing hemostatic reactions for bleeding control in case of a solution of continuity in blood vessels due to different reasons. Platelet microvesicles play an important role in this process, and it has been proved by several experimental and clinical studies. In this review we evaluate prospects for clinical use of one of modern blood components – cryoprecipitate – as the source of platelet microvesicles.

Key words: platelet microvesicles, hemostatic system, bleeding, cryoprecipitate.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Momot A.P., e-mail: xyzan@yandex.ru

Citation: Momot A.P., Tsarigorodtseva N.O., Fedorov D.V., Bishevski K.M., Vostrikova N.V., Klimova E.E. Platelet microvesicles and their role in providing hemostatic capacity (literature review). *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020; 40 (2): 4–14. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200201

Введение

В настоящее время в клинической трансфузиологии существует ряд проблем, связанных с побочными явлениями после использования гемокомпонентной терапии (эритроциты, тромбоциты, лейкоциты, плазма крови): аллоиммунизация и рефрактерность, бактериальная или вирусная контаминация, фебрильные негемолитические реакции, болезнь «трансплантат против хозяина» [13].

Препараты данной группы несмотря на широкое использование имеют определенные ограничения по сроку и условиям хранения, из-за чего нередко возникают проблемы со своевременным предоставлением их пациенту. В первую очередь это касается тромбоцитарного концентрата или взвеси тромбоцитов, полученных из донорской крови [7, 45]. Понимание данной проблемы явилось основанием для поиска новых средств гемотрансфузионной терапии, направленных на решение проблем, которые возникают в связи с необходимостью быстрой коррекции кровотечений, вызванных нарушениями свертываемости крови. В этом ключе целенаправленное внимание уделялось тромбоцитарным микровезикулам (ТМ) и возможности их использования в качестве потенциального гемостатического средства [13, 33], что остается актуальным и в настоящее время.

История изучения микровезикул. Сегодня нет единого мнения о том, кто является первооткрывателем существования микровезикул. В различных источниках можно найти по крайней мере двух предполагаемых авторов открытия существования этих субклеточных образований: *P. Wolf* и *J.R. O'Brien* [4, 5]. Английский исследователь *P. Wolf* в 1967 году описал феномен свертывания плазмы и сыворотки крови при отсутствии в них тромбоцитов [50]. Стоит отметить, что в своей работе данный автор использовал результаты исследований других ученых, таких

как *E. Chargaff* и *R. West* и *J.R. O'Brien* [29]. Так, *J.R. O'Brien* обнаружил коагулирующую способность сыворотки крови, не содержащей тромбоцитов, а *E. Chargaff* и *R. West* выявили наличие способности к коагуляции у лишенной тромбоцитов плазмы крови [29]. В связи с этим в некоторых литературных источниках первооткрывателем микровезикул плазмы крови называют именно *J.R. O'Brien* [4], однако стоит отметить, что данный автор, хоть и обнаружил в ходе экспериментов коагулирующую способность сыворотки крови, не содержащей тромбоцитов, но не смог объяснить это явление, подчеркнув, что оно не укладывается в рамки существующих теорий [44]. *J.R. O'Brien* опубликовал свою статью в 1955 году, результаты его работы были позднее использованы *P. Wolf*, который смог обобщить имеющиеся на тот момент сведения и попытался объяснить обнаруженный феномен, а также ввел в употребление термин «тромбоцитарная пыль» (*platelet dust*). В то время в связи с малыми размерами микровезикул обнаружить их непосредственно не представлялось возможным, но впоследствии данный феномен был объяснен наличием в плазме крови ТМ и аналогичных образований из других клеток крови (эритроцитов, лейкоцитов) и эндотелия [5].

Исследования в области изучения микровезикул активизировались в последние годы в связи с усовершенствованием технических средств, позволяющих их выявлять, а также количественно и качественно оценивать [18, 24]. В настоящее время эти клеточные структуры, присутствующие в плазме крови, охарактеризованы достаточно подробно отечественными авторами [5], однако фундаментальные вопросы, связанные с их появлением и ролью в организме человека, только начинают проясняться [3, 30].

На данный момент микровезикулы, образовавшиеся в регулируемом процессе ремоделирования плазматической мембраны клетки, признаются научным сообществом в качестве

эффекторов с широким перечнем принципиально важных биологических функций [37].

Общая характеристика тромбоцитарных микровезикул. Микровезикулы – это сравнительно небольшие (от 30 до 1000 нм) частицы, высвобождающиеся с поверхности клеток в ходе их существования [5]. В литературных источниках термин «микровезикулы» используется по-разному. Ряд авторов полагает, что такие понятия как «микровезикулы» и «микрочастицы» относятся к разным внеклеточным структурам и их следует рассматривать отдельно [6]. Другие авторы объединяют все внеклеточные структуры термином «микровезикулы» или «внеклеточные везикулы» («экстрацеллюлярные везикулы»), подразделяя их на группы и выделяя среди этих групп «микрочастицы» [4]. Кроме того, многие специалисты считают термины «микрочастицы» и «микровезикулы» тождественными и взаимозаменяемыми [2, 3, 5], к чему мнению мы присоединяемся.

Микровезикулы плазмы крови отличаются известной гетерогенностью и разным происхождением. Для плазмы крови практически здорового человека характерно присутствие микровезикул, произведенных клетками крови и сосудистого русла в силу разных причин. Самыми многочисленными и коагуляционно активными являются ТМ [23] – они составляют около 70–90 % от общего числа микровезикул плазмы крови [3]. Достаточно многочисленны, даже в условиях физиологической нормы, эритроцитарные микровезикулы [5, 49], но их намного меньше, чем тромбоцитарных или лейкоцитарных. Кроме того, в норме обнаруживаются также и эндотелиальные микровезикулы, но их количество достаточно мало [5, 20].

