

первого курса полихимиотерапии можно использовать в качестве опережающих маркёров оценки её эффективности при злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей.

2. В качестве дополнительных аналитических факторов развития объективного ответа на проведение лекарственного противоопухолевого лечения можно применять повышение степени эндогенной интоксикации, рост концентрации микроэлементов меди, железа, цинка и лития в плазме крови больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блохин Ю.Д. Фенотип множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, обусловленный нарушением программы клеточной гибели // Вестн. РАМН. — 2004. — №12. — С. 16-20.

2. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, созидание и разрушение // СПб.: Медицинская пресса, 2006. — 400 с.

3. Дубинина Е.И., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порохов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения // Вопр. мед. хим. — 1995. — Т. 41, №1. — С. 24-25.

4. Копытова Т.В., Добротина Н.А., Химкина Л.Н., Ларина Т.Н. Некоторые подходы к лабораторной диагностике эндоинтоксикации при хронических дерматозах // Клини. лаб. диагн. — 2000. — №1. — С. 18-20.

5. Малахова М.Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме // Эффер. терап. — 2000. — Т. 6, №4. — С. 3-14.

6. Орлов Д.С., Носарева О.Л., Коновалова Е.В. и др. Содержание гидроксильного радикала и фракций глутатиона в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови // Соврем. наукоёмкие технол. — 2012. —

№7. — С. 58-59.

7. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Под ред. Н.И. Переводчиковой. 2-е изд., доп. — М.: Практическая медицина, 2005. — 365 с.

8. Apetoh L., Ghiringhelli F., Tesniere A. et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy // Nat. Med. — 2007. — Vol. 13, N 9. — P. 1050-1059.

9. Aschele C., Lonardi S., Monfardini S. Thymidylate synthase expression as a predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in advanced colorectal cancer // Cancer Treat Rev. — 2002. — Vol. 28, N 1. — P. 27-47.

10. Joshi M.B., Shirota Y., Danenberg K.D. et al. High gene expression of TS1, GSTP1, and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer // Clin. Cancer Res. — 2005. — Vol. 11, N 6. — P. 2215-2221.

11. Lake R.A., Robinson B.W.S. Immunotherapy and chemotherapy- a practical partnership // Nature Reviews. Cancer. — 2005. — Vol. 5. — P. 397-405.

12. Libra M., Navolanic P.M., Talamini R. et al. Thymidylate synthetase mRNA levels are increased in liver metastases of colorectal cancer patients resistant to fluoropyrimidine-based chemotherapy // BMC Cancer. — 2004. — Vol. 4, N 1. — P. 11-17.

13. Mir M.M., Dar N.A., Malik M.A. et al. Studies on association between Copper excess, Zinc deficiency and P53 mutations in esophageal squamous cell carcinoma from Kashmir valley, India — a high risk area // Intern. J. of Health Sciences. — Vol. 1, N 1. — 2007. — P. 35-41.

14. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. — Nat. Med. — 2007. — Vol. 13, N 10. — P. 54-61.

15. Richardson D.R., Kalinowski D.S., Lau S. et al. Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumor agents // Biochim. Biophys. Acta. — 2009. — Vol. 1790, N 7. — P. 702-717.

УДК 612.115: 616.147.3-005.6-092: 616.151.5: 616.131-005.755

НО11

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ МАРКЁРОВ ВЕНОЗНОГО ТРОМБОЗА

Ляйли Дияверовна Зубаирова*, Ильшат Ганеевич Мустафин, Роза Мулаяновна Набиуллина

Казанский государственный медицинский университет

Реферат

В настоящем обзоре суммированы результаты экспериментальных и клинических исследований, расшифровывающие механизмы, которые инициируют венозный тромбоз. Сохраняется актуальность рассмотрения патогенеза формирования тромбов в венах в рамках классической триады Вирхова, причём становится более понятным характер взаимодействия отдельных её компонентов — изменения в составе крови, нарушение гемодинамики кровотока и изменения сосудистой стенки. Изменения в составе крови включают количество и функциональное состояние белков и клеток системы гемостаза. Среди изменений кровотока важны скорость тока крови, влияющая на транспортировку клеток и коагуляционных белков к участку и от участка тромбообразования, и локальная гидродинамическая сила, модулирующая адгезивную и прокоагулянтную активность эндотелия и тромбоцитов. Сосудистая стенка обеспечивает тканевый фактор, который является инициатором гемокоагуляции; фосфолипидную поверхность клеточных мембран и микровезикул для сборки ферментных комплексов свёртывающей системы; а также адгезивные белки для «улавливания» из кровотока тромбоцитов и лейкоцитов.

