

## ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ПРОДУКЦИИ И ОБОРОТА ТРОМБОЦИТОВ

©2023 г. В. В. БОДРОВА, О. Н. ШУСТОВА,  
С. Г. ХАСПЕКОВА, А. В. МАЗУРОВ\*

*Национальный медицинский исследовательский центр  
кардиологии им. академика Е.И. Чазова, Министерство  
здравоохранения РФ, Москва*

I. Введение. II. Характеристики циркулирующих тромбоцитов. Ретикулярные формы и показатели размера. III. Тромбопозитин и гликокалицин плазмы крови. IV. Маркеры продукции и оборота тромбоцитов у больных с гематологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями. V. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты или кровяные пластинки – это самые мелкие, безъядерные, форменные элементы крови. Циркулирующие в кровотоке тромбоциты имеют форму дисков с диаметром 2–3 мкм, толщиной около 0,5 мкм и средним объемом 7–10 фемтолитров. Содержание тромбоцитов в периферической крови в норме варьирует в диапазоне 150–400 × 10<sup>9</sup>/л. Тромбоциты наряду со свертывающей системой крови обеспечивают остановку кровотечения (гемостаз) при повреждении сосудов. Тромбоциты необходимы для формирования кровестоабилизирующей (гемостатической) пробки, в первую очередь, при нарушении целостности сосудов артериального русла. При их повреждении, в связи с высокой скоростью кровотока, растворимые в плазме компоненты свертывающей системы без участия

---

*Принятые сокращения:* ГП – гликопротеин; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИТП – иммунная тромбоцитопения; ИФА – иммуноферментный анализ; ОКС – острый коронарный синдром; РТ – ретикулярные тромбоциты; ТПО – тромбопозитин; FSC – forward scattering (прямое рассеивание света), MPV – mean platelet volume (средний объем тромбоцитов); PDW – platelet distribution width (ширина распределения тромбоцитов по объему); P-LCR – platelet large cell ratio (доля/процент крупных тромбоцитов).

\*Адрес для корреспонденции: avmazurov@list.ru

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00005).

тромбоцитов не в состоянии обеспечить полноценной и быстрой остановки кровотечения. Снижение количества тромбоцитов (тромбоцитопении) или нарушение их функциональной активности (тромбоцитопатии) приводят к повышению кровоточивости и развитию геморрагического синдрома [1]. Обратной, патологической стороной защитной гемостатической реакции, является внутрисосудистое тромбообразование («гемостаз в неправильном месте»). Внутреннее повреждение сосуда, которое чаще всего происходит в результате повреждения атеросклеротической бляшки, несмотря на сохранение целостности сосуда и отсутствие кровотечения, воспринимается тромбоцитами и свертывающей системой как сигнал к запуску гемостатических реакций. Внутрисосудистый тромбоз является причиной развития таких патологий, как инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия (острый коронарный синдром, ОКС), ишемический инсульт, тромботические заболевания периферических сосудов [2]. Известно, что повышенная активность тромбоцитов, в том числе и на фоне приема антитромбоцитарных препаратов, является одним из факторов риска развития тромбозов (см. мета-анализы [3, 4]).

Тромбоциты образуются из мегакариоцитов – крупных полиплоидных клеток костного мозга. Продукция тромбоцитов изменяется при уменьшении или увеличении количества мегакариоцитов и их размера и плоидности. После выхода в сосудистое русло, в нормальных условиях тромбоциты циркулируют в кровотоке в течение 7–10 дней и затем разрушаются макрофагами селезенки и печени (см. обзоры [5, 6]). Термин «оборот тромбоцитов» («turnover» в англоязычной литературе) формально определяют, как количество тромбоцитов, проходящих через сосудистое русло за определенный промежуток времени [7]. Очевидно, что оборот тромбоцитов зависит как от скорости продукции, так и от времени циркуляции тромбоцитов в кровотоке, определяемом скоростью их разрушения (выведения из кровотока). Наиболее информативный и прямой метод оценки скорости разрушения тромбоцитов – измерение времени жизни в крови радиоактивно меченных (обычно с помощью  $^{111}\text{In}$ ) тромбоцитов [7–9]. Однако по соображениям безопасности (введение больному радиоизотопной метки) этот метод используется редко и исключительно в исследовательских целях.

В настоящем обзоре рассмотрены лабораторные маркеры, применяемый для оценки продукции и оборота тромбоцитов и их специфические изменения при некоторых гематологических и сердечно-сосудистых патологиях.

## II. ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ТРОМБОЦИТОВ. РЕТИКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ И ПОКАЗАТЕЛИ РАЗМЕРА

### РЕТИКУЛЯРНЫЕ ТРОМБОЦИТЫ

Ретикулярными или незрелыми («immature») называют недавно попавшие в кровь из костного мозга, «молодые» тромбоциты, которые идентифицируют по наличию в них РНК из мегакариоцитов. Тромбоциты не имеют ядра и не синтезируют РНК *de novo*, а остаточная РНК мегакариоцитарного происхождения разрушается в процессе их циркуляции в кровотоке. Поэтому «зрелые» и «старые» тромбоциты РНК не содержат. Название ретикулярные тромбоциты (РТ) возникло по аналогии с ретикулоцитами – молодыми формами безъядерных эритроцитов, также содержащих РНК из клеток предшественников. (см. обзоры [10–12]). Для окраски РТ (как и ретикулоцитов) можно использовать специфичный для нуклеиновых кислот флуоресцентный краситель тиазоловый оранжевый. Впервые такой подход для определения РТ в крови с помощью проточной цитофлуориметрии применили в начале 1990 гг. [13]. Стандартно при проведении анализа в цельной крови тромбоциты сначала выявляют («гейтируют»), используя антитела против специфических маркеров (гликопротеины (ГП) Ib (CD42b) или Ib (CD41)), а затем определяют процент окрашенных тиазоловым оранжевым РТ, сравнивая гистограммы флуоресценции тромбоцитов, обработанных и необработанных красителем (Рис. 1). У здоровых лиц процентное содержание РТ, измеряемых с помощью этого метода в среднем составляет 8–10 %, с достаточно большими внутригрупповыми вариациями – от 2–3% до 15–20 % [10, 13–16]. В современных проточных гематологических анализаторах («Sysmex», «Abbott» и некоторые других производителей) существует протокол автоматического определения РНК содержащих тромбоцитов с использованием других, отличные от тиазолового оранжевого, красителей (полиметин (polymethine), оксазин (oxazine) и некоторые другие) и их параллельным выделением по увеличенному размеру, определяемому по уровню светорассеивания (большинство РТ имеют больший размер, чем не ретикулярные формы – см. ниже) [10–12, 17]. Определяемая таким способом субпопуляция тромбоцитов получила название «незрелых» («immature»). Процент незрелых тромбоцитов, определяемых в этих анализаторах у здоровых лиц несколько ниже, чем процент РТ, определяемых по окраске тиазоловым оранжевым в обычных проточных цитометрах и составляет 2–4% [10–12, 17]. Эти различия обусловлены, как применением разных флуоресцентных красителей, так и особенностями «гейтирования» окрашенных тромбоцитов с учетом только крупных форм при выявлении незрелых тромбоцитов в проточных гематологических анализаторах.

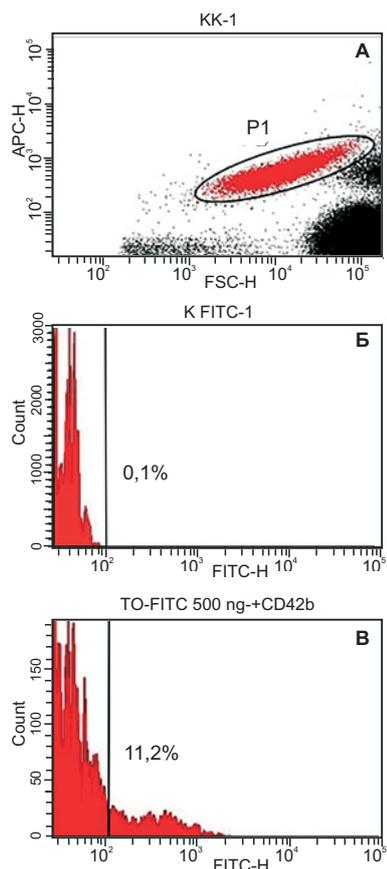


Рис. 1. Определение РТ в крови здорового добровольца по их окраске тиазоловым оранжевым. Проточная цитофлуориметрия.