ТМ содержат белки плазматической мембраны (P-селектин, GPIb, $\alpha_2\beta_3$ -интегрин и др.), α -гранулы, гранулы гликогена, литические вакуоли, протеолитические ферменты, белки цитоскелета, полости открытой системы канальцев, факторы роста [3, 9]. L.H. Boudreau et al. выяснили, что ТМ содержат функционально активные митохондрии, способные обеспечивать клеточное дыхание [14]. В 2017 г. G. Marcoux et al. опубликовали работу, в которой указали, что ТМ гетерогенны с точки зрения присутствия или отсутствия митохондрий [35]. Кроме того, ТМ варьируются и по размеру [3]. По форме микровезикулы тромбоцитарного происхождения предлагается разделять на три группы: сферические, трубчатые и мембранные фрагменты, происходящие из тромбоцитов. Однако подавляющее большинство ТМ имеют сферическую форму [5]. В соответствии с данными W.L. Dean et al., по величине ТМ так-

же подразделяются на определенные классы [22]: альфа-гранулы (меньшие из микровезикул) и частицы, «отшнурованные» от плазматической мембраны тромбоцитов (сравнительно большие по размерам) [3].

Установлено, что мембраны микровезикул состоят из липидных молекул и разных количеств белка и имеют в своем составе антигенные маркеры «родительских» клеток: микроРНК, рецепторные белки, ферменты и др. [31, 36]. Наряду с этим отмечается, что фенотип микровезикул зависит от характера стимулирующих влияний, вызвавших их образование [3].

Образование ТМ. В норме для цитоплазматической мембраны характерно асимметричное расположение фосфолипидов между двумя монослоями. ТМ формируются в результате ремоделирования плазматической мембраны клетки, при этом в ходе данного процесса теряется асимметричное распределение структурных фосфолипидов в бислой мембраны. Это происходит в определенных участках плазмалеммы, называемых «липидными рафтами». Последние образования представляют собой обогащенные и более плотно структурированные микродомены мембраны по сравнению с рядом расположенными участками [1, 40].

Обычно образование микровезикул начинается вскоре после стимуляции «родительской» клетки различными факторами [4, 9, 11], приводящими к повышению внутриклеточного содержания ионов кальция, и, соответственно, является кальций-зависимым процессом. Такая стимуляция может быть обусловлена воздействием активных форм кислорода, тромбином, эндотоксином, активацией системы комплемента, медиаторами воспаления, аденозиндифосфатом, адреналином, гипоксией, стрессом, апоптозом – разнообразными процессами, связанными с жизнедеятельностью и утилизацией тромбоцитов [4, 9, 11]. Одна из молекул, регулирующих образование микровезикул, кальпаин-мю (μ -calpain), представляет собой кальций-зависимую цитозольную протеазу, расщепляющую белки цитоскелета таллин и альфа-актин.

При образовании микровезикул нарушается физиологическое асимметричное расположение липидов в мембране клетки вследствие перемещения отрицательно заряженных молекул фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина в наружный слой мембраны. В обычных условиях фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин находятся во внутреннем слое плазмалеммы, в то время как наружный слой содержит фосфатидилхолин и сфингомиелин. Такое соотношение и распределение липидов обеспечивается тремя

ферментами: аминоксанолипидтрансферазой, или флиппазой (*flippase*), флоппазой (*floppase*) и скрамблазой (*scramblase*) [1, 21, 34]. Флиппаза переносит фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин с внешнего слоя мембраны на цитозольный слой мембраны («внутри направляющая помпа»). Флоппаза переносит фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин с внутреннего слоя мембраны на внешний («наружу направляющая помпа»). Скрамблаза производит неспецифическое бинаправленное распределение липидов в фосфолипидном бислое плазмалеммы (рис. 1). При стимуляции клетки и увеличении содержания кальция происходит активация скрамблазы и флоппазы при сопутствующем ингибировании флиппазы, что и приводит к нарушению физиологической мембранной асимметрии [3]. В результате участок мембраны тромбоцита «выпячивается» и отделяется в виде микровезикулы. Данный процесс носит название «блеbbing мембраны» (рис. 2).

Таким образом, состав мембран ТМ отличается от состава мембран тромбоцитов. Определено,

что ТМ формируются не только в циркулирующей крови, но и спонтанно образуются в период хранения тромбоцитов, обнаруживаются в концентратах тромбоцитов, свежезамороженной плазме и криопреципитате [13, 16].

Функции ТМ. В настоящее время описан ряд функций ТМ, включающих распространение характеристик материнской клетки, перенос рецепторов, органелл, матричной РНК, микроРНК и других белков в отдаленные клетки, участие в регуляции ангиогенеза и реактивных изменений сосудов, в развитии воспаления и метастазировании опухолей, в иммунных ответах и патогенезе инфекционных заболеваний, в стимулировании экспрессии адгезионных молекул, а также в регуляции коммуникативных взаимодействий клеток [3, 10, 11, 25, 27, 32].

Одной из активно изучаемых и перспективных в клиническом плане функций является способность ТМ влиять на биологические свойства клеток крови и кроветворных клеток. При сокультивировании ТМ с прогениторными клет-