Нарушение венозного оттока крови, вызывая локальную гипоксию, сопровождается прокоагулянтной перестройкой клеток: на эндотелии экспрессируется Рселектин, способствующий аккумуляции лейкоцитов и клеточных микровезикул, содержащих инициатор свёртывания крови — тканевой фактор. Повышается локальная концентрация прокоагу-

Адрес для переписки: zubairovalaily@gmail.com

лянтов, что наряду с нарушением антикоагулянтной активности инициирует прогрессирующее фибринообразование и тромбоз. Вычленение ключевых звеньев патогенеза позволяет использовать их в качестве потенциальных маркёров риска венозного тромбоза. В их числе в последние годы при тромбозе глубоких вен, тромбозе лёгочной артерии, тромбозах, сопровождающих опухолевый рост, исследуют клеточные микровезикулы, цитокины, P-селектин.

Ключевые слова: венозный тромбоз, стаз, P-селектин, тканевой фактор, микровезикулы.

PATHOGENETIC APPROACH TO VEIN THROMBOSIS MARKERS EXAMINATION L.D. Zubairova, I.G. Mustafin, R.M. Nabiullina. Kazan State Medical University, Kazan, Russia. The review summarizes experimental and clinical findings decrypting the mechanisms that initiate venous thrombosis. It is still relevant to consider the pathogenesis of venous thrombosis within the frames of the classic Virchow's triad, and the mechanisms of interrelation of its separate mechanisms — changes in blood composition, blood flow, or alterations of the blood vessel wall — becomes more clear. Changes in the blood constituents include the amount and functional state of proteins and hemostasis system cells. Among the important changes in blood flow are blood flow rate, affecting the cells and coagulation proteins transport to the site and from the site of thrombosis, and the local shear stress, modulating adhesion and procoagulant activity of endothelium and platelets. Vascular wall provides tissue factor, which is the initiator of blood coagulation; phospholipid surface of cell membranes and microvesicles for assembling coagulation enzyme complexes, as well as adhesion proteins for the blood platelets and leukocytes «capturing». Decreased venous blood outflow and stasis, causing the local hypoxia, are associated with procoagulant changes in blood cells: the expression of P-selectin on endothelium increases, leading to the accumulation of leukocytes and cell microvesicles containing the initiator of blood coagulation — tissue factor. The local concentration of activated clotting factors increases, which along with anticoagulant activity alterations initiates progressing fibrin formation and thrombogenesis. Marking out the key mechanisms allows using them as the potential markers for diagnosing venous thrombosis risk. Among them are cell derived microparticles, cytokines, P-selectin that are investigated as possible indicators of deep vein, pulmonary, cancer associated thrombosis. **Keywords:** venous thrombosis, stasis, P-selectin, tissue factor, microparticles.

Среди сосудистых катастроф третье место после инфаркта миокарда и инсультов занимает венозный тромбоз, объединяющий две связанных патологии: тромбоз глубоких вен (ТГВ) и тромбоз лёгочной артерии (ТЭЛА). Частота ТГВ составляет 160 на 100 000 населения в год, фатальная ТЭЛА встречается в соотношении 60 на 100 000 населения в год [1, 42]. В тех случаях, когда удаётся избежать летального исхода, последствием могут быть рецидивирующий тромбоз, посттромботический синдром или кровотечение на фоне антикоагулянтной терапии.

Диагностика тромботических осложнений только на основании клинических проявлений не всегда бывает точной, поскольку жалобы пациентов непатогномичны, а объективные методы — контрастная венография, ультразвуковая доплерография — ограниченно доступны, а также высока частота отрицательных результатов. Установлено, что в 4 случаях из 5 ТГВ протекает бессимптомно, 50% больных с проксимальным ТГВ переносят бессимптомную ТЭЛА, а у 80% больных с ТЭЛА обнаруживают бессимптомный ТГВ.

Продолжается разработка методов диагностики тромботических осложнений, основанных на оценке состояния системы гемостаза, однако доступного молекулярного маркёра, который бы позволял достоверно подтвердить диагноз, в настоящее время нет. Большинство скрининговых лабораторных тестов (активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, тромбиновое время) прежде всего направлено на выявление гипокоагуляции, поскольку их проводят в условиях максимальной искусственной активации свёртывания крови *in vitro*, поэтому они малочувствительны к гиперкоагуляционным сдвигам. Наиболее чувствительным параметром в лабораторной диагностике тромбозов обычно называют уровень Д-димера в

крови, который, впрочем, позволяет исключить диагноз, но не специфически подтвердить его. В стремлении выявить плазменный биомаркёр венозного тромбоза и предтромботического состояния ведут исследования селективных, цитокинов, а также микровезикул (Мв) крови [5].

Венозный тромбоз и триада Вирхова

Венозный тромбоз представляет собой многофакторный патологический процесс, который может быть обусловлен генетическими (такими, как дефицит антикоагулянтов, мутация фактора V — Лейденская мутация; мутация гена прогормбина G20210A, мутация гена ингибитора активатора плазминогена 675 5G/4G), а также приобретёнными (например, образование антифосфолипидных антител, метаболический синдром, возраст) факторами. В качестве триггеров тромбоза могут выступать беременность, иммобилизация, хирургические вмешательства, травмы [36].

