

Новые представления о свертывании крови

Ф.И. Атауллаханов¹⁻³, А.Г. Румянцев^{1, 4}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1; ²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119992, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2;

³ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» Российской академии наук; Россия, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4; ⁴ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Контактные данные: Фазаил Иноятович Атауллаханов ataullakhanov.fazly@gmail.com

В последние годы идет активный пересмотр представлений о механизмах свертывания крови. Традиционные представления во многом оказались неточны, что является главной причиной несостоятельности традиционной коагулограммы. Набор общепринятых методов оценки состояния гемостаза оказался малочувствителен, особенно к гиперкоагуляционным нарушениям. В данной работе рассматриваются современные представления о том, как происходит свертывание крови. Из этого рассмотрения вытекает необходимость критического пересмотра существующих методов оценки состояния гемостаза и стандартной коагулограммы. Лекция заканчивается кратким рассмотрением того, какой набор методов представляется на сегодня наиболее информативным и мог бы лечь в основу новой коагулограммы.

Ключевые слова: гемостаз, тромбоз, кровотечение, свертывание, тромбин, остановка роста тромба, прокоагулянтный тромбоцит, гиперкоагуляция, новые представления о свертывании

DOI: 10.17650/2311-1267-2018-5-3-13-22

New insights into the blood clotting

F.I. Ataulakhanov¹⁻³, A.G. Romyantsev^{1, 4}

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow, 117997, Russia; ²Lomonosov Moscow State University; 1, Bldg. 2 Leninskie Gory St., Moscow, 119992, Russia; ³Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, Russian Federation;

⁴Kosygina St., Moscow, 119991, Russia; ⁴N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia

In recent years, an active revision of ideas about the mechanisms of blood clotting has been performed. Traditional views were largely inaccurate, which is the main reason for the inconsistency of the modern standard set of coagulation tests. This set was found to be insensitive, especially to hypercoagulable disorders. In this paper, we consider modern concepts of how blood clotting occurs. From this consideration follows the need for a critical review of existing methods for assessing the status of hemostasis and a standard set of laboratory tests. The lecture ends with a brief examination of which methods are the most informative today and could form the basis of a new informative coagulation testing set.

Key words: hemostasis, thrombosis, bleeding, clotting, thrombin, stopping of thrombus growth, procoagulant platelet, hypercoagulation, new insights into clotting

Введение

Нарушения системы кровообращения являются причиной около 60 % летальных исходов при самых различных патологиях и травмах (таблица). Более половины этих нарушений занимают тромбозы и массивные кровотечения. Таким образом, нарушения в системе гемостаза сопряжены с наиболее высокой летальностью. К сожалению, с годами не наблюдается изменений статистики, и это никак не связано с особенностями российского здравоохранения, поскольку похожие цифры отмечаются и в других развитых странах. Не в последнюю очередь такая высокая ле-

тальность вследствие тромбозов/кровотечений связана с серьезными пробелами в понимании механизмов работы системы свертывания. В последние годы наблюдается большой прогресс в исследовании этих механизмов. Это ведет к значительному пересмотру базовых представлений о том, как происходит формирование тромбов и остановка кровотечения. В данной лекции мы рассмотрим, как изменились и какими стали представления о свертывании крови.

Гемостаз — это механизм защиты нашей кровеносной системы от повреждений. Эта система не зря называется сердечно-сосудистой. Это действительно

Показатели смертности населения России по основным классам причин смерти (данные Федеральной службы государственной статистики)
Death rates of the Russian population by main classes of causes of death (data of the Federal State Statistics Service)

Показатель Parameter	Доля в общем числе умерших, % Share in total number of deceased, %				
	1995 г.	2000 г.	2005 г.	2007 г.	2013 г.
Всего умерших Total deaths	100	100	100	100	100
В том числе от: Including:					
болезней системы кровообращения diseases of the circulatory system	52,8	55,3	56,4	57,0	57,0
новообразований neoplasms	13,6	13,4	12,5	13,9	16,1
внешних причин смерти external causes of death	15,8	14,3	13,7	12,5	9,3
болезней органов дыхания respiratory diseases	4,9	4,6	4,1	3,7	4,1
болезней органов пищеварения diseases of the digestive system	3,1	2,9	4,1	4,2	5,0
некоторых инфекционных и паразитарных болезней some infectious and parasitic diseases	1,4	1,6	1,7	1,7	1,7
прочих болезней other diseases	8,4	7,9	7,5	7,0	6,8

сложный сосуд, заполненный довольно быстро текущей жидкостью, к тому же находящейся под давлением. Даже небольшое отверстие в таком сосуде могло бы стать причиной вытекания большей ее части, и, как следствие, причиной неизбежной смерти, если бы не было системы быстрого «ремонта» повреждений. Таким «ремонтом» повреждений сосудов занимается система гемостаза. В ответ на повреждение она быстро производит пробку, которая временно закрывает поврежденное место. Физиологическая задача, стоящая перед этой системой, имеет особенность, которая и делает свертывание слабым звеном в системе жизнеобеспечения нашего организма, и приводит к таким фантастическим цифрам смертности. Эта особенность – балансирование между жидким и твердым состоянием. Кровь – жидкость, которая может быстро свернуться, т. е. перейти в твердое, точнее, гелеобразное состояние. Этот переход должен происходить контролируемо и локально, чтобы ограничиться перекрытием зоны повреждения и не затронуть текучесть остального объема крови. Избыточная склонность к свертыванию – гиперкоагуляция – чревата тромбозами, недостаточная – гипокоагуляция – возникновением неконтролируемых повторяющихся кровотечений, т. е. кровоточивостью. Похоже, что такую систему, которая должна балансировать между противоположными состояниями, поддерживать в оптимальном состоянии намного сложнее, чем другие физиологические системы организма.