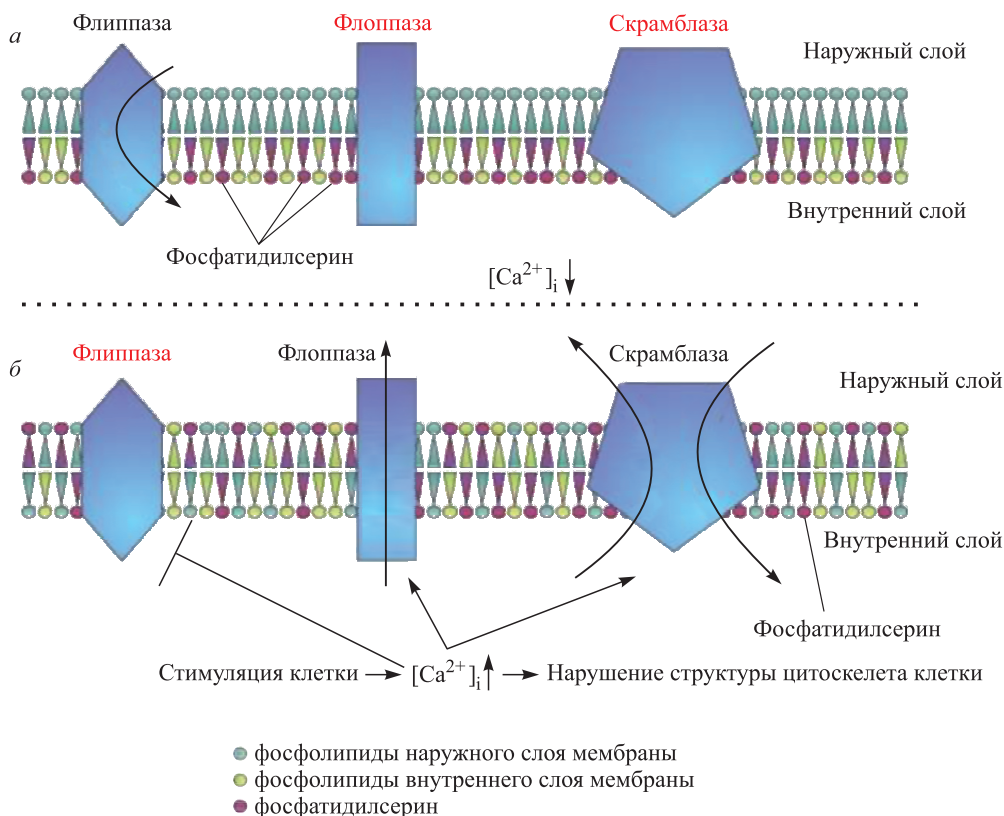


Рис. 1. Регуляция асимметричного расположения фосфолипидов в мембране клетки при помощи трехкомпонентной системы ферментов: флиппазы, флоппазы и скрамблазы [15]; а – клетка в покое, б – клетка при формировании микровезикул, $[Ca^{2+}]_i$ – ионы кальция

Fig. 1. Maintenance of the asymmetric distribution of phospholipids in the membrane by ternary enzyme system: flippase, floppase and scramblase [15]; a – resting cell, b – cell during the formation of microvesicles, $[Ca^{2+}]_i$ – calcium ions

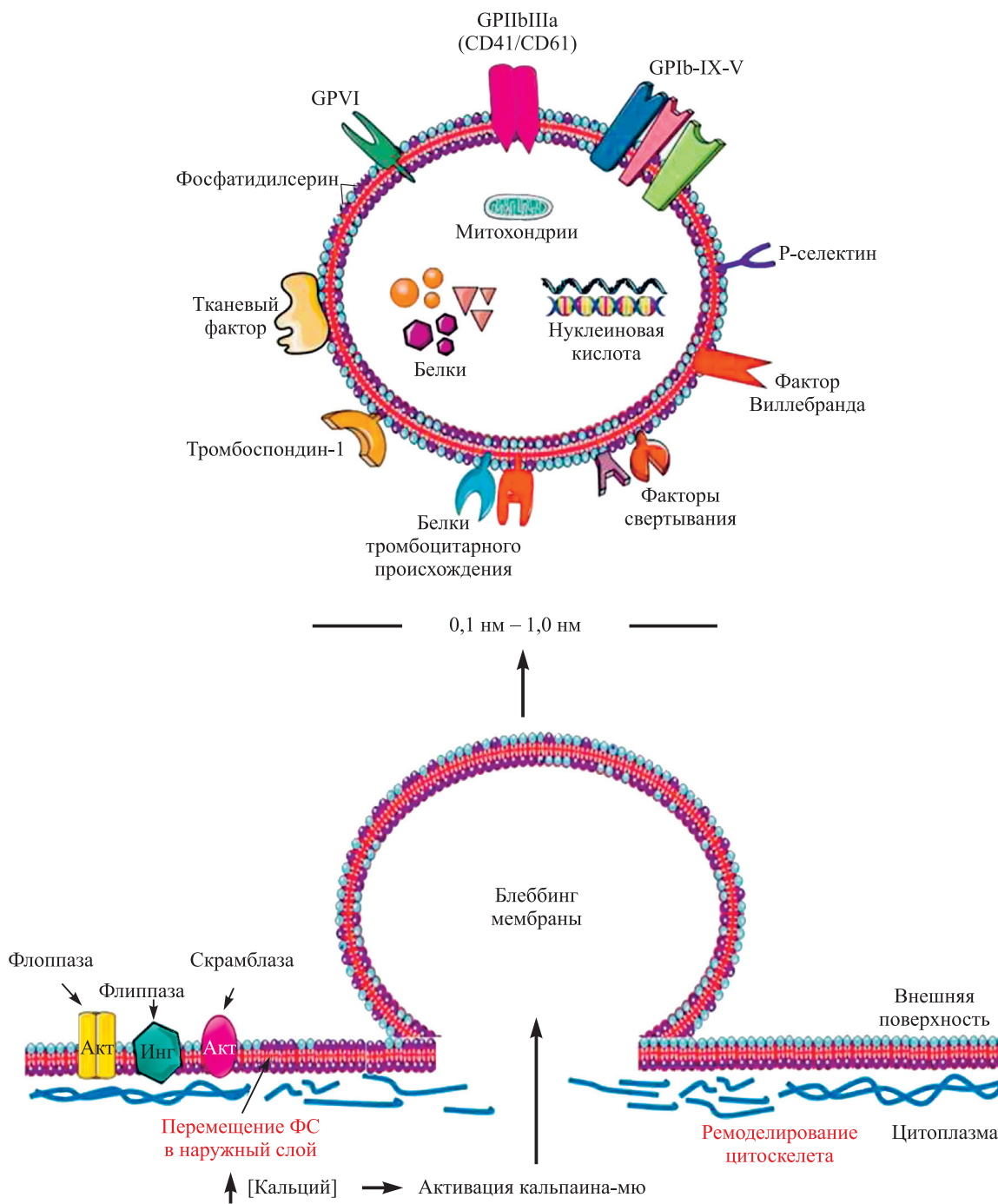


Рис. 2. Схема образования микровезикул [53]; GP – гликопротеиды, рецепторы тромбоцитов; Акт – активация; Инг – ингибирование