А – Выделение («гейтирование») области тромбоцитов в соответствии с их размером и окраской тромбоцитарным маркером CD42b-APC (P1, красный цвет). Средний показатель FCS в области тромбоцитов (P1) является показателем, характеризующим размер тромбоцитов.

Б – Контрольный образец без тиазолового оранжевого. Пороговая линия отделяет 99,9% неокрашенных тромбоцитов. Тромбоциты с неспецифической флуоресценцией выше установленного порога – 0,1%.

В – Образец с тиазоловым оранжевым. Показана пороговая линия и процент окрашенных РТ – 11,2%.

Собственные данные [16].

Время жизни РТ, т.е. фактически потери ими РНК, окрашиваемой флуоресцентным красителем, определяли в сложных экспериментах на животных (мышь, собака) с использованием двойного мечения тромбоцитов – *in vivo* однократно с помощью биотина и *in vitro* в последовательно собираемых образцах крови с помощью тиазолового оранжевого [18–20]. Оказалось, что в крови собак, т.е. крупных млекопитающих, при среднем времени жизни тромбоцитов около 6 суток, РТ определялись в течение не более 12–24 часа после попадания в кровотоки из костного мозга [18, 20]. Основываясь на этих экспериментальных данных можно предположить, что у человека, при среднем времени жизни тромбоцитов 7–10 суток, время жизни «молодых» РТ может составлять около 1–2 суток – в течение этого времени они теряют мегакариоцитарную РНК и переходят в субпопуляцию «зрелых», не ретикулярных тромбоцитов.

То, что присутствующие в кровотоке РТ (или незрелые тромбоциты) отражают интенсивность тромбоцитопоэза в костном мозге было неоднократно подтверждено и в клинических исследованиях, которые продемонстрировали, что их содержание снижается у больных с угнетенным мегакариоцитарным ростком костного мозга (гипопродуктивная тромбоцитопения), и повышается у больных с иммунной тромбоцитопенией (ИТП), при которой тромбоциты разрушаются вследствие наличия специфических аутоантител, и для которой характерно компенсаторное увеличение количества мегакариоцитов (см. обзоры [10–12] и более подробно раздел IV).

В исследованиях, проводимых с помощью проточной цитометрии и различных видов микроскопии, было установлено, что РТ имеют больший размер по сравнению с не ретикулярными [15, 16, 21–23] и обладают более высокой функциональной активностью [15, 16, 23–26]. РТ обладают повышенной способностью к агрегации и чаще включаются в состав агрегатов [15, 25, 26]. РТ также содержат больше плотных и альфа-гранул [23], после активации они экспонируют на поверхности больше Р-селектина, маркера мембран альфа-гранул [16, 23, 24] и фосфатидилсерина, отрицательно заряженного липида, участвующего в коагуляционных реакциях тромбоцитов [24]. Таким образом, небольшая минорная субпопуляция РТ представляет собой не только наиболее «молодые», но и наиболее крупные и тромбоцитически активные формы тромбоцитов.

#### ПОКАЗАТЕЛИ РАЗМЕРА ТРОМБОЦИТОВ

Размер тромбоцитов стандартно оценивают при проведении анализа крови в гематологических анализаторах, работающих по так называемому импедансному принципу, т.е. путем измерения электропроводности стандартного раствора при прохождении клеток крови через апертуру (отверстие) малого размера. Изменение сопротивления между двумя электродами, расположенными по разные стороны апертуры, коррелирует с объемом (размером) проходящих через нее частиц, т.е. клеток. Прибор определяет не только концентрацию тромбоцитов, но, анализируя гистограмму распределения тромбоцитов по объему, рассчитывает показатели, характеризующие их размер: средний объем тромбоцитов (MPV, mean platelet volume), доля/процент крупных тромбоцитов (P-LCR, platelet large cell ratio) и ширину распределения тромбоцитов по объему (PDW, platelet distribution width). Последний показатель, PDW, позволяет оценить гетерогенность популяции тромбоцитов по объему (размеру) [27] (Рис. 2). В клинических исследованиях для

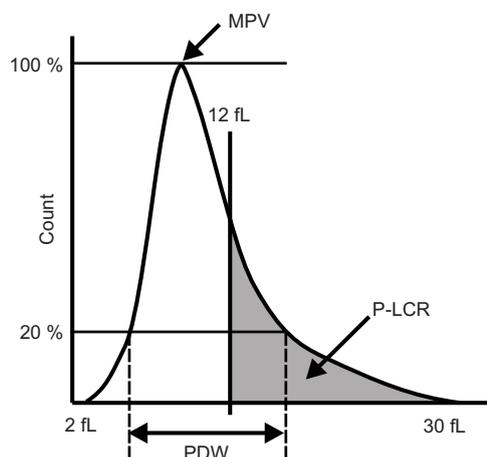


Рис. 2. Схематическая гистограмма распределения тромбоцитов по объему и показатели размера тромбоцитов, определяемые в гематологических анализаторах, работающих по импедансному принципу (см. текст).

По оси ординат – количество тромбоцитов («count»), по оси абсцисс – объем тромбоцитов в фл (fL). Указаны: MPV (mean platelet volume) – средний объем тромбоцитов, определяемый, как максимум гистограммы распределения (относительный счет тромбоцитов – 100%), P-LCR (platelet large cell ratio) – доля/процент крупных тромбоцитов, определяемая, как процент тромбоцитов с объемом выше 12 фемтолитров (закрашено серым цветом), PDW (platelet distribution width) – ширина распределения тромбоцитов по объему, определяемая, как разница по объему тромбоцитов между показателями отсечения для 20% наиболее крупных и наиболее мелких тромбоцитов в фемтолитрах. В современных анализаторах также определяют PDW, как коэффициент вариации гистограммы распределения в процентах (PDW-CD), по формуле  $SD/MPV \times 100\%$ , где SD – стандартное отклонение.

оценки размера тромбоцитов чаще всего используется показатель MPV (см. обзор [28]).

В последние годы в связи с распространением методов анализа тромбоцитов с помощью проточной цитометрии для оценки их размера также используется показатель прямого светорассеивания (FSC, forward scattering) [16, 29]. После выявления («гейтирования») тромбоцитов в цельной крови с помощью флуоресцентно меченных антител против специфических антигенных маркеров тромбоцитов (ГП Ib (CD42b) или ГП IIb (CD41)) определяют средний уровень FSC в популяции тромбоцитов (Рис. 1А). Показатели, определяемые с помощью гематологических анализаторов – MPV и P-LCR хорошо коррелируют с показателем FSC [16, 29] (Таблица 1), что подтверждает корректность использования проточной цитометрии для оценки

Таблица 1. Различные показатели размера тромбоцитов (MPV, P-LCR и FSC), содержание PT и корреляции между ними у здоровых доноров

	MPV, фл (n = 100)	P-LCR, % (n = 89)	FSC, у.е. (n = 101)	PT, % (n = 99)
M ± SD (мин – макс)	8.64 ± 0.97 (6.5 – 10.9)	27.3 ± 7.8 (12.6 – 45.2)	19628 ± 4603 (10810 – 31913)	11.7 ± 4.5 (2.9 – 23.8)
r (MPV)		0.840	0.626	0.477
r (P-LCR)	–		0.813	0.529
r (FSC)	–	–		0.452

MPV и P-LCR измеряли с помощью гематологического анализатора, а FSC и PT с помощью проточной цитометрии. PT выявляли по окраске тиазоловым оранжевыми и выражали в процентах от общего количества тромбоцитов.

У.е. – условные единицы. Представлены средние ± стандартные отклонения (M ± SD) и минимальные и максимальные значения (мин – макс) измеряемых показателей и коэффициенты корреляции (r) между ними. Все корреляции высоко достоверны (p < 0,001). Собственные данные [16].