Сложность регуляции, видимо, лежит в основе и другой трудности, с которой сталкивается лечащий врач, имеющий дело с нарушениями гемостаза. Тесты, составляющие сегодня во всем мире основу коагулограммы, малочувствительны и зачастую не помогают врачу выявить нарушения в системе свертывания. Многие из этих тестов были разработаны более 100 лет назад. Они основаны на идее измерения времени свертывания всего исследуемого объема крови в ответ на добавление различных активаторов. Эти тесты до сих пор оставались и остаются на вооружении клиницистов потому, что прогресс в понимании механизмов свертывания был крайне медленным. Только появление новых методов исследования в последние годы привело к значительному прорыву в этой области. Стало ясно, что в прежних представлениях было неправильно и почему старые методы настолько малочувствительны. Одной из главных причин такого состояния дел было непонимание того, что в процессе свертывания крови очень важны пространственные аспекты. В организме сгусток крови формируется только в области повреждения стенки сосуда и занимает небольшой объем, тогда как в традиционных тестах гемостаза сворачивается весь объем крови либо плазмы.

Низкая чувствительность коагулограммы к нарушениям гемостаза, особенно к проявлениям разных вариантов гиперкоагуляции, привела к тому, что врачи не придают лабораторным тестам большого



Рис. 3. Гемостаз. Схематично показано, что внутренняя поверхность сосуда выстлана эндотелиальными клетками. В месте повреждения эндотелия возникает тромб – агрегат тромбоцитов, пронизанный сетью нитей фибрина. Агрегат включает в себя и другие клетки крови, в первую очередь эритроциты, которые пассивно попали в фибриновую сеть. Воспроизведено с электронного ресурса: <https://www.msmanuals.com/home/blood-disorders/blood-clotting-process/how-blood-clots#v774965>

Fig. 3. Hemostasis. Schematically it is shown that the inner surface of the vessel is lined with endothelial cells. At the site of damage to the endothelium, there is a thrombus – a platelet aggregate, penetrated by a network of fibrin filaments. The unit includes other blood cells, primarily red blood cells, which passively entered the fibrin network. Reproduced from the electronic resource: <https://www.msmanuals.com/home/blood-disorders/blood-clotting-process/how-blood-clots#v774965>

ка, они не могут расти или делиться. Задача тромбоцита – приклеиться к месту повреждения. Для выполнения своей функции они должны активироваться в процессе, который управляется десятком активаторов, действующих через многочисленные рецепторы. Сеть сигнальных путей в тромбоците, управляющих его ответом, является сложной и плохо изученной. Сам по себе ответ тромбоцита представляет собой не простое «приклеивание», а включает множество функций, начиная от первичной адгезии и заканчивая везикуляцией. В исходном, неактивированном виде тромбоциты напоминают двояковыпуклые «тарелочки» (см. рис. 1, слева). При активации форма тромбоцита меняется, становясь в большинстве случаев амебовидной (см. рис. 1, справа). Цитоплазма клетки содержит многочисленные гранулы, главными из которых являются плотные гранулы, содержащие преимущественно низкомолекулярные вещества, такие как серотонин и адезиндифосфат, и альфа-гранулы, содержащие белки, важные для свертывания крови, такие как фибриноген, фактор свертывания V, фактор фон Виллебранда и многие другие. Содержимое этих гранул секретируется при активации. Способность к активации – быстро и в большинстве случаев необратимому переходу в некое новое состояние – является главным качеством тромбоцита. Основными физиологическими активаторами тромбоцитов являются коллаген – главный белок внеклеточного матрикса (рис. 4а) и тромбин – сериновая протеиназа, центральный фермент плазменной системы свертывания (рис. 4б) [3].

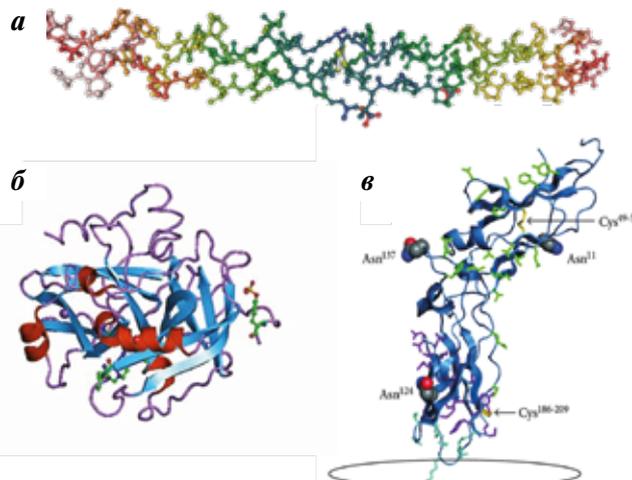


Рис. 4. Активаторы свертывания крови: а – коллаген, основной белок внеклеточного матрикса тканей; б – тромбин, один из главных активаторов тромбоцитов и основной фермент каскада реакций свертывания; в – тканевой фактор, интегральный белок мембран большинства клеток человеческого организма, не контактирующих с кровью. Мембрана клетки, в которую встроены тканевой фактор, условно показана внизу овалом. Все молекулы даны не в масштабе. Воспроизведено из [4]