В основе патогенеза венозного тромбоза лежит взаимодействие элементов классической триады Вирхова: изменения в составе крови, нарушение гемодинамики кровотока и изменения сосудистой стенки. Последовательная расшифровка клеточно-молекулярных механизмов этих изменений, предрасполагающих к формированию венозных тромбов, позволяет расставлять новые патогенетические акценты. Наиболее доступный для изучения компонент триады — изменения в составе крови, то есть количество и функциональное состояние белков и клеток системы гемостаза. Среди характеристик второго компонента — изменений кровотока — важны «скорость сдвига», то есть скорость тока крови, влияющая на транспортировку клеток и коагуляционных белков к участку и от участка тромбообразования, и «сила сдвига», то есть локальная гидродинамическая сила, модулирующая

адгезивную и прокоагулянтную активность эндотелия, тромбоцитов и других компонентов крови. Третий компонент триады — сосудистая стенка — связан с несколькими элементами, такими как тканевой фактор (ТФ), который является инициатором гемокоагуляции; фосфолипидная поверхность клеточных мембран и Мв для сборки ферментных комплексов свёртывающей системы; а также адгезивные белки для «улавливания» из кровотока тромбоцитов и лейкоцитов. В условиях *in vivo* ни один из компонентов триады не может самостоятельно вызвать тромбоз, все они функционируют в комплексе [43]. Однако, если роль первых двух механизмов — гиперкоагулемии и замедления кровотока — традиционно считают основной в патогенезе венозного тромбоза, то вклад сосудистой стенки, повреждение которой становится доминирующим при инициации артериального тромбоза, не вполне ясен применительно к венозному тромбозу. Между тем, эндотелий сосуда является важной частью «вирховской триады», находясь под воздействием тока крови в постоянном взаимодействии с циркулирующими про- и антикоагулянтами, а также клетками крови.

В физиологических условиях сосудистая стенка не стимулирует свёртывание крови, поскольку на поверхности эндотелия содержатся белки с антикоагулянтными свойствами [тромбомодулин, эндотелиальный рецептор протеина С, ингибитор пути ТФ (ИПТФ)], кофакторы антитромбина III (АТ III)]. Более того, интактный эндотелий предупреждает и ограничивает возможное отложение фибрина благодаря секреции ТФ и урокиназного активатора плазминогена, наличию рецепторов к плазминогену и его тканевому активатору. В то же время структурные (повреждение) или функциональные (гипоксия) изменения эндотелия нарушают баланс в сторону гиперкоагуляционного микроокружения за счёт снижения синтеза антикоагулянтов и повышения экспрессии ТФ [6].

ТФ — первичный инициатор свёртывания крови. [24]. Это трансмембранный гликопротеин, который при контакте с фактором VII крови и формировании комплекса ТФ-VIIa повышает каталитическую активность фактора VIIa более чем в миллион раз [21]. При активации комплексом ТФ-VIIa факторов X и IX в итоге образуются тромбин и фибрин. ТФ при физиологических условиях не экспрессируется клетками, находящимися в контакте с кровью, он присутствует на перикариотических и адвентициальных фибробластах, эпителиальных клетках, выстилающих органы снаружи и полости внутри, а также в разной степени синтезируется паренхиматозными клетками [13, 16]. Среди клеток, контактирующих с кровью, больше всего синтезируют ТФ стимулированные моноциты. Эндотелиальные клетки, так же как моноциты, могут экспрессировать ТФ, но только после активации. Возможность экспрессии ТФ тромбоцитами дискутируется и остаётся предметом изучения [29, 32].

Один из признанных факторов риска венозного тромбоза — нарушение баланса про- и антикоагулянтов. Образование тромбина, необходимого для превращения фибриногена в фибрин, контролируется антикоагулянтами, ограничивающими массивное образование этого ключевого фермента. Необходимо иметь в виду, что для эффективного функционирования противосвёртывающей системы нужно взаимодействие плазменных циркулирующих компонентов и компонентов сосудистой стенки, причём антикоагулянтный фенотип эндотелия различен в разных органах.

В начальном периоде активации свёртывания крови тромбин образуется с относительно низкой скоростью, затем скорость тромбообразования резко возрастает. Соответственно выделяют фазы инициации и распространения коагуляции, которые обеспечиваются разными факторами и регулируются разными ингибиторами.

Фаза инициации обеспечивается комплексом ТФ-VIIa на мембранах повреждённых или активированных клеток и протромбиназным комплексом Ха-Va, а её основным регулятором служит ИПТФ, который при участии фактора X связывает комплекс ТФ-VIIa. ИПТФ экспрессируется на эндотелиальных клетках, мегакариоцитах, моноцитах, лёгочных фибробластах, синовиальных клетках, а также тромбоцитах, активированных на участке повреждения сосуда [20]. В эксперименте на мышцах показано, что роль ИПТФ не ограничивается регуляцией образования тромбина в плазме крови, а распространяется и на динамику тромбообразования. При использовании тромбоцитов, дефицитных по ИПТФ, инициальная аккумуляция этих клеток на участке повреждения венозного или артериального сосуда более продолжительна, поэтому образуются тромбы больших размеров. Поскольку в распространении тромба участвует также PAR4 (активируемый протеазами рецептор 4), авторы предполагают, что ТФ, включающийся в растущий тромб, иницирует персистирующее образование тромбина, который в свою очередь обеспечивает дополнительную активацию тромбоцитов. При дефиците тромбоцитарного ИПТФ ограничение тромбообразования нарушено, и рост тромба продолжается [25].