размера тромбоцитов. Также следует отметить, что показатели размера тромбоцитов умеренно коррелируют с содержанием PT, как у здоровых доноров [15, 16] (Таблица 1), так и у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, получающими антитромбоцитарные препараты [14, 30–33]. Эти данные указывают на то, что повышенная продукция тромбоцитов, регистрируемая по увеличению содержания фракции «молодых» PT, ассоциирована и с увеличением среднего размера тромбоцитов в общей популяции.

Проводимые еще в 1980-е гг. исследования по фракционированию тромбоцитов из крови человека и лабораторных животных (обычно тромбоциты разделяли в градиенте плотности), показали, что фракции (субпопуляции) крупных тромбоцитов функционально более активны. Тромбоциты этих фракций интенсивнее агрегируют, содержат больше внутриклеточных гранул и соответственно секретируют больше биологически активных соединений, и продуцируют большие количества тромбоксана A2 (см. обзор [34]). Впоследствии эти данные были подтверждены при анализе фракций крупных и мелких тромбоцитов с помощью проточной цитометрии [21, 35, 36]. Из этих работ был сделан вывод, что в общей популяции более крупные тромбоциты, включая ретикулярные формы (см. выше) обладают большим тромбогенным потенциалом и соответственно могут и более активно участвовать в развитии тромботических патологий.

### III. ТРОМБОПОЭТИН И ГЛИКОКАЛИЦИН ПЛАЗМЫ КРОВИ

#### СВОБОДНЫЙ ТРОМБОПОЭТИН

Тромбопоэтин (ТПО) является главным медиатором созревания мегакариоцитов из их предшественников в костном мозге и образования тромбоцитов из мегакариоцитов. ТПО синтезируется в печени и при попадании в кровь может связываться на поверхности тромбоцитов со своим рецептором (с-*Mpl*, cellular Myeloproliferative leukemia protooncogen, клеточный протоонкоген миелопролиферативной лейкемии) или присутствовать в плазме в свободной форме. Рецептор ТПО экспрессирован также на поверхности мегакариоцитов и их предшественников и опосредует действие ТПО на эти клетки (см. обзоры [6, 37]). В отсутствие повышенного разрушения тромбоцитов и при адекватном состоянии костного мозга такая система обеспечивает поддержание нормального содержания тромбоцитов в кровотоке. При снижении количества циркулирующих тромбоцитов увеличивается содержание свободного ТПО, который стимулирует тромбоцитопоэз в костном мозге. И наоборот при увеличении количества тромбоцитов снижается содержание его свободной формы в крови и ослабевает воздействие на мегакариоциты и их предшественники. В соответствии с этим физиологическим механизмом концентрация свободного ТПО в плазме крови зависит от общего количества тромбоцитов, находящихся в кровотоке, т.е. их оборота. Стандартно ТПО в плазме крови определяет с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

#### ГЛИКОКАЛИЦИН – РАСТВОРИМЫЙ ФРАГМЕНТ ГЛИКОПРОТЕИНА ІВ

Гликокалицин, крупный внеклеточный фрагмент ГП Ів, попадает в кровь в результате протеолитического отщепления с поверхности тромбоцитов при их разрушении. В связи с этим снижение продукции, оборота и разрушения тромбоцитов ассоциировано с уменьшением, а повышение соответственно с увеличением в плазме крови концентрации гликокалицина [38–40]. Впервые этот подход при обследовании больных с разными формами тромбоцитопении был применен еще в 1980-х гг. Коллером (Coller) и соавт [38]. Этими же авторами было предложено использовать при анализе не только абсолютные показатели содержания гликокалицина в плазме крови, но и так называемый гликокалициновый индекс, т.е. концентрацию гликокалицина, отнесенную к концентрации циркулирующих тромбоцитов [39]. Для расчета этого показателя используются нормализованные значения концентрации тромбоцитов и концентрации гликокалицина, которые у здоровых доноров принимают за 100%.

Гликокалициновый индекс более информативно отражает изменения оборота тромбоцитов, связанные с повышенной скоростью их разрушения, чем просто концентрация гликокалицина в плазме крови (см. также раздел IV). Для определения гликокалицина стандартно используют метод ИФА.

#### **IV. МАРКЕРЫ ПРОДУКЦИИ И ОБОРОТА ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

##### **ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

Изменения маркеров продукции и оборота тромбоцитов наиболее подробно изучены при различных формах тромбоцитопений (снижение концентрации тромбоцитов ниже  $100 \times 10^9/\text{л}$ ). Обычно сравнение проводят между: (1) гипопродуктивной тромбоцитопенией, обусловленной угнетением мегакариоцитарного ростка костного мозга при таких заболеваниях, как апластическая анемия, лейкемия и некоторые другие, или в результате воздействия химиотерапии, и (2) ИТП, при которой снижение числа тромбоцитов в кровотоке является следствием выработки антитромбоцитарных аутоантител и быстрого выведения сенсibilизированных аутоантителами тромбоцитов макрофагами селезенки и печени [41].

Уже в первой, пионерской работе по выявлению РТ по их окраске тиазоловым оранжевым, вышедшей в 1990 г., ее авторы, Кейнаст (Kienast) и Шмитц (Schmitz) [13], показали, что процентное содержание РТ резко повышается при ИТП (в среднем до 20% при норме около 10%), т.е. в условиях повышенного разрушения тромбоцитов в связи с действием аутоантител и компенсаторно увеличенной продукции тромбоцитов в костном мозге. При этом абсолютное количество РТ снижалось, что объясняется высокой скоростью разрушения тромбоцитов, в том числе и ретикулярных форм, приводящей к значимому снижению общего числа тромбоцитов в крови. В то же время у больных с гипопродуктивной тромбоцитопенией процентное содержание РТ существенно не изменялось, хотя их абсолютное количество резко снижалось и несколько более выражено, чем у больных с ИТП. Эти наблюдения были в дальнейшем подтверждены и в других работах, как при анализе РТ, выявляемых по окраске тиазоловым оранжевым с помощью классической проточной цитометрии [42–44] (Таблица 2), так и при использовании гематологических анализаторов, подсчитывающих так называемые незрелые («immature») тромбоциты с помощью других красителей (см. раздел II) [45–47]. Во многих

**Таблица 2. Показатели размера тромбоцитов (MPV и FSC) и содержание PT у здоровых доноров и больных с разными формами тромбоцитопении**

	<b>Здоровые доноры (n = 38)</b>	<b>ИТП (n = 107)</b>	<b>Гипопродуктивная тромбоцитопения (n = 19)</b>
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	200 ± 64	24 ± 20*	31 ± 25* p(ИТП) > 0,05
MPV, фл	7.94 ± 1.00	9.56 ± 1.69*	7.59 ± 0.90 p(ИТП) < 0,001
	<b>Здоровые доноры (n = 72)</b>	<b>ИТП (n = 42)</b>	<b>Гипопродуктивная тромбоцитопения (n = 10)</b>
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	218 ± 50	40 ± 22*	44 ± 18* p(ИТП) > 0,05
FSC, у.е.	20792 ± 4787	38327 ± 13105*	23541 ± 7761 p(ИТП) = 0,006
PT, %	11,9 ± 4,6	17,9 ± 6,8*	10,9 ± 6,1 p(ИТП) = 0,019

MPV измеряли с помощью гематологического анализатора, а FSC и PT с помощью проточной цитометрии. PT выявляли по окраске тиазоловым оранжевыми и выражали в процентах от общего количества тромбоцитов. У.е. – условные единицы. Измерения MPV и измерения FSC и PT проводили в разных исследованиях. Представлены средние ± стандартные отклонения.

\*p < 0.001 – Достоверности отличий от группы здоровых доноров, p(ИТП) – достоверности отличий от группы ИТП. Остальные различия недостоверны.

Собственные опубликованные (MPV) [51] и неопубликованные данные (FSC и PT).

работы у больных с разными формами тромбоцитопении оценивали размер тромбоцитов, проводя измерения MPV и иногда других показателей. Было установлено, что размер тромбоцитов повышается у больных с ИТП и существенно не изменяется у больных с гипопродуктивной тромбоцитопенией [48–52]. (Таблица 2). Таким образом вследствие ускорения продукции и оборота тромбоцитов при ИТП в крови не только возрастает минорная фракция «молодых» PT, обладающих крупным размером, но и увеличивается средний размер тромбоцитов в общей популяции.