Fig. 2. Microvesicle formation [53]; GP – platelet receptors; Акт – activation; Инг – inhibition

ками крови возникает ответная реакция клеток, выраженная хемотаксисом, стимуляцией адгезии, пролиферации и приживления, активацией внутриклеточных сигнальных систем [11]. Кроме того, обнаружено, что при сокультивировании с эндотелиальными прогениторными клетками ТМ повышают их ангиогенную активность [3, 46]. Н.К. Kim et al. отметили, что ТМ принимают ак-

тивное участие в развитии кровеносных сосудов, способствуя пролиферации эндотелия. Данный эффект авторы объяснили воздействием факторов роста и сфингозин-1-фосфата, содержащихся в ТМ [32].

В рамках настоящего обзора особый интерес представляет присущая ТМ проагрегантная и прокоагулянтная активность, на которую обраща-

ют внимание многие исследователи [3, 4, 15, 27]. Показано, что ТМ воздействуют на эндотелий сосудов, вызывая в нем изменения путем передачи эндотелиоцитам арахидоновой кислоты, а также то, что ТМ усиливают адгезию тромбоцитов благодаря наличию в их составе коллаген-связывающих рецепторных белков [3, 13]. Стоит подчеркнуть, что участие ТМ в процессе свертывания крови стало первой из выявленных у них функций [3, 47]. *E.I. Sinauridze et al.* в своей статье указывали на наличие у ТМ выраженной прокоагулянтной активности, в 50–100 раз превышающей таковую у активированных тромбоцитов [5, 47]. Это объясняется тем, что, несмотря на большую разницу в размерах и площадях поверхностей тромбоцита и ТМ, площадь прокоагулянтной поверхности ТМ существенно больше площади соответствующей поверхности активированного тромбоцита [3, 15, 47]. Причиной является высокая концентрация фосфатидилсерина (в связи с особенностями образования ТМ) на поверхности данных микровезикул, а также наличие в их составе тканевого фактора – трансмембранного рецептора фактора VII/VIIa, играющего главную роль в инициации внешнего пути коагуляции. Наряду с этим ТМ имеют на своей поверхности сайты связывания активированных факторов V, VIIIa и IXa [3, 15], что ускоряет реализацию контактного (внутреннего) пути свертывания крови.

В независимости от стимула, вызвавшего образование ТМ, они обеспечивают около 25 % прокоагулянтной активности крови [15]. Необходимо отметить, что все без исключения микровезикулы (из клеток крови и эндотелия) активируют свертывание крови. Однако считается, что наиболее высокой прокоагулянтной активностью среди всех микровезикул обладают именно ТМ, которые одновременно являются и самыми многочисленными в плазме крови [3, 5, 19].

Препараты крови, обогащенные ТМ. Имеется ряд работ, в которых изучалась эффективность для коррекции коагулопатии как специальных составов из микровезикул тромбоцитов, так и препаратов, содержащих помимо данных микровезикул ряд высокоадгезивных белков. К первой группе можно отнести пригодные для инфузий препараты тромбоцитарных мембран (IPM – infusible platelet membranes) [17, 33, 41–43], ко второй – криопреципитат, изготавливаемый из плазмы крови по известной стандартной технологии [16, 35, 51].

Пригодные для трансфузий препараты тромбоцитарных мембран. Во-первых, данные препараты были исследованы *in vitro*, благодаря чему и получена информация об их составе. Основными компонентами IPM оказались белки

и фосфолипиды, а также, в меньших количествах, холестерин и углеводы [17, 41]. Фосфолипидный состав препаратов IPM совпадает с фосфолипидным составом мембран целых тромбоцитов [41]. В свою очередь, фосфолипидный состав ТМ в целом совпадает с фосфолипидным составом IPM, но может иметь некоторые отличия в зависимости от характера стимулирующего влияния, вызвавшего образование ТМ [12]. В препаратах IPM не выявляются маркеры цитоплазматических гранул, α -гранул или плотных гранул тромбоцитов, в число которых входят полинуклеотидфосфорилаза, фактор V свертывания крови, а также серотонин [17, 41]. Также в IPM отсутствуют иммуномодулирующие медиаторы тромбоцитов, которые способствуют возникновению посттрансфузионных иммунологических реакций (серотонин и др.) [5, 39, 40]. Важно отметить, что IPM содержат гликопротеин Ib, но не имеют в своем составе гликопротеина IIb/IIIa. Последний находится на поверхности мембран тромбоцитов, и предполагается, что он разрушается в процессе приготовления IPM, в частности, при центрифугировании и температурных воздействиях [41].

Во-вторых, были проведены доклинические испытания IPM. Обнаружено, что при введении IPM в дозе 2,0 мг/кг сокращается время кровотечения (по Дьюку) из уха кролика с индуцированной тромбоцитопенией, причем данный эффект наблюдался в течение 6 часов после введения препарата, а спустя 24 ч он уже отсутствовал [12, 17, 42]. Кроме того, установлен дозозависимый эффект IPM [43]. В ходе еще одного исследования показано, что применение IPM в дозе 4,0 мг/кг сопровождается сокращением времени кровотечения с 900 до 450 с [48].