Fig. 4. Activators of blood coagulation: а – collagen, the main protein of the extracellular matrix of tissues; б – thrombin, one of the main activators of platelets and the main enzyme of the cascade of clotting reactions; в – tissue factor, integral membrane protein of the majority of cells of the human body, not in contact with blood. The cell membrane, in which the tissue factor is embedded, is conditionally shown below in an oval. All molecules are not given to scale. Reproduced from [4]

Действие каждого из тромбоцитарных активаторов опосредуется через специализированные рецепторы в мембране тромбоцита. Стимуляция любого из рецепторов ведет к активации сложной сети каскадов внутриклеточной сигнализации, которые управляют ответом клетки; причем разные рецепторы в целом запускают разные пути. Активация тромбоцитов внешне проявляется многочисленными внутренними перестройками и изменениями свойств, основными среди которых считаются: а) изменение формы; б) усиление способности к прикреплению к месту повреждения; 3) появление способности к агрегации с другими тромбоцитами; 4) секреция многочисленных веществ из плотных гранул, альфа-гранул и других источников; экспонирование прокоагулянтной мембраны. Вообще говоря, активированное состояние тромбоцита может быть разным: активация тромбоцитов имеет несколько степеней, и экспрессия прокоагулянтной поверхности является одной из высших. Не все эти свойства нужны тромбоциту для формирования агрегата. Часть этих свойств используется для ускорения реакций свертывания крови. Так, экспонирование прокоагулянтной мембраны и секреция альфа-гранул необходимы для осуществления именно второй функции тромбоцитов. Только тромбин или коллаген могут вызывать такой сильный ответ [5, 6].

2. Плазменное звено. Главная биохимическая реакция этой системы – превращение фибриногена в фибрин. Фибриноген – это довольно большой фибриллярный белок плазмы крови с массой 340 тыс. дальтон (рис. 5). Это один из самых массовых белков плазмы. Его концентрация в крови составляет 5 г/л. При активации от фибриногена ферментативно отщепляются 2 небольших пептида.

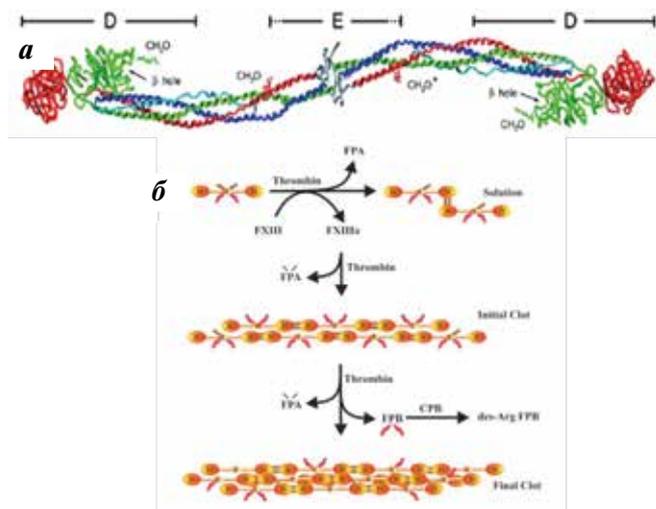


Рис. 5. Фибриноген, белок плазмы, предшественник фибрина, полимер которого вызывает свертывание крови – а; схема полимеризации фибрина – б. Фибрин образуется из фибриногена при отщеплении тромбином 2 небольших полипептидов от домена E. В результате этого открывается сайт связывания, который стабилизирует связь 2 доменов D. Этот процесс может продолжаться, приводя к образованию 2, 3 нитевых фибрилл и более. Воспроизведено из [4]

Fig. 5. Fibrinogen, a plasma protein, a precursor of fibrin, whose polymer causes coagulation – а; polymerization scheme for fibrin – б. Fibrin is formed from fibrinogen when thrombin is cleaved by 2 small polypeptides from domain E. As a result, a binding site is opened that stabilizes the bonding of the 2 domains D. This process can continue, resulting in the formation of 2, 3 or more filament fibrils. Reproduced from [4]

Фибриноген превращается в фибрин, который быстро полимеризуется, образуя длинные фибриллы, способные ветвиться. При активации фибриногена концентрация этих фибрилл быстро возрастает, что приводит к образованию сгустка – «переплетенная» фибрином кровь со всеми клетками и белками превращается в гель и течение крови останавливается. Довольно быстро вслед за этим в геле образуются поперечные шивки, которые превращают его в твердую массу, непроницаемую для жидкости. Активация фибриногена осуществляется ферментом тромбином (см. рис. 4б). Для того чтобы переход в твердое состояние не происходил без необходимости и в любом месте, обычно тромбин в крови отсутствует и появляется только при контакте крови с тканевым фактором. Появляется тромбин, в свою очередь, из неактивного предшественника – протромбина, который, как и фибриноген, является важным компонентом плазмы крови.