На изменение продукции и оборота тромбоцитов при разных формах тромбоцитопении реагируют и плазменные маркеры. При гипопродуктивной тромбоцитопении вследствие снижения продукции и оборота тромбоцитов снижается количество ТПО связанного

Таблица 3. Тромбопоэтин (ТПО) и гликокалицин у здоровых доноров и больных с разными формами тромбоцитопении.

	Здоровые доноры (n = 38)	ИТП (n = 107)	Гипопродуктивная тромбоцитопения (n = 19)
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	200 ± 64 (n = 38)	24 ± 20* (n = 107)	31 ± 25* (n = 19) p(ИТП) > 0.05
ТПО, пг/мл	43 ± 40 (n = 26)	11 ± 27 (n = 53)	958 ± 660* (n = 12) p(ИТП) < 0.001
Гликокалицин, % от контроля <sup>1</sup>	104 ± 29 (n = 38)	120 ± 71 (n = 107)	28 ± 8* (n = 19) p(ИТП) < 0.001

ТПО и гликокалицин измеряли в плазме крови с помощью ИФА. Представлены средние ± стандартные отклонения.

\*p < 0,001 – Достоверности отличий от группы здоровых доноров, p(ИТП) – достоверности отличий от группы ИТП. Остальные различия недостоверны. <sup>1</sup>В качестве контроля при измерении гликокалицина использовали стандартный пул из нескольких плазм здоровых доноров.

Собственные данные [51].

с циркулирующими тромбоцитами и резко увеличивается количество ТПО находящегося в свободной форме в плазме крови. В то же время при ИТП концентрации свободного ТПО обычно не изменяется или несколько снижается [43, 51, 53–57] (Таблица 3). Плазменный гликокалицин значительно снижается при гипопродуктивных тромбоцитопениях, в то время как при ИТП, несмотря на сходный уровень тромбоцитопении, из-за повышенного разрушения тромбоцитов, гликокалицин не снижается или несколько повышается (главным образом у больных с повышенным количеством мегакариоцитов) [38–40, 43, 51, 54, 58] (Таблица 3). Отношение гликокалицина к концентрации циркулирующих тромбоцитов, т.е. гликокалициновый индекс, при гипопродуктивных тромбоцитопениях может оставаться неизменным (за счет параллельного снижения и гликокалицина и продукции тромбоцитов) и даже несколько повышаться, но при ИТП он повышается очень значительно, т.к. в этом случае, несмотря на тромбоцитопению, при сохраненной или повышенной продукции тромбоцитов их разрушение резко возрастает [39, 43, 54, 58].

Маркеры продукции и оборота тромбоцитов изменяются и при тромбоцитозах (другое название тромбоцитемии, повышение коли-

чества тромбоцитов выше  $450 \times 10^9/\text{л}$ ), среди которых обычно отдельно рассматривают первичные формы, обусловленные, мутациями в клетках предшественниках мегакариоцитарного ростка в костном мозге (эссенциальная тромбоцитемия, истинная полицитемия), и реактивные формы, развивающиеся при системных воспалениях, дефиците ферритина и некоторых других патологических состояниях [59]. Повышение общего количества ТТ (или «незрелых» тромбоцитов) было зарегистрировано у больных и с первичным [60–63], и реактивным [60] тромбоцитозом, что очевидно является следствием повышенной активности мегакариоцитов, однако некоторое увеличение их процентного содержания было зарегистрировано лишь в одной работе у больных с эссенциальной тромбоцитемией [60]. Очевидно, что на менее выраженные изменения процентного содержания влияет существенное повышение общего содержания тромбоцитов при тромбоцитозах. При оценке размера тромбоцитов по показателю MPV у больных с эссенциальной тромбоцитемией не удалось выявить достоверных различий от уровня здоровых доноров, причем в некоторых работах регистрировались тенденции как к снижению, так и повышению MPV (см. обзор [63]). Повышение свободного ТПО в плазме крови у больных с первичными тромбоцитозами было отмечено в нескольких работах [64–69]. В одной работе повышение ТПО было выявлено и у больных с реактивным тромбоцитозом [64], но в трех других достоверных изменений по сравнению со здоровыми донорами зарегистрировано не было [65, 67, 69]. Важно отметить, что при тромбоцитозах повышение свободного, не связанного с тромбоцитами, ТПО происходит на фоне увеличенного количества тромбоцитов в крови. В нормальных условиях это приводит, наоборот, к снижению количества свободного ТПО (повышено связывание с циркулирующими тромбоцитами), ослаблению его воздействия на костный мозг и замедлению тромбоцитопоэза. Таким образом при тромбоцитозах, в первую очередь при первичных формах, парадоксальное повышение ТПО может быть следствием нарушений нормальной регуляции его синтеза и/или обмена. В связи с повышенной продукцией и разрушением тромбоцитов при тромбоцитозах наблюдается существенное повышение концентрации гликокалицина в плазме крови, однако из-за высокой концентрации тромбоцитов гликокалицинового индекса повышен в значительно меньшей степени [40, 58].

## СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.

Предположение о том, что у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями риск тромботических коронарных осложнений (ОКС, т.е. инфаркт миокарда и не стабильная стенокардия) может быть связан с изменениями продукции тромбоцитов мегакариоцитами костного мозга, впервые было высказано Мартином (Martin) и соавт. (см. обзор [70]). Еще в 1984 г. ими было обнаружено, что у больных с инфарктом миокарда, наблюдается увеличение размера мегакариоцитов (что отражает их повышенную синтетическую активность), причем изменения размера мегакариоцитов коррелировали с изменениями размера (MPV) циркулирующих тромбоцитов [71]. Впоследствии, уже в 1990-е гг. также в работах группы Мартина [72, 73] было выявлено увеличение плоидности мегакариоцитов у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС), с тяжелым атеросклерозом и диабетом, т.е. с высоким риском тромботических событий, а в работе Пампус (Pumpus) и соавт [74] было показано, что у больных с ОКС и в меньшей степени у больных со стабильным течением ИБС (стабильная стенокардия), но с выраженным поражением коронарных артерий, в крови наблюдается увеличение количества циркулирующих мегакариоцитов. Эти данные позволили предположить, что развитие атеросклероза, по крайней мере у части больных с ИБС, может быть ассоциировано с повышенной активностью мегакариоцитов и соответственно с выходом в кровь большего количества «молодых», крупных и более тромбогенных тромбоцитов. Причины изменений мегакариоцитарного роста остаются неясными, в качестве возможных можно предположить: (1) повышение медиаторов ассоциированного с атеросклерозом воспаления, в частности интерлейкина 6, влияющего на предшественники мегакариоцитов (см. обзоры [75, 76]), и (2) возможное потребление тромбоцитов в микротромбы в участках атеросклеротических бляшек, на что косвенно указывают результаты работы Синзигер (Sinzinger) и соавт [77], которые используя радиоактивно меченые тромбоциты, зарегистрировали укорочение времени их жизни в кровотоке у больных с атеросклерозом. Несмотря на неясность патогенетического механизма, предположение о повышенной активности мегакариоцитов и продуцируемых ими тромбоцитов у больных со стабильными, и, в особенности, с нестабильными формами ИБС получило ряд подтверждений в клинических исследованиях.

В нескольких работах было показано, что содержание РТ (или «незрелых» тромбоцитов, в зависимости от способа определения «молодых» форм, см. раздел II) повышено у больных с ОКС по сравнению со здоровыми лицами [30, 78–80] и с больными со ста-

бильной стенокардией [79]. Некоторое повышение уровня РТ у больных со стабильной стенокардией по сравнению со здоровыми лицами также было отмечено в двух работах [79, 81]. В большом количестве исследований проводились измерения размера тромбоцитов (чаще всего по показателю MPV) у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями (см. мета-анализы и обзоры [70, 82–84]). В большинстве из них было зарегистрировано повышение MPV у больных с ОКС, как по сравнению со здоровыми донорами, так с больными со стабильной стенокардией. Некоторое повышение MPV наблюдается и у больных со стабильной стенокардией по сравнению со здоровыми лицами, однако оно было выражено в меньшей степени, чем у больных с ОКС. Появление в крови большего количества РТ и увеличение MPV у больных с ОКС и у стабильных больных с ИБС (хотя и в меньшей степени), указывают на возможность повышения активности мегакариоцитарного ростка при этих патологиях.