Фаза распространения коагуляции обеспечивается теназным VIIIa-IXa и протромбиназным Ха-Va комплексами, формирующимся на поверхности активированных клеток, в первую очередь тромбоцитов и клеточных Мв, а её основными регуляторами являются АТ III и протеин С [39]. Когда тромбин вымывается потоком крови из места образования и контактирует с неповреждённым эндотелием, он нейтрализуется АТ III, связанным с гликопротеинами стенки сосуда, которые имеют гепариноподобные структуры, поскольку инактивация тромбина под влиянием АТ III значительно возрастает в комплексе с гепарином или гликозаминоглика-

нами гепаран-сульфатом, дерматан-сульфатом, высокое содержание которых отмечают, например, в лёгких. При снижении содержания АТ III до уровня 30–50% и менее резко возрастает риск тромбозов и тромбоэмболии. Гепарин (кофактор АТ III) при отсутствии или дефиците АТ III не оказывает антикоагулянтного действия [2].

Система протеина С включает эндотелиальный рецептор протеина С, тромбомодулин, протеин С, его кофактор протеин S, тромбин [37]. Протеин С – зимоген, для его активации необходимо связывание с двумя рецепторами: эндотелиальным рецептором протеина С и тромбомодулин-тромбиновым комплексом. Конечное действие системы протеина С направлено преимущественно на ингибирование факторов Va и VIIIa, а также инактивацию ингибитора тканевого активатора плазминогена. Если вымываемый из места повреждения тромбин не инактивирован АТ III, то он может связаться с тромбомодулином и активировать протеин С, который расщепляет факторы Va и VIIIa. Таким образом, ИПТФ, АТ III и протеин С обеспечивают порог, только после преодоления которого может начаться массивное образование тромбина.

Нарушение оттока крови в патогенезе венозного тромбоза

Если ядро артериальных тромбов составляют активированные тромбоциты, которые являются клеточным элементом, первично взаимодействующим со стенкой сосуда, то венозные тромбы прикреплены к сосуду волокнами фибрина, которые в свою очередь вторично вовлекают тромбоциты, а также лейкоциты и эритроциты [38], то есть фибринообразование предшествует агрегации тромбоцитов. Эта ситуация ещё в 70-е годы прошлого века морфология «спонтанных» венозных тромбов оставляла без ответа вопрос о том, почему антикоагулянтная поверхность эндотелия оказывается фокусом формирования сгустка. Сегодня можно констатировать, что условиями активации и, как следствие, прокоагулянтной перестройки сосудистой выстилки являются стаз и провоспалительный стресс, которые, вызывая локальную гипоксию, сопровождаются трансформацией фенотипа эндотелиоцитов. Общеизвестный факт излюбленной инициации венозных тромбов в клапанных пространствах вен логично вытекает из особенностей естественной функции этих отделов сосудистого русла. Данные участки, способствующие возврату крови в правое предсердие за счёт предотвращения обратного тока крови под влиянием силы тяжести, постоянно испытывают периоды задержки оттока крови. В качестве защиты эндотелия от таких ситуаций выступает повышенная локальная экспрессия антикоагулянтов. В работе E.G. Brooks и соавт. проведено сравнительное исследование эндотелия клапанных пространств и на протяжении просвета вен вблизи клапанов. Обнаружена более высокая тромборезистентность в

виде повышенной экспрессии тромбомодулина и эндотелиального рецептора протеина С на эндотелии за венозными клапанами в сочетании с пониженной экспрессией фактора фон Виллебранда в этих областях [8].

Кроме того, обычно поток крови смывает из клапанных карманов прокоагулянты, которые инактивируются в микрососудах лёгких, имеющих большую площадь поверхности, покрытой гепаран-сульфатом и экспрессирующей тромбомодулин и ИПТФ. Именно в микрососудах лёгких обнаружены фенотипические отличия эндотелия, заключающиеся в более высоком содержании матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) тромбомодулина и ИПТФ [3]. Однако если периоды стаза оказываются более продолжительными, то эндотелий уже не в состоянии предотвращать коагуляцию. При этих обстоятельствах формируются два взаимодополняющих механизма, инициирующие тромбообразование: локальная гипоксия и накопление прокоагулянтов.