В-третьих, компанией Cypress Bioscience (США) был разработан препарат тромбоцитарных мембран под названием IPM Cyplex™. Он получался из образцов устаревших тромбоконцентратов и содержал сферические микровезикулы диаметром около 0,6 нм, имеющие в своем составе прокоагулянтные фосфолипиды. IPM Cyplex™ прошел I и II фазу клинических испытаний. В I фазе клинических испытаний он вводился условно здоровым добровольцам в дозе 6,0 мг/кг внутривенно в течение 30–40 минут. Перед проведением исследования испытуемые получали ацетилсалициловую кислоту *per os* и затем среди них отбирались лица с увеличенным временем кровотечения. Введение данной группе добровольцев IPM Cyplex™ приводило к сокращению времени кровотечения. При этом ни у кого из них в крови в последующем не было обнаружено антител к компонентам IPM Cyplex™ [7, 41]. Во II фазе клинических испытаний участвовал 31 пациент с

Таблица. Состав криопреципитата [19, 51]

Table. Cryoprecipitate content [19, 51]

Компонент	Количество и функция
Фибриноген	Минимальные требования к содержанию 140 мг/ед. Стандартные рекомендации к применению при гипофибриногемии (менее 1,0 г/) для взрослых составляют 10 ед (10 доз препарата). Фибриноген под влиянием тромбина трансформируется в фибрин
Фактор VIII:С	Средняя концентрация 101 МЕ/ед. Минимальные требования к содержанию 70 МЕ/ед. Участвует во внутреннем механизме гемокоагуляции, содержание значительно снижено при гемофилии А и 3 типе болезни Виллебранда
Фибронектин	Наличие 1500 мкг/мл (нормальный уровень в плазме крови 300 мкг/мл). Обладает опсонической активностью, способствующей фагоцитозу частиц нежизнеспособных тканей ретикулоэндотелиальной системой
Фактор XIII	Наличие 20–30 % от исходного содержания фактора XIII в СЗП. Стабилизирует сгусток фибрина путем образования ковалентных связей между мономерами фибрина и поперечного связывания α_2 -антиплазмина, фибриногена, фибронектина, коллагена и других белков для повышения механической прочности сгустка фибрина и его защиты от протеолиза плазмином
Фактор Виллебранда	Наличие 40–70 % от исходного содержания в СЗП. Обеспечивает адгезию тромбоцитов к внутренне поврежденной сосудистой стенке и предотвращает фактор VIII от неспецифического протеолиза
ТМ	Присутствуют в большом количестве (в 265 раз больше, чем в СЗП)

Примечание. Фактор VIII: С – фактор VIII, обладающий коагуляционной активностью; МЕ – международные единицы; СЗП – свежезамороженная плазма.

рефрактерной тромбоцитопенией и количеством тромбоцитов в крови менее $50 \times 10^9/\text{л}$, а также с фенотипическими проявлениями в виде кровотечений из слизистых оболочек. Больные получали либо однократную дозу IPM Cyplex™ (2,0, 4,0 или 6,0 мг/кг), либо стандартный концентрат тромбоцитов. Уменьшение или полное прекращение кровотечения наблюдалось у 65 % пациентов, получавших IPM Cyplex™, и у 60 % пациентов, получавших концентрат тромбоцитов. Представленные результаты свидетельствовали также о том, что препарат IPM может уменьшать рефрактерность пациентов к трансфузии тромбоцитов [7]. Между тем III фаза клинических испытаний IPM Cyplex™ была приостановлена в связи с тем, что Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration) в 2008 г. отказало в выдаче лицензии данному препарату. Такое решение было обусловлено недостаточно убедительными аргументами в пользу его эффективности. В последние годы предпринимаются новые попытки определения терапевтических возможностей данного препарата у пациентов, рефрактерных к трансфузиям тромбоцитов и имеющих антитела к HLA и антигенам тромбоцитов [41].

Криопреципитат. Приготавливаемый из плазмы крови доноров криопреципитат используется в медицине более 50 лет по ряду клинических показаний, однако в последние годы призна-

ется, что потенциал данного компонента крови остается недооцененным [51]. В 1960-х годах J.G. Pool et al. [45] обнаружили, что, если замороженную плазму оттаивать медленно, образуется осадок, обогащенный рядом адгезивных белков: фактором Виллебранда, факторами VIII и XIII, а также фибриногеном. Основные шаги в подготовке криопреципитата мало изменились и на сегодняшний день; замороженная плазма подвергается контролируемому оттаиванию при 1–6 °С для осаждения высокомолекулярных белков [8, 52]. Затем эти белки отделяются центрифугированием, ресуспендируются в небольшом объеме плазмы и хранятся при температуре не выше –18 °С или подвергаются лиофилизации [16, 28]. В результате данной процедуры в состав криопреципитата входят коагуляционно активные компоненты, перечисленные и охарактеризованные в таблице.

Наблюдение того факта, что антитромбоцитарные антитела могут появляться не только после лечебного применения донорских тромбоцитов, но и после трансфузий криопреципитата [38], побудило к поиску в нем ТМ. Согласно полученным J.N. George et al. данным, основанным на использовании антител к гликопротеиду IIb тромбоцитов, концентрация микрочастиц мембраны тромбоцитов в криопреципитате оказалась в 29 раз выше, чем в криосупернатантной фракции, и в 265 раз больше, чем в исходной плазме

крови, лишенной тромбоцитов путем центрифугирования (5000 g в течение 5 мин) [26]. Это очень интересный факт, связанный, очевидно, с результатами физического воздействия на тромбоциты (гравитационного, температурного). И он позволяет предположить полезность использования криопреципитата для «протезирования» функции тромбоцитов в тех случаях, когда своевременная их доставка для проведения лечебных мероприятий по разным причинам маловероятна. Кроме того, можно обратить внимание на высокое содержание в криопреципитате высокоадгезивных белков (см. таблицу), роль которых для остановки кровотечения и обеспечения репаративных процессов хорошо известна.