Если характеристики самих тромбоцитов, реагирующие на изменения их продукции и оборота, были достаточно подробно изучены у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, то плазменные маркеры этих процессов измеряли лишь в отдельных исследованиях. В нашей собственной работе мы зарегистрировали повышение ТПО в подгруппе больных с ОКС с повышенным уровнем MPV по сравнению с другими подгруппами, в которых значения MPV повышены не были [85]. Плазменный гликокалицин был ранее измерен в одной работе у больных с инфарктом миокарда [58] – было отмечено некоторое превышение, как абсолютных значений этого маркера, так и гликокалицинового индекса, однако эти различия от уровня здоровых лиц не достигали достоверного уровня. Возможно гликокалицин, как и ТПО, был повышен лишь в отдельных подгруппах у этих больных, но более подробный анализ не проводился.

Как было указано выше (см раздел II), субпопуляции «молодых» РТ, и крупных тромбоцитов (которые в значительной степени перекрываются) являются функционально, наиболее активными. В связи с этим повышение уровня РТ и размера тромбоцитов коррелировало и с повышенной функциональной активностью тромбоцитов, как у здоровых лиц, так и у пациентов, получающих антитромбоцитарную терапию. Корреляцию между уровнем агрегации тромбоцитов и MPV у здоровых доноров впервые была зарегистрирована Карпаткиным (Karpatkin) еще в раннем исследовании в 1974 [86] и затем это наблюдение было подтверждено другими авторами [87, 88], и в том числе в нашей работе [88]. Мы также продемонстрировали наличие у здоровых доноров корреляций между различными пока-

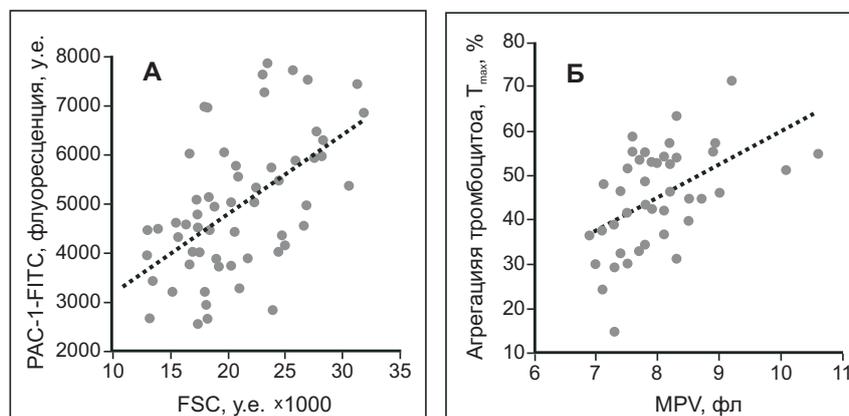


Рис. 3. Примеры корреляционных взаимосвязей между показателями размера тромбоцитов и их функциональной активностью.

А. – Корреляция между FSC тромбоцитов и уровнем экспонирования активного ГП IIb-IIIa (связывание специфического для активной формы антитела PAC-1, меченного FITC) у здоровых добровольцев. Тромбоциты активировали 20 мкМ АДФ. Оба показателя измеряли в цельной крови с помощью проточной цитометрии, у.е. – условные единицы. Коэффициент корреляции ( $r$ ) – 0,560,  $n = 62$ ,  $p < 0,001$ . Собственные данные [16].

Б. – Корреляция между MPV и уровнем агрегации тромбоцитов у больных с ОКС в первые сутки на фоне лечения аспирином. MPV измеряли с помощью гематологического анализатора, а агрегацию тромбоцитов с помощью турбидиметрического метода в анализаторе агрегации тромбоцитов, используя в качестве индуктора 5 мкМ АДФ. Оба показателя измеряли в обогащенной тромбоцитами плазме. T<sub>max</sub>, % – максимальный уровень светорассеивания суспензии тромбоцитов в процессе образования агрегатов. Коэффициент корреляции ( $r$ ) – 0,526,  $n = 43$ ,  $p < 0,001$ . Собственные данные [88].

зателями размера тромбоцитов (MPV, P-LCR и FSC) и уровнем экспонирования на поверхности тромбоцитов активной формы ГП IIb-IIIa [16], обеспечивающей связывание с тромбоцитами фибриногена в процессе их агрегации (корреляция между FSC и экспонированием активного ГП IIb-IIIa у здоровых доноров – см. Рис. 3А). В одной работе также в группе здоровых доноров была отмечена взаимосвязь между количеством РТ и агрегацией тромбоцитов [15], а нам удалось зарегистрировать корреляцию между количеством РТ и экспонированием активной формы ГП IIb-IIIa [16]. В большом количестве работ было показано, что у больных с ИБС и ОКС, получающих антитромбоцитарную терапию, на агре-

гацию тромбоцитов влияет как размер тромбоцитов (MPV) (см. обзоры [70, 84, 89]), так и содержание РТ или «незрелых» тромбоцитов (см. обзоры [70, 84, 90]). У больных, получающих аспирин (ингибитор синтеза тромбоксана А<sub>2</sub>) или клопидогрел (ингибитор P2Y<sub>12</sub> рецептора АДФ) или сочетание этих препаратов (двойная антитромбоцитарная терапия), повышение MPV и содержания РТ ассоциировано с повышением агрегационной активности тромбоцитов, т.е. со снижением эффективности действия применяемых препаратов (корреляция между MPV и агрегацией тромбоцитов у больных с ОКС – см. Рис. 3Б). Такие взаимосвязи реже регистрируются при использовании более мощных чем клопидогрел ингибиторов АДФ рецепторов (празугрел, тикагрелор), т.к. при их действии у многих пациентов наблюдаются практически нулевые уровни АДФ-индуцируемой агрегации. Одной из возможных причин высокой агрегационной активности тромбоцитов у лиц с крупными тромбоцитами и повышенным количеством РТ может быть увеличение на их поверхности абсолютного количества рецептора фибриногена, GPIIb/IIIa. Ранее мы показали, что уровень агрегации тромбоцитов у доноров и пациентов с ОКС коррелируют с количеством GPIIb/IIIa на тромбоцитах [91, 92], а количество этого рецептора, зависит от вариаций MPV [16, 85, 88, 92] и содержания в крови РТ [16].

Повышение размера тромбоцитов и содержания РТ ассоциированы не только с увеличением активности тромбоцитов у таких лиц, но и с повышенным риском клинических тромботических событий. Впервые взаимосвязь MPV и риска тромбообразования была продемонстрирована в работе Мартина (Martin) и соавт. в 1991 г. [93] – у больных перенесших инфаркт миокарда развитие повторных коронарных тромбозов было ассоциировано с высоким MPV. Впоследствии эти результаты были подтверждены в большом количестве исследований при анализе больных с различными формами ОКС (инфаркт ИМ и нестабильная стенокардия) (см. обзоры и мета-анализы [70, 82, 83]). По крайней мере, в одном исследовании была показана корреляция MPV с риском тромбозов у больных со стабильной стенокардией, после проведения им плановых чрескожных коронарных вмешательств [94]. Крупное эпидемиологическое исследование, включившее почти 40000 человек, продемонстрировало также, что повышение MPV является независимым фактором риска развития инфаркта миокарда в общей популяции исходно здоровых лиц [95]. В последние годы были также получены данные, указывающие на то что, не только увеличение размера тромбоцитов, но и уровень содержания «моло-

дых» тромбоцитов (в большинстве работ измеряли не РТ, а фракцию «незрелых» тромбоцитов) повышает риск тромботических событий. Такие взаимосвязи были зарегистрированы у больных после перенесенного ОКС [33, 96], в смешанных группах больных с острым и стабильным течением ИБС после проведения чрескожных коронарных вмешательств [97–99], и в одном исследовании в группе больных со стабильной стенокардией и диабетом [100]. Во всех работах количество неблагоприятных тромботических исходов (смерть от сердечно-сосудистых причин, ОКС (повторный или первичный), возврат стенокардии, ишемические цереброваскулярные события) было независимо ассоциировано с повышением содержания «незрелых» тромбоцитов, что было суммировано при проведении мета анализа этих данных [101].