Стаз быстро приводит к десатурации гемоглобина, причём кислородное голодание испытывает не только внутренняя выстилка сосуда, но и скапливающиеся в клапанном пространстве клетки крови, в первую очередь лейкоциты и тромбоциты [18]. Локальная гипоксия вызывает прокоагулянтную перестройку клеток: в моноцитах начинает экспрессироваться инициатор свёртывания крови – ТФ, на эндотелиоцитах экспрессируются ТФ, адгезивные белки, такие как Р-селектин и молекулы адгезии сосудистого эндотелия I-го типа, и снижается экспрессия тромбомодулина. Оба типа клеток в условиях гипоксии склонны к отторжению от наружной мембраны субклеточных элементов – Мв [22, 28]. Индукция микровезикуляции эндотелиоцитов выявлена *in vivo* при гипоксии и сопровождающемся её оксидативным стрессом, образующиеся Мв обогащены адгезивными молекулами [41]. Поскольку отделяющиеся Мв содержат липидные и белковые компоненты родительской клетки, они оказываются обогащены ТФ, Р-селектиновым лигандом (PSGL-1), а также анионными фосфолипидами, являющимися критическим компонентом для формирования теназного и протромбиназного комплексов, необходимых для образования тромбина и фибрина.

Таким образом, при стазе крови прокоагулянты (ТФ, тромбин и др.) накапливаются в клапанных карманах, формируются участки адгезии для тромбоцитов, лейкоцитов, Мв, несущих на поверхности PSGL-1 [23]. В экспериментах на крысах было продемонстрировано, что отложение фибрина и образование микротромбов начинаются в лигированной вене уже через 15 мин, в то же время обнаруживают ТФ на эндотелиальных клетках и лейкоцитах. Поскольку ТФ относится к числу продуктов ранних генов, не требующих синтеза белка, следует предполагать, что инициатор фибринообразования предсуществует в этих клетках, а застой крови

вызывает его экспрессию на стенке сосуда и лейкоцитах. Кроме того, в условиях кислородного голодания эндотелиальные клетки через 30 мин начинают экспрессировать Р-селектин, а в течение 60 мин в лигированной вене происходит адгезия лейкоцитов с участием Р-селектина [11, 45]. Изложенная последовательность событий является основанием для более пристального внимания к отдельным элементам, участвующим в формировании тромбов в венах.

Роль Р-селектина в венозном тромбозе

Р-селектин — адгезивный трансмембранный гликопротеин, переносимый на клеточную поверхность из α -гранул тромбоцитов и телец Вейбеля-Паладе эндотелиоцитов в ходе активации этих клеток, при этом частично белок высвобождается в плазму крови, где циркулирует в растворимой форме (sP-селектин) [7, 15, 40]. Хорошо известна роль селектина в воспалении, где он ответствен за «роллинг», то есть «перекатывание» лейкоцитов по стенке сосуда, замедляющее их движение и подготавливающее к прочной адгезии через интегриновые рецепторы.

Вместе с тем за последние десятилетия получено немало свидетельств участия Р-селектина в гемостатических реакциях. В 1992 г. впервые на экспериментальной модели было обнаружено, что блокада Р-селектина антителами сопровождается не только нарушением адгезии лейкоцитов, но и ингибирует отложение фибрина в формирующемся тромбе [31]. В ходе дальнейшей расшифровки механизмов, вовлекающих этот белок в гемостатические реакции, было показано, что Р-селектин вызывает появление мРНК и антигена ТФ на моноцитах и участвует в переносе моноцитарного ТФ на тромбоциты [10, 35]. Кроме того, Р-селектин усиливает тромбинообразование на поверхности моноцитов, вызывая повышение экспонирования этими клетками фосфатидилсерина [12]. Связывание Р-селектина со специфическим лигандом PSGL-1 обеспечивает взаимодействие между лейкоцитами и эндотелиальными клетками, между лейкоцитами, лейкоцитами и тромбоцитами, тромбоцитами и эндотелием, таким образом вовлекая клетки в формирующийся тромб. Следует отметить, что индуцированные Р-селектином прокоагулянтные перестройки клеток требуют времени, что делает его участником тромбоза в условиях патологии, особенно при наличии персистирующих провоспалительных стрессоров.

Доказательством участия Р-селектина в венозном тромбозе являются экспериментальные работы, демонстрирующие антитромботический эффект ингибиторов взаимодействия этого адгезивного белка с его лигандом [27], а также образование тромбов меньшей массы у генетически модифицированных мышей, дефицитных по Р-селектину [26]. Уровень sP-селектина отмечен среди релевантных маркеров объективно подтверждённого ТГВ наряду с уровнем Д-димера и

С-реактивного белка [34]. Концентрация в крови этого белка, видимо, может служить показателем персистирующего гиперкоагуляционного состояния, поскольку у пациентов после острого ТГВ отмена антикоагулянтов через 6 мес сопровождалась повторным повышением уровня Р-селектина в крови по сравнению с нормальным уровнем у тех пациентов, которые получали антикоагулянты в течение 12 мес [17]. Функционирование Р-селектина взаимосвязано с клеточными Мв, которые, с одной стороны, содержат лиганд этого адгезивного белка, а с другой — дополнительные прокоагулянтные компоненты.