Активация тромбина тоже происходит ферментативно, с помощью фактора Ха (см. рис. 2). То же самое относится к фактору X. Его активация вызывается комплексом белков – фактор свертывания VIIa и тканевой фактор. Фактор VIIa присутствует в крови в небольших количествах, а тканевого фактора нет вообще [7]. Это решает проблему поддержания плазмы крови в жидком состоянии. Все необходимые факторы присутствуют в крови постоянно, но в неактивной форме. В начале этой цепочки активаций стоит тканевой фактор, который повсеместно готов активировать свертывание, однако ему это не позволяют сделать клетки эндотелия. Как видно на рис. 2, процесс образования фибрина не сводится только к перечисленным реакциям. Во-первых, многие ключевые реакции свертывания являются мембранно-зависимыми, ускоряясь на многие порядки в присутствии отрицательно заряженных фосфолипидных мембран, с которыми белки свертывания связываются посредством так называемых кальциевых мостиков. На рис. 2 это условно показано в виде двойных дуг под стрелками, изображающими мембранно-зависимые реакции. Во-вторых, на этом же рисунке мы видим большое количество других реакций, вместе с рассмотренными образующими сложную метаболическую сеть. Эта сеть пронизана большим количеством обратных связей, положительных и отрицательных, которые резко усложняют как поведение этой системы в разных ситуациях, так и понимание механизмов ее работы [2].

3. Вся сердечно-сосудистая система изнутри покрыта одним сплошным слоем особых клеток – эндотелиоцитов. Это особый слой, который изолирует все ткани и органы нашего организма от прямого контакта с кровью. Все клетки, находящиеся за этим барьером, несут на своей поверхности тканевой фактор – белок, активирующий плазменное свертывание. Кроме того, все межклеточное пространство содержит большой процент другого активатора – коллагена. Эти 2 белка и являются теми сигналами, которые запускают свертывание. Как только где-нибудь нарушается целостность эндотелия, в этом месте кровь приходит в контакт с этими веществами, обычно с обоими сразу. Активация происходит в ответ на любое повреждение: порез, любое разрушение сосудистой стенки, гибель клеток эндотелия в результате воспаления, образование атеросклеротической бляшки. Это запускает все компоненты свертывающей системы и в результате в месте повреждения образуется тромб, или гемостатическая пробка. Образующаяся структура является временной. Впоследствии она заменится нормальными клетками сосудистой стенки – новыми эндотелиоцитами, предшественники которых циркулируют в крови, поступая туда из костного мозга. Однако процесс регенерации стенки занимает несколько дней. Это слишком долго: за это время организм может погибнуть в результате

потери крови. Временная затычка – тромб – формируется на считанные минуты. Тромб должен образоваться непременно в месте повреждения и быть прочно с ним связанным. Иначе тромб может оторваться и закупорить нормальный сосуд в каком-нибудь важном органе, что нарушит кровоснабжение и приведет к гибели нормальных клеток, вызвав инсульт, инфаркт и т. д.

4. Взаимодействие тромбоцитов и плазменного звена. Тромбоцитарное и плазменное звенья сильно и многообразно связаны друг с другом в процессе свертывания. Так, главный фактор плазменного звена – тромбин – является одним из главных активаторов тромбоцитов. В свою очередь, тромбоциты участвуют в формировании отрицательно заряженных мембран. В нормальном состоянии мембрана тромбоцитов не поддерживает реакций свертывания. Отрицательно заряженные фосфолипиды, в первую очередь фосфатидилсерин, сосредоточены на внутреннем слое мембраны, а фосфатидилхолин внешнего слоя связывает факторы свертывания гораздо хуже. Но состав активированных тромбоцитов неоднороден. Есть небольшая по численности субпопуляция так называемых укутанных тромбоцитов, поверхность мембраны которых сильно обогащена фосфатидилсерином. Реакции плазменных факторов свертывания резко ускоряются на этих мембранах [8].

Все перечисленные участники процесса и реакции между ними известны очень давно. Например, за последние 20 лет ни один фактор не был добавлен к схеме каскада свертывания. Общие представления, сформированные на основе этих данных, тоже сложились давно. Вкратце эти представления можно свести к нескольким утверждениям.

1. В зоне повреждения сначала образуется тромбоцитарный сгусток: тромбоциты активируются и слипаются.

2. Фибрин образуется значительно позже в уже готовом тромбе и укрепляет его.

3. Процессы активации тромбоцитов и реакции плазменного звена, будучи запущенными, способны вызывать активацию новых и новых объемов крови, распространяясь в результате диффузии и кровотока. При этом оставалось непонятным, как этот процесс прерывается, вследствие чего рост сгустка останавливается.

Однако не существует прямых доказательств того, что процесс происходит именно так. Это связано в основном с тем, что прямые методы регистрации процессов, происходящих при росте сгустка в организме, были созданы только в последние десятилетия. В основном прогресс последних лет был обусловлен тем, что исследователи научились метить компоненты свертывающей системы флуоресцентными метками, и были созданы микроскопы, позволяющие наблю-

дать эти флуоресцентно меченые вещества, не нарушая стенку сосуда. Новые исследования показали, что сложившиеся представления во многом нужно подвергнуть критическому пересмотру.