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К маркерам продукции и оборота тромбоцитов относятся, как некоторые характеристики самих циркулирующих тромбоцитов (содержание в крови РТ и размер тромбоцитов), так и присутствующие в плазме ТПО и гликоалицин. Все эти показатели активно используются для диагностики и изучения патогенеза гематологических заболеваний, связанных с изменением количества циркулирующих тромбоцитов – тромбоцитопений и тромбоцитозов. Исследования последних лет также показали, что у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями повышение содержания РТ и повышенный размер тромбоцитов, приводит к снижению эффективности действия антитромбоцитарных препаратов и повышению риска развития тромботических осложнений, таких, как инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия.

---

**Конфликт интересов:** Все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Michelson A.D., Cattaneo M., Frelinger A.L., Newman P.J. (2019) The clinical approach to disorders of platelet number and function. *Platelets. Fourth Edition.* / Editor A.D. Michelson. Academic Press, 701–705.
2. Schulz C., Massber S. (2017) Platelets in arterial thrombosis. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders.* / Editors P. Gresele, N.S. Kleiman, J.A. Lopez, C.P. Page. Springer, 977–992.
3. Wisman, P.P., Roest, M., Asselbergs, F. W., de Groot, P. G., Moll, F. L., van der Graaf, Y., de Borst, G. J. (2014) Platelet-reactivity tests identify patients at risk of secondary cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **12**, 736–747.
4. Reny, J.L., Fontana, P., Hochholzer, W., Neumann, F.J., Berg, J. ten, Jansen, P.W., Geisler, T., Gawaz, M., Marcucci, R., Gori, A.M., Cuisset, T., Alessi, M.C., Berdagué, P., Gurbel, P.A., Yong, G., Angiolillo, D.J., Aradi, D., Beigel, R., Campo, G., Combescur, C. (2016). Vascular risk levels affect the predictive value of platelet reactivity for the occurrence of MACE in patients on clopidogrel, *Thrombosis and Haemostasis*, **115**, 823–825.
5. Grozovsky, R., Giannini, S., Falet, H., Hoffmeister, K.M. (2015) Novel mechanisms of platelet clearance and thrombopoietin regulation, *Current Opinion in Hematology*, **22**, 445–451.
6. Pluthero, F.G., Kahr, W.H.A. (2018) The birth and death of platelets in health and disease, *Physiology*, **33**, 225–234.
7. Harker, L.A., Finch, C.A. (1969) Thrombokinetics in man, *Journal of Clinical Investigation*, **48**, 963–974.
8. Ballem, P.J., Segal, G.M., Stratton, J.R., Gernsheimer, T., Adamson, J.W., Slichter, S.J. (1987) Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance. *Journal of Clinical Investigation*, **80**, 33–40.
9. Dale, G.L. (1997) Platelet kinetics, *Current opinion in hematology*, **4**, 330–334.
10. Hoffmann, J.J.M.L. (2014) Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility, *Clinical chemistry and laboratory medicine*, **52**, 1107–1117.
11. Buttarello, M., Mezzapelle, G., Frenguglia, F., Plebani, M. (2020) Reticulated platelets and immature platelet fraction: Clinical applications and method limitations, *International Journal of Laboratory Hematology*, **42**, 363–370.
12. Corpataux, N., Franke, K., Kille, A., Valina, C.M., Neumann, F.-J., Nührenberg, T., Hochholzer, W. (2020) Reticulated platelets in medicine: current evidence and further perspectives, *Journal of Clinical Medicine*, **9**, 3737.
13. Kienast, J., Schmitz, G. (1990) Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders, *Blood*, **75**, 116–121.
14. McCabe, D.J.H., Harrison, P., Sidhu, P.S., Brown, M.M., Machin, S.J. (2004) Circulating reticulated platelets in the early and late phases after ischaemic stroke and transient ischaemic attack, *British Journal of Haematology*, **126**, 861–869.
15. Guthikonda, S., Lev, E.I., Patel, R., Delao, T., Bergeron, A.L., Dong, J.-F., Kleiman, N.S. (2007) Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **5**, 490–496.
16. Bodrova, V.V., Shustova, O.N., Khaspekova, S.G., Mazurov, A.V. (2022) Platelet reticulated forms,

- size indexes and functional activity. Interactions in healthy volunteers, *Platelets*, **33**, 398–403.
17. Abe, Y., Wada, H., Tomatsu, H., Sakaguchi, A., Nishioka, J., Yabu, Y., Onishi, K., Nakatani, K., Morishita, Y., Oguni, S., Nobori, T. (2006) A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF), *Thrombosis Research*, **118**, 463–469.
  18. Heilmann, E., Friese, P., Anderson, S., George, J.N., Hanson, S.R., Burstein, S.A., Dale, G.L. (1993) Biotinylated platelets: a new approach to the measurement of platelet life span, *British Journal of Haematology*, **85**, 729–735.
  19. Ault, K.A., Knowles, C. (1995) In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation, *Experimental Hematology*, **23**, 996–1001.
  20. Dale, G.L., Friese, P., Hynes, L.A., Burstein, S.A. (1995) Demonstration that thiazole-orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old, *Blood*, **85**, 1822–1825.
  21. Guthikonda, S., Alviar, C.L., Vaduganathan, M., Arikan, M., Tellez, A., DeLao, T., Granada, J.F., Dong, J.-F., Kleiman, N.S., Lev, E.I. (2008) Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease, *Journal of the American College of Cardiology*, **52**, 743–749.
  22. Mangalpally, K.K.R., Siqueiros-Garcia, A., Vaduganathan, M., Dong, J.-F., Kleiman, N.S., Guthikonda, S. (2010) Platelet activation patterns in platelet size sub-populations: differential responses to aspirin in vitro, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, **30**, 251–262.
  23. Hille, L., Lenz, M., Vlachos, A., Grüning, B., Hein, L., Neumann, F.-J., Nührenberg, T.G., Trenk, D. (2020) Ultrastructural, transcriptional, and functional differences between human reticulated and non-reticulated platelets, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **18**, 2034–2046.
  24. Lador, A., Leshem, L.D., Spectre, G., Abelow, A., Kornowski, R., Lev, E.I. (2017) Characterization of surface antigens of reticulated immature platelets, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, **44**, 291–297.
  25. McBane, R.D., Gonzalez, C., Hodge, D.O., Wysokinski, W.E. (2014) Propensity for young reticulated platelet recruitment into arterial thrombi, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, **37**, 148–154.
  26. Armstrong, P.C., Hoefler, T., Knowles, R.B., Tucker, A.T., Hayman, M.A., Ferreira, P.M., Chan, M.V., Warner, T.D. (2017) Newly formed reticulated platelets undermine pharmacokinetically short-lived antiplatelet therapies, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **37**, 949–956.
  27. Noris, P., Zaninetti, C. (2017) Platelet counting and measurement of platelet dimensions. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders*. / Editors P. Gresele, N.S. Kleiman, J.A. Lopez, C.P. Page. Springer, 571–587.
  28. Noris, P., Melazzini, F., Balduini, C.L. (2016) New roles for mean platelet volume measurement in the clinical practice?, *Platelets*, **27**, 607–612.
  29. Connor, D., Rabbolini, D., Morel-Kopp, M.-C., Fixter, K., Donikian, D., Kondo, M., Chan, O., Jarvis, S., Chen, W., Brighton, T., Chen, V., Ward, C., Joseph, J. (2022) The utility of flow cytometric platelet forward scatter as an alternative to mean platelet volume, *Platelets*, **22**, 1–7.
  30. Cesari, F., Marcucci, R., Caporale, R., Paniccia, R., Romano, E., Gensini, G.-F., Abbate, R., Gori, A.-M. (2008) Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet

- therapy, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **99**, 930–935.
31. Grove, E.L., Hvas, A.M., Mortensen, S.B., Larsen, S.B., Kristensen, S.D. (2011) Effect of platelet turnover on whole blood platelet aggregation in patients with coronary artery disease, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **9**, 185–191.
  32. Spectre, G., Arnetz, L., Östenson, C.-G., Brismar, K., Li, N., Hjemdahl, P. (2011) Twice daily dosing of aspirin improves platelet inhibition in whole blood in patients with type 2 diabetes mellitus and micro- or macrovascular complications, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **106**, 491–499.
  33. Cesari, F., Marcucci, R., Gori, A.M., Caporale, R., Fanelli, A., Casola, G., Balzi, D., Barchielli, A., Valente, S., Giglioli, C., Gensini, G.F., Abbate, R. (2013) Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. Insights from the AMI-Florence 2 Study, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **109**, 846–853.
  34. Thompson, C.B., Jakubowsky, J.A. (1988) The pathophysiology and clinical relevance of platelet heterogeneity, *Blood*, **72**, 1–8.
  35. Leytin, V., Shapiro, H., Novikov, I., Radney, J. (1996) Flow cytometric analysis of the platelet surface area and surface density of glycoprotein IIb-IIIa of unactivated human platelets of various sizes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **226**, 94–100.
  36. Mangalpally, K., Siqueiros-Garcia, A., Vaduganathan, M., Dong, J.-F., Kleiman, N.S., Guthikonda, S. (2010) Platelet activation patterns in platelet size sub-populations: differential responses to aspirin in vitro, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, **30**, 251–262.
  37. Kaushansky, K. (2015). Thrombopoiesis, *Seminars in Hematology*, **52**, 4–11.
  38. Colter, B.S., Kalomiris, E., Steinberg, M., Scudder, L.E. (1984) Evidence that glycolocalicin circulates in normal plasma, *Journal of Clinical Investigation*, **73**, 794–799.
  39. Steinberg, M.H., Kelton, J.G., Colter, B.S. (1987) Plasma glycolocalicin. An aid in the classification of thrombocytopenic disorders, *The New England Journal of Medicine*, **317**, 1037–1042.
  40. Семенова М.М., Семенов А.В., Хаспекова С.Г., Хачикян М.В., Пивник А.В., Васильев С.А., Телегин Л.Ю., Мазуров А.В. (1999) Иммуноферментный метод определения гликокалицина – фрагмента гликопротеида Ib тромбоцитов. Оценка оборота тромбоцитов в кровотоке и дифференциальная диагностика тромбоцитопений, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **128**, 476–479.
  41. Мазуров А.В., Хаспекова С.Г., Васильев С.А. (2018) Диагностика тромбоцитопений, *Терапевтический Архив*, **90**, 4–13.
  42. Ault, K.A., Rinder, H.M., Mitchell, J., Carmody, M.B., Vary, C.P., Hillman, R.S. (1992) The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis, *American Journal of Clinical Pathology*, **98**, 637–646.
  43. Kurata, Y., Hayashi, S., Kiyoi, T., Kosugi, S., Kashiwagi, H., Honda, S., Tomiyama, Y. (2001) Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycolocalicin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic Thrombocytopenia. *American Journal of Clinical Pathology*, **115**, 656–664.
  44. Monteagudo, J.M., Amengual, G.M.J., Muñoz, M.L., Soler, C.J.A., Roig, M.I., Tolosa, V.C. (2006) Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry: An indirect thrombocytopoietic marker, *European Journal of Internal Medicine*, **17**, 541–544.

45. Abe, Y., Wada, H., Sakakura, M., Nishioka, J., Tomatsu, H., Hamaguchi, Y., Oguni, S., Shiku, H., Nobori, T. (2005) Usefulness of fully automated measurement of reticulated platelets using whole blood, *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, **11**, 263–270.
46. Jung, H., Jeon, H.-K., Kim, H.-J., Kim, S.-H. (2010) Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia, *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, **30**, 451–459.
47. Psaila, B., Bussel, J.B., Frelinger, A.L., Babula, B., Linden, M.D., Li, Y., Barnard, M.R., Tate, C., Feldman, E.J., Michelson, A.D. (2011) Differences in platelet function in patients with acute myeloid leukaemia and myelodysplasia compared to equally thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenia, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **9**, 2302–2310.
48. Bowles, K.M., Cooke, L.J., Richards, E.M., Baglin, T.P. (2005) Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia, *Clinical and Laboratory Haematology*, **27**, 370–373.
49. Kaito, K., Otsubo, H., Usui, N., Yoshida, M., Tanno, J., Kurihara, E., Matsumoto, K., Hirata, R., Domitsu, K., Kobayashi, M. (2005) Platelet size deviation width, platelet large cell ration, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia, *British Journal of Haematology*, **128**, 698–702.
50. Borkatoky, S., Jain, R., Gupta, R., Singh, S., Krishan, G., Gupta, K., Kudesia, M. (2009) Role of platelet volume indices in the differential diagnosis of thrombocytopenia: a simple and inexpensive method, *Hematology*, **14**, 182–186.
51. Khaspekova, S.G., Shustova, O.N., Golubeva, N.V., Vasiliev, S.A., Mazurov, A.V. (2015) Relationships of mean platelet volume and plasma thrombopoietin with glycofocalin levels in thrombocytopenic patients, *Acta Haematologica*, **133**, 295–299.
52. Vinholt, P.J., Hvas, A.-M., Nybo, M. (2014) An overview of platelet indices and methods for evaluating platelet function in thrombocytopenic patients, *European Journal of Haematology*, **9**, 367–376.
53. Ichikawa, N., Ishida, F., Shimodaira, S., Tahara, T., Kato, T., Kitano, K. (1996) Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anaemia and idiopathic thrombocytopenic purpura, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **76**, 156–160.
54. Kunishima, S., Tahara, T., Kato, T., Kobayashi, S., Saito, H., Naoe, T. (1996) Serum thrombopoietin and plasma glycofocalin concentrations as useful diagnostic markers in thrombocytopenic disorders, *European Journal of Haematology*, **57**, 68–71.
55. Emmoms, R.V., Reid, D.M., Cohen, R.L., Meng, G., Young, N.S., Dunbar, C.E., Shulman, N.R. (1996) Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction, *Blood*, **87**, 4068–4071.
56. Porcelijn, L., Folman, C.C., Bossers, B., Huiskes, E., Overbeeke, M.A., van der Schoot, C.E., de Haas, M., von dem Borne, A.E. (1998) The diagnostic value of thrombopoietin level measurements in thrombocytopenia, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **79**, 1101–1105.
57. Kuter, D.J., Gernsheimer, T.B. (2009) Thrombopoietin and platelet production in chronic immune thrombocytopenia, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **23**, 1193–1211.
58. Beer, J.H., Buchi, L., Steiner, B. (1994) Glycofocalin: a new assay-the normal plasma levels and its poten-