Клеточные микровезикулы в венозном тромбозе

Мв представляют собой небольшие пузырьки размером менее 1 мкм, которые отделяются от клеток и могут быть обнаружены в жидких средах организма, в первую очередь в крови. Они состоят из участка плазматической мембраны, окружающей небольшое количество цитозоля, обогащены анионными фосфолипидами, представляющими каталитическую поверхность для формирования теназного и протромбиназного комплексов, а также содержат интегральные мембранные белки, в том числе ТФ. Инициаторами везикуляции клеток являются активация и/или апоптоз, высокое напряжение сдвига крови, цитокины, окислительное повреждение.

Поскольку при стимуляции эндотелиальные клетки, моноциты и, возможно, тромбоциты способны экспрессировать ТФ, его обнаруживают также на Мв, количество которых возрастает при активации этих клеток. Моноциты экспрессируют мРНК ТФ и антиген ТФ при активации различными агентами — интерлейкином-1, фактором некроза опухоли альфа; важнейшим из активаторов является липополисахарид эндотоксина. В экспериментах продемонстрирована прямая корреляция прокоагулянтной реактивности моноцитов и уровня микровезикуляции *in vitro*. В частности, выявлен феномен высокой и низкой реакции моноцитов при липополисахарид-индуцированной экспрессии ТФ. Высокая реактивность характеризуется более высоким уровнем ТФ положительных Мв (ТФ+Мв) и большей экспрессией поверхностного ТФ на моноцитах, в то же время низкая реактивность — более высокой внутриклеточной аккумуляцией ТФ [14].

В настоящее время исследуют роль Мв-Мв и Мв-клеточных взаимодействий, связываемых с сосудистым и тромботическими заболеваниями. Предполагают, что передача ТФ моноцитов тромбоцитам происходит через Мв и зависит от Р-селектина. Флуоресцентно меченые Мв, происходящие из линии клеток, подобных моноцитам, были введены мышам. Во время тромбообразования у дикой линии мышей Мв аккумулировались в тромбах, в то же время не было их накопления у мышей, лишённых Р-селектина. Эти результаты согласуются с моде-

лю, в которой циркулирующие Мв, экспрессирующие ТФ и PSGL-1, аккумулируются в развивающемся тромбе посредством взаимодействия Р-селектина с PSGL-1. Такая доставка и сосредоточение ТФ в тромбе ведут к достижению критической концентрации, которая инициирует свёртывание крови [30]. Мв, образованные после стимуляции эндотелиальных клеток фактором некроза опухоли альфа, дозозависимо сокращают время свёртывания в отличие от Мв от нестимулированных эндотелиальных клеток. При использовании плазмы, дефицитной по фактору VII, прокоагулянтный эффект Мв незначителен, а это свидетельствует о том, что активность Мв опосредована путём ТФ. При моделировании тромбоза у мышей с помощью лигирования вены выявлена прямая корреляция между массой тромбов и уровнем клеточных Мв, содержащих ТФ. Причём распространение тромбоза сопровождалось повышением в крови количества Мв тромбоцитарного происхождения, а Мв лейкоцитарного происхождения преимущественно включались в состав тромба и при этом потреблялись [33].

Клинические наблюдения, подтверждающие участие Мв в формировании венозных тромбов, постоянно расширяются. Продемонстрировано повышение уровня Мв в венозной крови больных с впервые диагностированной венозной тромбоземболией [9]. Содержащие ТФ Мв обнаружены в плазме пациентов, перенёсших ТГВ, причём Мв моноцитарного происхождения выявлены как после единичного тромбоза, так и после рецидивирующего. В то же время у пациентов с рецидивирующим ТГВ выявлен значительно более высокий уровень Мв тромбоцитарного и эндотелиального происхождения [44].

Нет определённого взгляда на то, в какой степени Мв могут быть инициаторами или факторами прогрессирования тромбоза. Повышение количества прокоагулянтных тромбоцитарных Мв выявлено у пациентов с острой ТЭЛА, однако оно не отличалось от пациентов без ТЭЛА, но с наличием сердечно-сосудистых факторов риска тромбоза. Другими словами, микровезикуляция, вызванная воздействием на клетки протромботических факторов риска, может быть посредником доставки прокоагулянтного материала в участок формирования тромба уже после его инициации [4].

Компонентом протромботического состояния у онкологических больных, которое часто осложняется венозными тромбозами, также являются Мв. Возрастает общее количество эндотелиальных и тромбоцитарных Мв, содержание на них ТФ, причём более выраженное у пациентов с клинически подтверждённым тромбозом. Риск венозного тромбоземболизма возрастает с прогрессированием и ростом опухоли. Наиболее высокий уровень Мв, содержащих ТФ, в сочетании с высоким риском тромбоза выявлен при карциноме поджелудочной железы [46]. Попытки выявить корреляцию уровня микровезику-

ляции с традиционными маркерами тромбоза у онкологических больных противоречивы, уровень ТФ+М, согласно отдельным работам, коррелирует, а согласно другим – слабо коррелирует с уровнем Д-димера [19].