Сказанное выше может проиллюстрировать следующий клинический случай с применением криопреципитата, наблюдавшийся в Алтайском филиале НМИЦ гематологии.

Больная Ф.О., 85 лет. На фоне двойной анти-тромбоцитарной терапии (прием кишечнорастворимой формы ацетилсалициловой кислоты в сочетании с клопидогрелем), назначенной кардиологом в связи с недостаточностью аортального клапана и аритмией (пароксизмы фибрилляции предсердий), остро развилось массивное кровотечение из толстого кишечника, в связи с чем была выполнена резекция сигмовидной кишки с формированием одноствольного противоестественного заднего прохода (07.2016 г.). В последующем в течение года неоднократно наблюдались рецидивы кишечного кровотечения (на фоне тромбоцитопении – $65\text{--}89 \times 10^9/\text{л}$), которое останавливалось консервативно в стационарных условиях (с использованием рекомбинантного фактора VIIa, концентрата тромбоцитов, свежзамороженной плазмы и транексамовой кислоты). Диагностическое обследование показало наличие дивертикулярной болезни толстой кишки. Последнее поставило вопрос о повторном оперативном вмешательстве в виде гемиколонэктомии. В противовес этому решению была выбрана и реализована тактика, основанная на профилактическом ежемесячном введении криопреципитата в объеме 8 ед (4 ед в сутки), что привело к исчезновению эпизодов кишечного кровотечения на протяжении последних двух лет и явилось основой персонализированной органосохраняющей технологии.

Заключение

Тромбоцитарные микровезикулы представляют собой значительный научный и практический интерес для исследователей. Они обладают многочисленными свойствами и функциями, использование которых может изменить подходы к

лечению и диагностике многих заболеваний. На данный момент одним из наиболее перспективных направлений исследований представляется дальнейшее изучение прокоагулянтной активности ТМ при управлении кровотечениями микроциркуляторного типа.

Список литературы / References

1. Гомзикова М.О., Гайфулина Р.Ф., Мустафин И.Г., Чернов В.М., Мифтахова З.Р., Галявич А.С., Ризванов А.А. Мембранные микровезикулы: биологические свойства и участие в патогенезе заболеваний. *Клеточ. трансплантология и тканев. инженерия*. 2013; 8 (1): 6–11.

Gomzikova M.O., Gayfullina R.F., Mustafin I.G., Chernov V.M., Miftakhova Z.R., Galyavich A.S., Rizvanov A.A. Membrane microvesicles: biological properties and involvement in pathogenesis of diseases. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya = Cellular Transplantation and Tissue Engineering*. 2013; 8 (1): 6–11. [In Russian].

2. Зубаиров Д.М., Зубаирова Л.Д. Микровезикулы в крови. Функции и их роль в тромбообразовании. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 168 с.

Zubairov D.M., Zubairova L.D. Microvesicles in blood. Functions and their role in thrombus formation. Moscow: GEOTAR-Media, 2009. 168 p. [In Russian].

3. Кубатиев А.А., Боровая Т.Г., Жуковская В.Г., Адиевская С.Г., Шевлягина Н.В. Микрочастицы тромбоцитов: образование и свойства. *Патогенез*. 2017; 15 (2): 4–13. doi: 10.25557/GM.2017.2.7296

Kubatiev A.A., Borovaya T.G., Zhukovitskaya V.G., Adreevskaya S.G., Shevlyagina N.V. Platelet microparticles: formation and properties. *Patogenez = Pathogenesis*. 2017; 15 (2): 4–13. [In Russian]. doi: 10.25557/GM.2017.2.7296

4. Пальцын А.А. Микрочастицы тромбоцитов. *Патол. физиология и эксперим. терапия*. 2017; 61 (1): 99–105. doi: 10.25557/0031-2991.2017.01.99-105

Paltsyn A.A. Platelet microparticles. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2017; 61 (1): 99–105. [In Russian]. doi: 10.25557/0031-2991.2017.01.99-105

5. Пантелеев М.А., Абаева А.А., Баландина А.Н., Беляев А.В., Нечипуренко Д.Ю., Обыденный С.И., Свешникова А.Н., Шибек А.М., Атауллаханов Ф.И. Внеклеточные везикулы плазмы крови: состав, происхождение, свойства. *Биол. мембраны*. 2017; 34 (3): 155–161. doi: 10.7868/S0233475517030069

Panteleev M.A., Abaeva A.A., Balandina A.N., Belyaev A.V., Nechipurenko D.Yu., Obydennyj S.I., Sveshnikova A.N., Shibeko A.M., Ataulakhanov F.I. Extracellular vesicles of blood plasma: composition, origin, properties. *Biologicheskije membrany = Biological Membranes*. 2017; 34 (3): 155–161. [In Russian]. doi: 10.7868/S0233475517030069