Новые представления о свертывании крови

1. Первые стадии свертывания крови. Роль неактивированных тромбоцитов. Первым шокирующим фактом оказалось то, что процесс начинается вовсе не с активации тромбоцитов. Активация тромбоцита занимает около одной секунды, что, казалось бы, очень быстро. Но поток крови даже в самых маленьких артериолах успевает за секунду унести тромбоциты и факторы их активации на многие миллиметры дальше места повреждения. В этом случае активированные тромбоциты могли бы создать тромб только значительно ниже по течению от места активации. Стало ясно, что к месту повреждения прилипают тромбоциты в неактивированном состоянии. Почему же они не слипаются сами с собой? Похоже, что слипаются, но этот процесс быстро обратим. Обратимое прилипание неактивных тромбоцитов в месте повреждения дает время для активации, а это уже делает процесс связывания необратимым. Большую роль в торможении тромбоцитов играет фактор фон Виллебранда – большой белок, имеющий множество центров связывания для тромбоцитов, который имеет сложную структуру. Он компактно сложен, когда его несет потоком, его центры связывания закрыты. Однако, когда он зацепляется в зоне повреждения, его разворачивает потоком, что делает центры связывания доступными для тромбоцитов.

Обратимость первых стадий связывания тромбоцитов приводит к тому, что формируется слой неактивированных тромбоцитов, который может легко рассыпаться, если активации не произойдет [9]. И это так и происходит, если одновременно со связыванием не образовывается тромбин, который, собственно, и вызывает сильную активацию и необратимое слипание тромбоцитов. Это было показано в красивых опытах группы С. Брасса из университета Пенсильвании *in vivo* в сосудах мышей, которым заранее был введен гирудин – ингибитор образования тромбина [10]. На серии фотографий (рис. 6) хорошо видно, как в зоне повреждения начинает образовываться первичный агрегат тромбоцитов.

Сначала процесс идет примерно одинаково и у контрольных, и у опытных мышей. Однако спустя небольшое время у опытных мышей сгусток рассыпается и тромб не образуется. Интересно то, что и у контрольных мышей сначала образуется довольно большой агрегат, поверхностная часть которого, оболочка, потом рассыпается, оставляя ядро – необратимо склеенный агрегат тромбоцитов и других клеток, пронизанный полимерным фибрином.

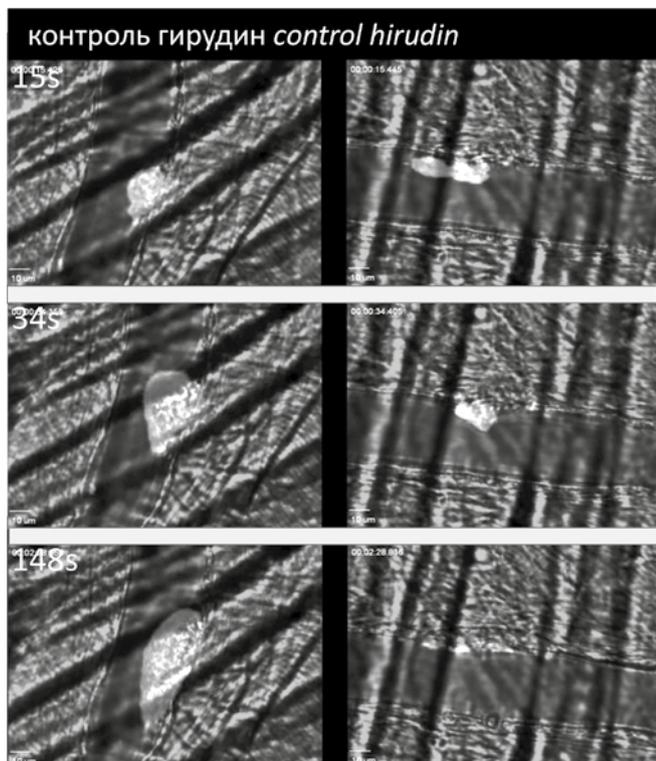


Рис. 6. Динамика роста тромба в артериоле мыши *in vivo* при повреждении стенки сосуда лазером. Тромб окрашен флуоресцентно мечеными антителами к CD41 и виден как светлое овальное пятно. Опытным мышам (правая колонка) перед опытом в кровь был введен гирудин – ингибитор плазменного звена свертывания. Воспроизведено из [10]

Fig. 6. The growth of thrombus in the arteriole of the mouse *in vivo* with damage to the vessel wall by a laser. The thrombus is stained with fluorescently labeled antibodies to CD41 and is seen as a light oval spot. Experimental mice (right column) before the experiment in the blood were injected hirudin – an inhibitor of the plasma coagulation unit. Reproduced from [10]

2. Рост фибринового сгустка и распространение тромбина. Вторая группа фактов, изменившая наши представления о свертывании, связана с открытием закономерностей роста тромба. Оказалось, что будучи активированным, процесс свертывания становится автономным. В крови присутствуют все факторы, необходимые для роста тромба, т. е. присоединения все новых слоев тромбоцитов и распространения тромбина и фибрина вглубь кровотока. Для начала процесса нужен был тканевой фактор, который присутствует в зоне повреждения. Реакции в пристеночной области вызывают образование активных форм факторов. Они могут диффундировать вглубь кровотока. Появления тромбина в наномолярных количествах в какой-то области кровотока достаточно, чтобы резко активировать факторы XI, IX, VIII. А они продолжают каскад реакций, ведущих опять к тромбину (реакции внутреннего пути свертывания). Начинается самоподдерживающееся производство тромбина и его диффузия вглубь сосуда. Возникает лавинообразное нарастание производства тромбина [11]. Это означает, что рост тромба очень похож на распространение

нервного импульса или горение пороха: будучи запущен в одном месте процесс распространяется в пространстве в виде незатухающей волны. Такие волны принято называть автоволнами. Факт распространения тромбина и фибрина в виде автоволны был впервые обнаружен в нашей группе 20 лет назад. На рис. 7 показано распространение тромбина в плазме после активации контакта с поверхностью, покрытой тканевым фактором разной плотности. Хорошо видно, что вблизи области активации количество образующегося тромбина сильно зависит от тканевого фактора. Но по мере удаления волны тромбина от активатора амплитуда этой волны становится постоянной и не зависит от времени и плотности тканевого фактора.