Таким образом, даже в отсутствие других факторов риска замедление оттока крови по венам способно, вызывая локальную гипоксию и перестройку клеточного фенотипа, самостоятельно инициировать тромбоз. В случае же присоединения других прокоагулянтных по своей природе стрессоров вероятность тромбообразования повышается. Изучение механизмов, вовлечённых в инициацию венозного тромбоза, имеет большое практическое значение для обоснования правильной тактики антикоагулянтной терапии. Причём, поскольку, по данным разных авторов, у трети пациентов риск рецидивирующего тромбоза сохраняется на протяжении 3–8 лет, рациональное ведение больного может включать как краткосрочный, так и неопределённо продолжительный курс антикоагулянтов. Индивидуальный подход к терапии может быть основан на комбинированном использовании инструментальных методов и ранних плазменных индикаторов, выявляющих склонность пациента к тромботическим осложнениям. К их числу в ближайшие годы могут быть отнесены селектины, клеточные Мв и другие биомаркеры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баешко А.А., Крючок А.Г., Корсак С.И., Юшкевич В.А. Клинико-патологоанатомический анализ послеоперационной ТЭЛА // *Арх. патол.* – 2001. – Т. 63, №1. – С. 23–27.
2. Кондашевская М.В. Современные представления о роли гепарина в гемостазе и регуляции ферментативной и гормональной активности // *Вестн. РАМН.* – 2010. – №7. – С. 35–43.
3. Bajaj M.S., Kuppuswamy M.N., Manepalli A.N. et al. Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues // *Thromb. Haemost.* – 1999. – Vol. 82, N 3. – P. 1047–1052.
4. Bal L., Ederhy S., Di Angelantonio E. et al. Circulating procoagulant microparticles in acute pulmonary embolism: a case-control study // *Int. J. Cardiol.* – 2010. – Vol. 145, N 2. – P. 321–322.
5. Barnes D.M., Wakefield T.W., Rechtenwald J.E. Novel biomarkers associated with deep venous thrombosis // *A Comprehensive Rev. Biomark Insights.* – 2008. – Vol. 3. – P. 93–100.
6. Becker B.F., Heindl B., Kupatt C., Zahler S. Endothelial function and hemostasis // *Z. Kardiol.* – 2000. – Vol. 89, N 3. – P. 160–167.
7. Bonfanti R., Furie B.C., Furie B., Wagner D.D. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells // *Blood.* – 1989. – Vol. 73. – P. 1109–1112.
8. Brooks E.G., Trotman W., Wadsworth M.P. et al. Valves of the deep venous system: an overlooked risk factor // *Blood.* – 2009. – Vol. 114, N 6. – P. 1276–1279.
9. Bucciarelli P., Martinelli I., Artoni A. et al. Circulating microparticles and risk of venous thromboembolism // *Thromb. Res.* – 2012. – Vol. 129, N 5. – P. 591–597.
10. Celi A., Pellegrini G., Lorenzet R. et al. P-selectin

induces the expression of tissue factor on monocytes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 8767-8771.

11. *Closse C., Seigneur M., Renard M. et al.* Influence of hypoxia and hypoxia reoxygenation on endothelial Pselectin expression // *Thromb. Res.* — 1997. — Vol. 85. — P. 159-164.

12. *Del Conde I., Nabi F., Tonda R. et al.* Effect of Pselectin on phosphatidylserine exposure and surface-dependent thrombin generation on monocytes // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. — Vol. 25. — P. 1065-1070.

13. *Drake T.A., Morrissey J.H., Edgington T.S.* Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis // *Am. J. Pathol.* — 1989. — Vol. 134, N 5. — P. 1087-1097.

14. *Egorina E.M., Sovershaev M.A., Bjorkoy G. et al.* Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor, application to intersubject variability // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. — Vol. 25, N 7. — P. 1493-1498.

15. *Fijnheer R., Frijns C.J., Korteweg J. et al.* The origin of Pselectin as a circulating plasma protein // *Thromb. Haemost.* — 1997. — Vol. 77. — P. 1081-1085.

16. *Fleck R.A., Rao L.V., Rapaport S.I., Varki N.* Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal antihuman tissue factor antibody // *Thromb. Res.* — 1990. — Vol. 59, N 2. — P. 421-437.

17. *Gremmel T., Ay C., Seidinger D. et al.* Soluble p-selectin, D-dimer, and high-sensitivity C-reactive protein after acute deep vein thrombosis of the lower limb // *Vasc. Surg.* — 2011. — Vol. 54. — P. 48-55.

18. *Hamer J.D., Malone P.C., Silver I.A.* The pO₂ in venous valve pockets: its possible bearing on thrombogenesis // *Br. J. Surg.* — 1981. — Vol. 68, N 3. — P. 166-170.