6. Титов В.Н. Микрочастицы плазмы крови, микровезикулы, экзосомы, тельца апоптоза и макрофаги Купфера в печени – поздняя в филогенезе система реализации биологической функции эндоэкологии (лекция). *Клин. лаб. диагностика*. 2011; (11): 29–39.
- Titov V.N. Microparticles of blood plasma, microvesicles, exosomes, corpuscles of apoptosis and macrophages Kupffer cells in liver – late in the phylogenesis system for the implementation of the biological function of endoecology (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*. 2011; (11): 29–39. [In Russian].
7. Alving B.M., Reid T.J., Fratantoni J.C., Finlayson J.S. Frozen platelets and platelet substitutes in transfusion medicine. *Transfusion*. 1997; 37: 866–876. doi: 10.1046/j.1537-2995.1997.37897424413.x
8. American Association of Blood Banks Technical Manual. Ed. 19. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2017.
9. Anthwi-Baffour S., Adjei J., Aryeh C., Kyeremeh R., Kyri F., Seidu M.A. Understanding the biosynthesis of platelets-derived extracellular vesicles. *Immun. Inflamm. Dis*. 2015; 3 (3): 133–140. doi: 10.1002/iid3.66
10. Ardoin S.P., Shanahan J.C., Pisetsky D.C. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand. J. Immunol.* 2007; 66: 159–165.
11. Baj-Krzyworzeka M., Majka M., Pratico D., Ratajczak J., Vilaire G., Kijowski J., Reza R., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol*. 2002; 30: 450–459.
12. Biro E., Akkerman J.W., Hoek F.J., Gorter G., Pronk L.M., Sturk A., Nieuwland R. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3: 2754–2763. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01646.x
13. Blajchman M.A. Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1: 1637–1641.
14. Boudreau L.H., Duchez A.-C., Cloutier N., Soulet D., Martin N., Bollinger J., Paré A., Rousseau M., Naika G.S., Lévesque T., Laflamme C., Marcoux G., Lambeau G., Farndale R.W., Pouliot M., Hamzeh-Cognasse H., Cognasse F., Garraud O., Nigrovic P.A., Guderley H., Lacroix S., Thibault L., Semple J.W., Gelb M.H., Boilard E. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood*. 2014; 124 (14): 2173–2183. doi: 10.1182/blood-2014-05-573543
15. Burnier L., Fontana P., Kwak B.R., Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb. Haemost.* 2009; 101 (3): 439–451. doi: 10.1160/TH08-08-0521
16. Callum J.L., Karkouti K., Lin Y. Cryoprecipitate: the current state of knowledge. *Transfus. Med. Rev*. 2009; 23 (3): 177–188. doi: 10.1016/j.tmr.2009.03.001
17. Chao F.C., Kim B.K., Houranieh A.M., Liang F.H., Konrad M.W., Swisher S.N., Tullis J.L. Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelets. *Transfusion*. 1996; 36: 536–542. doi: 10.1046/j.1537-2995.1996.36696269513.x
18. Coumans F.A.W., Brisson A.R., Buzas E.I., Dignat-George F., Drees E.E.E., El-Andaloussi S., Emanueli C., Gasecka A., Hendrix A., Hill A.F., Lacroix R., Lee Y., van Leeuwen T.G., Mackman N., Mäger I., Nolan J.P., van der Pol E., Pegtel D.M., Sahoo S., Siljander P.R.M., Sturk G., de Wever O., Nieuwland R. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ. Res*. 2017; 120 (10): 1632–1648. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309417
19. Curry N., Raja A., Beavis J., Stanworth S., Harrison P. Levels of procoagulant microvesicles are elevated after traumatic injury and platelet microvesicles are negatively correlated with mortality. *J. Extracell. Vesicles*. 2014; 3: 25625. doi: 10.3402/jev.v3.25625
20. Curtis A.M., Edelberg J., Jonas R., Rogers W.T., Moore J.S., Syed W., Mohler E.R. 3rd. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vasc. Med*. 2013; 18 (4): 204–214. doi: 10.1177/1358863X13499773
21. Daleke D.L. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J. Lipid. Res*. 2003; 44 (2): 233–242. doi: 10.1194/jlr.R200019-JLR200
22. Dean W.L., Lee M.J., Cummins T.D., Schultz D.J., Powell D.W. Proteomic and functional characterization of platelet microparticle size classes. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 102: 711–718. doi: 10.1160/TH09-04-243
23. Diamant M., Tushuizen M.E., Sturk A., Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Invest*. 2004; 34 (6): 392–401. doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01355.x
24. Erdbrügger U., Lannigan J. Analytical challenges of extracellular vesicle detection: A comparison of different techniques. *Cytometry A*. 2016; 89 (2): 123–134. doi: 10.1002/cyto.a.22795
25. Faille D., El-Assaad F., Mitchell A.J., Alessi M.C., Chimini G., Fusai T., Grau G.E., Combes V. Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med*. 2012; 16 (8): 1731–1738. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01434.x
26. George J.N., Pickett E.B., Heinz R. Platelet membrane microparticles in blood bank fresh frozen plasma and cryoprecipitate. *Blood*. 1986; 68 (1): 307–309.
27. Goubran H.A., Burnouf T., Stakiw J., Seghatchian J. Platelet microparticle: a sensitive physiological «fine tuning» balancing factor in health and disease. *Transfus. Apher. Sci*. 2015; 52 (1): 12–18. doi: 10.1016/j.transci.2014.12.015

28. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom. Chapter 7: Specifications for Blood Components. 8th ed. 2013. URL: <https://www.transfusionguidelines.org/red-book/chapter-7-specifications-for-blood-components>. Accessed February 2, 2020.
29. Hargett L.A., Bauer N.N. On the origin of microparticles: From «platelet dust» to mediators of intercellular communication. *Pulm. Circ.* 2013; 3 (2): 329–340. doi: 10.4103/2045-8932.114760
30. Italiano J.E. Jr., Mairuhu T.A., Flaumenhaft R. Clinical Relevance of Microparticles from Platelets and Megakaryocytes. *Curr. Opin. Hematol.* 2010; 17 (6): 578–584. doi: 10.1097/MOH.0b013e32833e77ee
31. Janiszewski M., Do Carmo A.O., Pedro M.A., Silva E., Knobel E., Laurindo F.R. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit. Care Med.* 2004; 32 (3): 818–825. doi: 10.1097/01.ccm.0000114829.17746.19
32. Kim H.K., Song K.S., Chung J.H., Lee K.R., Lee S.N. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br. J. Haematol.* 2004; 124 (3): 376–384. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04773.x
33. Lee D.H., Blajchman M.A. Novel treatment modalities: New platelet preparations and substitutes. *Br. J. Haematol.* 2001; 114: 496–505. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.03004.x
34. Manno S., Takakuwa Y., Toti F. Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb. Res.* 2010; 125 (Suppl. 1): 46–48. doi: 10.1016/j.thromres.2010.01.036
35. Marcoux G., Duchez A.C., Rousseau M., Levesque T., Boudreau L.H., Thibault L., Boilard E. Microparticle and mitochondrial release during extended storage of different types of platelet concentrates. *Platelets.* 2016; 29: 1–9. doi: 10.1080/09537104.2016.1218455
36. Meziani F., Xavier Delabranche X., Asfar P., Toti F. Bench-to-bedside review: Circulating microparticles – a new player in sepsis? *Crit. Care.* 2010; 14 (5): 236. doi: 10.1186/cc9231
37. McGinn C.M., MacDonell B.F., Shan C.X., Wallace R., Cummins P.M., Murphy R.P. Microparticles: a pivotal nexus in vascular homeostasis and disease. *Curr. Clin. Pharmacol.* 2016; 11 (1): 28–42. doi: 10.2174/1574884711666160122093527
38. McVerry B.A., Machin S.J. Incidence of alloimmunization and allergic reactions to cryoprecipitate in haemophilia. *Vox Sang.* 1979; 36 (2): 77–80. doi: 10.1111/j.1423-0410.1979.tb04402.x
39. Morrell C.N. Immunomodulatory mediators in platelet transfusion reactions. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2011; 2011: 470–474. doi: 10.1182/asheducation-2011.
40. Muralidharen-Chari V., Sedgwick A., D’Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.* 2010; 123: 1603–1611. doi: 10.1242/jcs.064386.
41. Nasiri S. Infusible platelet membrane as a platelet substitute for transfusion: an overview. *Blood Transfus.* 2013; 11 (3): 337–342. doi: 10.2450/2013.0209-12
42. Nasiri S., Heidari M., Rivandi S. Evaluation of hemostatic effectiveness of infusible platelet membrane in rabbits as a potential substitute for platelet transfusion. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics.* 2012; 2: 282. doi: 10.22270/jddt.v2i5.282
43. Nasiri S., Heidari M., Rivandi S. Infusible platelet membranes improve hemostasis: studies with two different injection doses. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2012; 3: 4895–4898. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.3(12).4895-98
44. O’Brien J.R. The platelet-like activity of serum. *Br. J. Haematol.* 1955; 1 (2): 223–228.
45. Pool J.G., Gershgold E.J., Pappenhagen A.R. High-potency antihemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. *Nature.* 1964; 203: 312. doi: 10.1038/203312a0
46. Prokopi M., Pula G., Mayr U., Devue C., Gallagher J., Xiao Q., Boulanger C.M., Westwood N., Urbich C., Willeit J., Steiner M., Breus J., Xu Q., Kiechl S., Mayr M. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell culture. *Blood.* 2009; 114 (3): 723–732. doi: 10.1182/blood-2009-02-205930
47. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Panteleev M.A., Krymskaya O.V., Ataulkhanov F.I. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* 2007; 97 (3): 425–434.
48. Vostal J.G., Reid T.J., Mondoro T.H. Summary of a workshop on in vivo efficacy of transfused platelet components and platelet substitutes. *Transfusion.* 2000; 40 (6): 742–750. doi: 10.1046/j.1537-2995.2000.40060742.x
49. Westerman M., Porter J.B. Red blood cell-derived microparticles: An overview. *Blood Cells Mol. Dis.* 2016; 59: 134–139. doi: 10.1016/j.bcmd.2016.04.003
50. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 1967; 13 (3): 269–288. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x
51. Wong H., Curry N. Cryoprecipitate transfusion: current perspectives. *International Journal of Clinical Transfusion Medicine.* 2016; 4: 89–97. doi: 10.2147/IJCTM.S99042
52. Yang L., Stanworth S., Baglin T. Cryoprecipitate: an outmoded treatment? *Transfus. Med.* 2012; 22 (5): 315–320. doi: 10.1111/j.1365-3148.2012.01181.x
53. Zaldivia M.T.K., McFadyen J.D., Lim B., Wang X., Peter K. Platelet-derived microvesicles in cardiovascular diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* 2017; (4): 74. doi: 10.3389/fcvm.2017.00074

Сведения об авторах:

Андрей Павлович Момот, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-8413-5484, e-mail: xyzan@yandex.ru

Наталья Олеговна Царигородцева, e-mail: misssherlockian@gmail.com

Дмитрий Владимирович Фёдоров, д.м.н., проф., e-mail: dima.fedorovdv@yandex.ru

Константин Михайлович Бишевский, к.м.н., e-mail: kombish@yandex.ru

Наталья Владимировна Вострикова, к.м.н., e-mail: benzobak10@yandex.ru

Елена Евгеньевна Климова, к.м.н., e-mail: elenklim@icloud.com

Information about the authors:

Andrey P. Momot, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-8413-5484, e-mail: xyzan@yandex.ru

Natalia O. Tsarigorodtseva, e-mail: misssherlockian@gmail.com

Dmitry V. Fedorov, doctor of medical sciences, professor, e-mail: dima.fedorovdv@yandex.ru

Konstantin M. Bishevski, candidate of medical sciences, e-mail: kombish@yandex.ru

Natalia V. Vostrikova, candidate of medical sciences, e-mail: benzobak10@yandex.ru

Elena E. Klimova, candidate of medical sciences, e-mail: elenklim@icloud.com

Поступила в редакцию 11.10.19

После доработки 05.12.19

Принята к публикации 07.02.20

Received 11.10.19

Revision received 05.12.19

Accepted 07.02.20