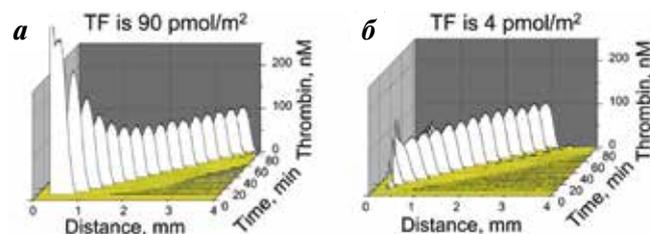


Рис. 7. Распространение тромбина в плазме при активации свертывания тканевым фактором, иммобилизованным на левой стенке камеры, заполненной плазмой, с 4 мкМ фосфолипидов. По оси X – расстояние от стенки, покрытой тканевым фактором до точки измерения. По оси Y – время от момента контакта тканевого фактора с плазмой. Плотность тканевого фактора на стенке: а – 90 нМ/м²; б – 4 нМ/м². Воспроизведено из [12]

Fig. 7. Distribution of thrombin in plasma with activation of clotting by a tissue factor immobilized on the left side of a chamber filled with plasma, with 4 μM phospholipids. The X-axis is the distance from the wall covered by the fabric factor to the measurement point. The Y-axis is the time from the moment of contact of the tissue factor to the plasma. The density of the tissue factor on the wall: a – 90 pM/m²; б – 4 pM/m². Reproduced from [12]

Сеть реакций свертывания сама поддерживает образование новых порций тромбина и его дальнейшее распространение. Это открытие привело к пониманию того, зачем в плазменной системе свертывания имеется так много реакций, в том числе большое количество реакций, прямо не вовлеченных в путь от главного сигнала активации – тканевого фактора, к тромбину и фибрину (см. рис. 2). Факторы, вовлеченные в эти петли положительной обратной связи не только нарастают во времени в том месте, где был контакт с тканевым фактором [13]. Они распространяются вглубь кровотока или агрегата неактивированных тромбоцитов. Там они активируют тромбоциты, что ведет к их необратимому связыванию. Эти исследования объяснили, какую роль играют те или иные реакции в схеме свертывания, и позволили понять, что разные части этой биохимической сети образуют отдельные метаболические блоки, выполняющие разные физиологические задачи в процессе активации и роста тромба. На рис. 8 эти блоки выделены разными цветами. Как только разные части этой сложной

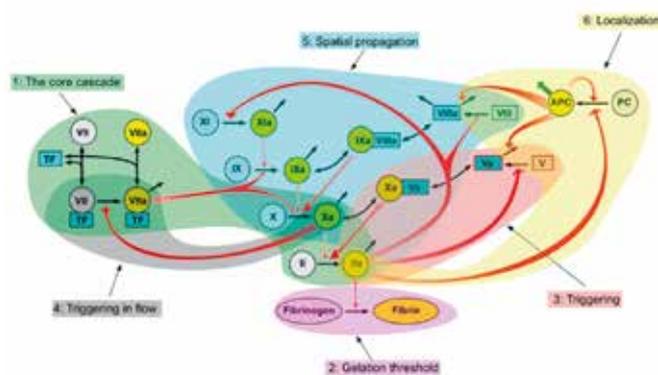


Рис. 8. Блоки реакций системы свертывания, выполняющие разные физиологические функции в процессе образования фибринового сгустка, выделены цветом. Воспроизведено из [14]

Fig. 8. Blocks of reactions of the clotting system that perform different physiological functions during the formation of the fibrin clot are highlighted in color. Reproduced from [14]

сети биохимических реакций распались на логичные физиологические блоки, немедленно разрешились многие парадоксы свертывания [14].

В частности, разрешился парадокс гемофилий. Очень давно известно, что все 3 типа гемофилий – А, В и С обусловлены генетическими дефектами факторов VIII, IX и XI соответственно. Все эти 3 фактора не участвуют в едином метаболическом пути от тканевого фактора к тромбину. Почему же тогда у людей с дефектами этих факторов наблюдаются кровотечения? Сейчас уже ясно, что у них активация свертывания проходит вполне нормально. Но последующий рост тромба сильно заторможен, поскольку эти факторы являются основой блока реакций, ответственных за распространение тромбина и рост тромба. Гемофилии оказались болезнями роста тромба [15, 16]. Стало также очевидным, как связаны между собой 2 главных звена свертывания – тромбоциты и плазменные реакции [17].

3. Остановка роста тромба. Понимание того, что растущий тромб поддерживает свой рост за счет того, что уже заранее присутствует в крови, без привлечения внешних факторов, обозначил новую важную проблему в понимании закономерностей свертывания. Остро встал вопрос о том, как происходит остановка этого роста. Что прерывает этот автоволновой процесс до того, как волна достигнет границ сосуда? Почему не происходит окклюзия сосудов всегда и везде? Почему, в конце концов, вся кровь не превращается в один сплошной тромб? Ответ на этот вопрос оказался самым трудным. Только недавно в результате работы ряда ведущих лабораторий мира начала формироваться правдоподобная картина этой стадии процесса. По-видимому, в этом процессе ключевую роль играет одна из субпопуляций тромбоцитов. В ходе активации тромбоцитов можно наблюдать возникновение 2 очень разных субпопуляций тромбоцитов [18].