19. *Hron G., Kollars M., Weber H. et al.* Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer // *Thromb. Haemost.* — 2007. — Vol. 97, N 1. — P. 119-123.

20. *Kasthuri R.S., Glover S.L., Boles J., Mackman N.* Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor as key regulators of global hemostasis: measurement of their levels in coagulation assays // *Semin. Thromb. Hemost.* — 2010. — Vol. 36, N 7. — P. 64-71.

21. *Komiyama Y., Pedersen A.H., Kisiel W.* Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor // *Biochemistry.* — 1990. — Vol. 29, N 40. — P. 9418-9425.

22. *Lawson C.A., Yan S.D., Yan S.F. et al.* Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation // *J. Clin. Invest.* — 1997. — Vol. 99, N 7. — P. 1729-1738.

23. *Lopez J.A., Chen J.* Pathophysiology of venous thrombosis // *Thromb. Res.* — 2009. — Vol. 123. — P. 30-34.

24. *Mackman N., Tilley R.E., Key N.S.* Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2007. — Vol. 27, N 8. — P. 1687-1693.

25. *Maroney S.A., Cooley B.C., Ferrel J.P. et al.* Murine hematopoietic cell tissue factor pathway inhibitor limits thrombus growth // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2011. — Vol. 31, N 4. — P. 821-826.

26. *Myers D.D.Jr., Farris D., Hawley A. et al.* Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis // *J. Surg. Res.* — 2002. — Vol. 108. — P. 212-221.

27. *Myers D.D.Jr., Rectenwald J.E., Bedard P.W. et al.* Decreased venous thrombosis with an oral inhibitor of P selectin // *J. Vasc. Surg.* — 2005. — Vol. 42. — P. 329-336.

28. *Ogawa S., Gerlach H., Esposito C.A. et al.* Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium // *J. Clin. Invest.* — 1990. — Vol. 85. —

P. 1090-1098.

29. *Osterud B.* The high responder phenomenon: enhancement of LPS induced tissue factor activity in monocytes by platelets and granulocytes // *Platelets.* — 1995. — Vol. 6. — P. 119-125.

30. *Osterud B.* The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor // *Semin. Hematol.* — 2001. — Vol. 38. — P. 2-5.

31. *Palabrica T., Lobb R., Furie B.C. et al.* Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by Pselectin on adherent platelets // *Nature.* — 1992. — Vol. 359. — P. 848-851.

32. *Parry G.C., Mackman N.* Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1995. — Vol. 15, N 5. — P. 612-621.

33. *Ramacciotti E., Hawley A.E., Farris D.M. et al.* Leukocyte- and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis // *Thromb. Haemost.* — 2009. — Vol. 101, N 4. — P. 748-754.

34. *Ramacciotti E., Blackburn S., Hawley A.E. et al.* Evaluation of soluble Pselectin as a marker for the diagnosis of deep venous thrombosis // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* — 2011. — Vol. 17, N 4. — P. 425-431.

35. *Rauch U., Bonderman D., Bohrmann B. et al.* Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor // *Blood.* — 2000. — Vol. 96. — P. 170-175.

36. *Rosendaal F.R.* Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior // *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* — 2005. — Vol. 1. — P. 1-12.

37. *Rosing J., Hoekema L., Nicolae G.A.F. et al.* Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor Va R506Q by activating protein C // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270. — P. 27852-27858.

38. *Sevitt S.* The structure and growth of valve-pocket thromb in femoral veins // *J. Clin. Pathol.* — 1974. — Vol. 27. — P. 517-528.

39. *Smith S.A.* The cell-based model of coagulation // *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* — 2009. — Vol. 19, N 1. — P. 3-10.

40. *Stenberg P.E., McEver R.P., Shuman M.A. et al.* A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation // *J. Cell Biol.* — 1985. — Vol. 101. — P. 880-886.

41. *Vince R.V., Chrismas B., Midgley A.W. et al.* Hypoxia mediated release of endothelial microparticles and increased association of S100A12 with circulating neutrophils // *Oxid. Med. Cell Longev.* — 2009. — Vol. 2, N 1. — P. 2-6.

42. *White R.H.* The epidemiology of venous thromboembolism // *Circulation.* — 2003. — Vol. 107. — P. 14-18.

43. *Wolberg A.S., Aleman M.M., Leiderman K., Machlus K.R.* Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited // *Anesth. Analg.* — 2012. — Vol. 114. — P. 275-285.

44. *Ye R., Ye C., Huang Y. et al.* Circulating tissue factor positive microparticles in patients with acute recurrent deep venous thrombosis // *Thromb. Res.* — 2012. — Vol. 130, N 2. — P. 253-258.

45. *Zhou J., May L., Liao P. et al.* Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2009. — Vol. 29, N 6. — P. 863-869.

46. *Zwicker I., Liebman H.A., Neuberger D. et al.* Furie, and Bruce Furie. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy // *Clin. Cancer Res.* — 2009. — Vol. 15, N 22. — P. 6830-6840.