Одна, достаточно большая, состоит из хорошо известных амебовидных клеток (см. рис. 1б), которые отлично агрегируют, прочно и необратимо связываясь друг с другом. Вторая субпопуляция – это субпопуляция укутанных тромбоцитов (рис. 9) [19].

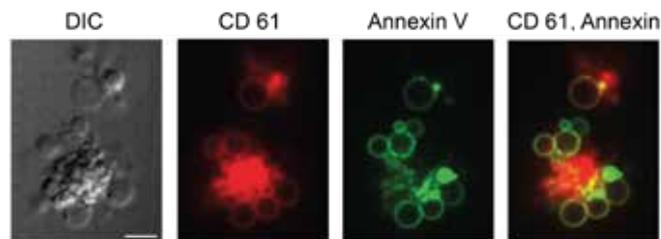


Рис. 9. Прокоагулянтные (укутанные) тромбоциты в процессе образования тромба в проточной камере. Красным помечена основная субпопуляция активированных тромбоцитов (окраска антителами на CD61). Зеленый – окраска аннексином, флуоресцентным белком, связывающимся с фосфатидилсерин. Фосфатидилсерин обнаруживается только на некоторых клетках, которые сильно отличаются от обычных активированных и неактивированных тромбоцитов. Это так называемые укутанные тромбоциты – клетки сферической формы, с гомогенной цитоплазмой, потерявшие все гранулы. Воспроизведено из [19]

Fig. 9. Procoagulant (wrapped) platelets in the process of formation of thrombus in the flow chamber. Red marked the main subpopulation of activated platelets (coloring with antibodies on CD61). Green is the color of annexin, a fluorescent protein that binds to phosphatidylserine. Phosphatidylserine is found only on some cells, which are very different from the usual activated and non-activated platelets. These are so-called wrapped platelets – cells of a spherical shape, with a homogeneous cytoplasm, which have lost all granules. Reproduced from [19]

Это раздутые в шар клетки, которые собрали в одну небольшую область на мембране большинство своих рецепторов и интегринов. Последние результаты по исследованию этих клеток указывают на то, что после активации эти тромбоциты переходят в терминальное состояние. Клетки перестают производить энергию, которая, в частности, нужна для поддержания ассиметричного распределения липидов в мембране. В терминальном состоянии в тромбоцитах активируется фермент скрамблаза, который быстро перебрасывает отрицательно заряженные фосфолипиды из одного слоя в другой, выравнивая их концентрации с обеих сторон мембраны. Благодаря фосфатидилсерину на поверхности этих тромбоцитов хорошо собираются и работают комплексы факторов свертывания [20]. Укутанные тромбоциты очень активно способствуют генерации тромбина и образованию фибрина, зато они практически не способны к агрегации. Если где-то возникает достаточно много таких клеток, в этом месте тромб становится слабо связанным и может разорваться. Кроме того, при терминальной активации тромбоцитов из них образуется довольно много фосфолипидных везикул, имеющих на своей поверхности отрицательно заряженный фосфатидилсерин [21]. Это один из главных источников отрицательно заряженных мембран для сборки активных комплексов каскада реакций свертывания [22].

Одновременно с образованием антиагрегантных тромбоцитов другая, основная субпопуляция тромбоцитов начинает процесс контракции [23, 24]. Это давно известное явление сжатия сгустка. Ранее полагали, что это второстепенный процесс увеличения плотности и твердости тромба. Сейчас мы приписываем этому процессу новую, необычную функцию в остановке роста тромба. Сжимающийся сгусток выталкивает наружу все, что слабо связано с основными его клетками. В первую очередь это прокоагулянтные тромбоциты. Выжимание их на поверхность приводит к обогащению поверхностного слоя этими клетками. Все неактивированные тромбоциты выше этого слоя оказываются слабо связаны и отрываются от основной массы. Происходит разрушение оболочки из неактивированных тромбоцитов. В то же время на поверхности, обогащенной этими прокоагулянтными тромбоцитами, идет интенсивное образование фибрина. Новым тромбоцитам все труднее закрепляться на поверхности, и рост тромба останавливается. Так, согласно современным представлениям, завершается процесс формирования тромба.

Заключение

Новые представления о механизмах свертывания крови помогли понять природу ряда парадоксов и загадок, давно существовавших в коагулологии. Также стало понятно, почему многие классические методы оценки гемостаза оказались мало чувствительны. Появляются новые более адекватные и информативные методы. Новый уровень понимания постепенно пе-

реносится в клиническую сферу. Это не может быть сделано быстро по 2 причинам: 1) нужны клинические доказательства методов, оказавшихся наиболее информативными. Специфика клинической работы не позволяет автоматически переносить методы научных лабораторий в клиническую практику; 2) нужны расширенные исследования нарушений гемостаза при разных патологиях. В силу малой информативности существовавших методов оказалось, что мы плохо понимаем природу нарушений гемостаза при большинстве заболеваний, сопровождающихся нарушениями свертывания. Охватить все области медицины, в которых важную роль играют нарушения свертывания крови, невозможно. Внедрение новых методов оценки состояния системы гемостаза, основанных на обновленных знаниях в этой области, в будущем позволит более качественно диагностировать нарушения гемостаза у пациентов, а также заложит основу для детальной персонализации антикоагулянтной и прокоагулянтной терапии.

Конфликт интересов/Conflict of interests

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

Финансирование/Financing

Работа Ф.И. Атауллаханова была поддержана грантом Российского научного фонда № 16-14-00224.

The research of F.I. Ataulakhanov was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 16-14-00224.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Willoughby S., Holmes A., Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs* 2002;1(4):273–88. doi: 10.1016/S1474-51510200038-5.
2. Пантелеев М.А., Васильев С.А., Синауридзе Е.И. и др. Практическая коагулология. М.: Практическая медицина, 2011. 192 с. [Panteleev M.A., Vasilyev S.A., Sinauridze E.I. et al. Practical coagulology. M.: Prakticheskaya meditsina, 2011. 192 p. (In Russ.)].
3. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека. Т. 2. М.: Мир, 2005. 314 с. [Shmidt R., Tevs G. Human physiology. Vol. 2. M.: Mir, 2005. 314 p. (In Russ.)].
4. Lim B.B., Lee E.H., Sotomayor M., Schulten K. Molecular basis of fibrin clot elasticity. *Structure* 2008;16(3):449–59. doi: 10.1016/j.str.2007.12.019.
5. Heemskerk J.W., Mattheij N.J., Cosemans J.M. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost* 2013;11(1):2–16. doi: 10.1111/jth.12045.
6. Zwaal R.F., Schroit A.J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89(4):1121–32. PMID: 9028933.
7. Lawson J.H., Kalafatis M., Stram S., Mann K.G. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem* 1994;269(37): 23357–66. PMID: 8083241.
8. Rosing J., Tans G., Govers-Riemslog J.W., Zwaal R.F., Hemker H.C. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1980;255(1):274–83. PMID: 7350159.
9. Belyaev A.V. Long ligands reinforce biological adhesion under shear flow. *Phys Rev E* 2018;97(4–1):042407. doi: 10.1103/PhysRevE.97.042407.
10. Stalker T.J., Traxler E.A., Wu J. 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.
11. Balandina A.N., Shibeko A.M., Kireev D.A. et al. Positive feedback loops for factor V and factor VII activation supply sensitivity to local surface tissue factor density during blood coagulation. *Biophys J* 2011;101(8):1816–24. doi: 10.1016/j.bpj.2011.08.034.
12. Dashkevich N.M., Ovanesov M.V., Balandina A.N. et al. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave. *Biophys J* 2012;103(10):2233–40. doi: 10.1016/j.bpj.2012.10.011.
13. Ovanesov M.V., Ananyeva N.M., Panteleev M.A., Ataullakhanov F.I., Saenko E.L. Initiation and propagation of coagulation from tissue factor-bearing cell monolayers to plasma: Initiator cells do not regulate spatial growth rate. *J Thromb Haemost* 2005;3(2):321–31. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01128.x.
14. Panteleev M.A., Balandina A.N., Lipets E.N., Ovanesov M.V., Ataullakhanov F.I. Task-oriented modular decomposition of biological networks: trigger mechanism in blood coagulation. *Biophys J* 2010;98(9):1751–61. doi: 10.1016/j.bpj.2010.01.027.
15. Tuktamyshev R., Zhdanov R. The method of *in vivo* evaluation of hemostasis: Spatial thrombodynamics. *Hematology* 2015;20(10):584–6. doi: 10.1179/1607845415Y.0000000022.
16. Ovanesov M.V., Krasotkina J.V., Ul'yanova L.I. et al. Hemophilia A and B are associated with abnormal spatial dynamics of clot growth. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572(1):45–57. PMID: 12204332.
17. Кольцова Е.М., Баландина А.Н., Демина И.А. и др. Использование метода пространственной генерации тромбина для оценки прокоагулянтной активности тромбоцитов после трансфузии тромбоконцентрата у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2016;15(2):32–9. doi: 10.20953/1726-1708-2016-2-32-39. [Kol'tsova E.M., Balandina A.N., Demina I.A. The use of a spatial thrombin generation method for assessment of platelet procoagulant activity after platelet concentrate transfusion in children. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2016;15(2):32–9. (In Russ.)].
18. Munnix I.C., Cosemans J.M., Auger J.M., Heemskerk J.W. Platelet response heterogeneity in thrombus formation. *Thromb Haemost* 2009;102(6):1149–56. doi: 10.1160/TH09-05-0289.
19. Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N. et al. Procoagulant platelets form an α -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.
20. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N. 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.
21. Siljander P.R. Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb Res* 2011;127 Suppl 2:S30–3. doi: 10.1016/S0049-3848(10)70152-3.
22. Lipets E., Vlasova O., Urnova E. 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.
23. Tutwiler V., Peshkova A.D., Andrianova I.A. et al. Contraction of Blood Clots Is Impaired in Acute Ischemic Stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37(2):271–9. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308622.
24. Tutwiler V., Litvinov R.I., Lozhkin A.P. et al. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood. *Blood* 2016;127(1):149–59. doi: 10.1182/blood-2015-05-647560.

Статья поступила в редакцию: 02.05.2018. Принята в печать: 13.06.2018.
Article was received by the editorial staff: 02.05.2018. Accepted for publication: 13.06.2018.