- tial usefulness in selected diseases, *Blood*, **83**, 691–702.
59. Alimam S., Harrison C.N. (2017) Thrombocytosis and essential thrombocythaemia: search strategy and evidence-based diagnosis. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders*. / Editors P. Gresele, N.S. Kleiman, J.A. Lopez, C.P. Page. Springer, 873–886.
  60. Robinson, M.S., Harrison, C., MacKie, I.J., Machin, S.J., Harrison, P. (1998) Reticulated platelets in primary and reactive thrombocytosis, *British Journal of Haematology*, **101**, 388–389.
  61. Kissova, J., Bulikova, A., Ovesna, P., Bourkova, L., Penka, M. (2014) Increased mean platelet volume and immature platelet fraction as potential predictors of thrombotic complications in BCR/ABL-negative myeloproliferative neoplasms, *International Journal of Hematology*, **100**, 429–436.
  62. Pedersen, O.H., Larsen, M.L., Grove, E.L., van Kooten Niekerk, P.B., Bønløkke, S., Nissen, P.H., Kristensen, S.D., Hvas, A.-M. (2018) Platelet characteristics in patients with essential thrombocytosis, *Cytometry part B: Clinical Cytometry*, **94**, 918–927.
  63. Kvernberg, J., Grove, E.L., Ommen, H.B., Hvas, A.-M. (2021) Platelet function and turnover in essential thrombocythemia: a systematic review, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **47**, 90–101.
  64. Cerutti, A., Custodi, P., Duranti, M., Noris, P., Balduini, C.L. (1997) Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis, *British Journal of Haematology*, **99**, 281–284.
  65. Pitcher, L., Taylor, K., Nichol, J., Selsi, D., Rodwell, R., Marty, J., Taylor D., Wright, S., Moore, D., Kelly, C., Rentoul, A. (1997) Thrombopoietin measurement in thrombocytosis: dysregulation and lack of feedback inhibition in essential thrombocythaemia, *British Journal of Haematology*, **99**, 929–932.
  66. Griesshammer, M., Hornkohl, A., Nichol, J.L., Hecht, T., Raghavachar, A., Heimpel, H., Schrezenmeier, H. (1998) High levels of thrombopoietin in sera of patients with essential thrombocythemia: cause or consequence of abnormal platelet production?, *Annals of Hematology*, **77**, 211–215.
  67. Hou, M., Carneskog, J., Mellqvist, U.-H., Stockelberg, D., Hedberg, M., Wadenvik, H., Kutti, J. (1998) Impact of endogenous thrombopoietin levels on the differential diagnosis of essential thrombocythaemia and reactive thrombocytosis, *European Journal of Haematology*, **61**, 119–122.
  68. Tomita, N., Motomura, S., Sakai, R., Fujimaki, K., Tanabe, J., Fukawa, H., Harano, H., Kanamori, H., Ogawa, K., Mohri, H., Maruta, A., Kodama, F., Ishigatsubo, Y., Tahara, T., Kato, T. (2000) Strong inverse correlation between serum TPO level and platelet count in essential thrombocythemia, *American Journal of Hematology*, **63**, 131–1513.
  69. Karakuş, S., Özcebe, O.İ., Haznedaroğlu, İ.C., Göker, H., Özatlı, D., Koşar, A., Büyükaşık, Y., Ertuğrul, D., Sayinalp, N., Kirazlı, Ş., Dündar, S.V. (2002) Circulating thrombopoietin in clonal versus reactive thrombocytosis, *Hematology*, **7**, 9–12.
  70. Martin, J.F., Kristensen, S.D., Mathur, A., Grove, E.L., Fizzah, A.C. (2012) The causal role of megakaryocyte-platelet hyperactivity in acute coronary syndromes, *Nature Reviews Cardiology*, **9**, 658–670.
  71. Trowbridge, E.A., Slater, D.N., Kishk, Y.T., Woodcock, B.W., Martin, J.F. (1984) Platelet production in myocardial infarction and sudden cardiac death, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **52**, 167–171.
  72. Bath, P.M., Gladwin, A.M., Carden, N., Martin, J.F. (1994) Megakaryo-

- cyte DNA content is increased in patients with coronary artery atherosclerosis, *Cardiovascular Research*, **28**, 1348–1352.
73. Brown, A.S., Hong, Y., Belder, A., Beacon, H., Beeso, J., Sherwood, R., Edmonds, M., Martin, J.F., Erusalimsky, J.D. (1997) Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **17**, 802–807.
74. Van Pampus, E.C.M., Huijgens, P.C., Zevenbergen, A., Verheugt, F.W., Langenhuijsen, M.M. (1994) Circulating human megakaryocytes in cardiac diseases, *European Journal of Clinical Investigation*, **24**, 345–349.
75. Baatout, S. (1996) Interleukin-6 and megakaryocytopoiesis: an update, *Annals of Hematology*, **73**, 157–162.
76. Tyrrell, D.J., Goldstein, D.R. (2021) Ageing and atherosclerosis: vascular intrinsic and extrinsic factors and potential role of IL-6, *Nature Reviews Cardiology*, **18**, 58–68.
77. Sinzinger, H., Virgolini, I., Fitscha, P. (1990) Platelet kinetics in patients with atherosclerosis, *Thrombosis Research*, **57**, 507–516.
78. Lakkis, N., Dokainish, H., Abuzahra, M., Tsyboulev, V., Jorgensen, J., Ponce De Leon, A., Saleem, A. (2004) Reticulated platelets in acute coronary syndrome: a marker of platelet activity, *Journal of the American College of Cardiology*, **44**, 2091–2093.
79. Grove, E.L., Hvas, A.-M., Kristensen, S.D. (2009) Immature platelets in patients with acute coronary syndromes, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **101**, 151–156.
80. Ramon, G.L., Martin-Herrero, F., Gonzalez-Lopez, T.J., Olazabal, J., Diez-Campelo, M., Pabon, P., Alberca, I., San Miguel, J.F. (2010) The role of immature platelet fraction in acute coronary syndrome, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **103**, 247–249.
81. Ibrahim, H., Nadipalli, S., Usmani, S., DeLao, T., Green, L., Kleiman, N.S. (2016) Detection and quantification of circulating immature platelets: agreement between flow cytometric and automated detection, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, **42**, 77–83.
82. Chu, S.G., Becker, R.C., Berger, P.B., Bhatt, D.L., Eikelboom, J.W., Konkle, B., Mohler, E.R., Reilly, M.P., Berger, J.S. (2010) Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **8**, 148–156.
83. Sansanayudh, N., Numthavaj, P., Muntam, D., Yamwong, S., McEvoy, M., Attia, J., Sritara, P., Thakkinstian, A. (2015) Prognostic effect of mean platelet volume in patients with coronary artery disease A systematic review and meta-analysis, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **114**, 1299–1309.
84. Freynhofer, M.K., Gruber, S.C., Grove, E.L., Weiss, T.W., Wojta, J., Huber, K. (2015) Antiplatelet drugs in patients with enhanced platelet turnover: biomarkers versus platelet function testing, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **114**, 459–468.
85. Khaspekova, S.G., Zyuryaev, I.T., Yakushkin, V.V., Sirotkina, O.V., Zaytseva, N.O., Ruda, M.Ya., Panteleev, M.A., Mazurov, A.V. (2014) Relationships of glycoproteins IIb-IIIa and Ib content with mean platelet volume and their genetic polymorphisms, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, **25**, 128–134.
86. Karpatlin, S. (1978) Heterogeneity of human platelets. VI. Correlation of platelet function with platelet volume, *Blood*, **51**, 307–316.
87. Sharp, D.S., Bath, P.M., Martin, J.F., Beswick, A.D., Sweetnam, P.M. (1994) Platelet and erythrocyte volume and count: epidemiological predictors of impedance measured

- ADP-induced platelet aggregation in whole blood, *Platelets*, **5**, 252–257.
88. Khaspekova, S.G., Zyuryaev, I.T., Yakushkin, V.V., Naimushin, Ya.A., Sirotkina, O.V., Zaytseva, N.O., Ruda, M.Ya., Mazurov, A.V. (2014) Mean platelet volume: interactions with platelet aggregation activity and glycoprotein IIb-IIIa and Ib expression levels, *Biochemistry (Moscow). Supplement Series B Biomedical Chemistry*, **8**, 134–142.
  89. Handtke, S., Thiele, T. (2020) Large and small platelets—(When) do they differ?, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **18**, 1256–126788.
  90. Hannawi, B., Hannawi, Y., Kleiman, N.S. (2018) Reticulated platelets: changing focus from basics to outcomes, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **118**, 1517–1527.
  91. Sirotkina, O.V., Khaspekova, S.G., Zabolina, A.M., Shimanova, Y.V., Mazurov, A.V. (2007) Effects of platelet glycoprotein IIb-IIIa number and glycoprotein IIIa Leu33Pro polymorphism on platelet aggregation and sensitivity to glycoprotein IIb-IIIa antagonists, *Platelets*, **18**, 506–514.
  92. Yakushkin, V.V., Zyuryaev, I.T., Khaspekova, S.G., Sirotkina, O.V., Ruda, M.Ya., Mazurov, A.V. (2011) Glycoprotein IIb-IIIa content and platelet aggregation in healthy volunteers and patients with acute coronary syndrome, *Platelets*, **22**, 243–251.
  93. Martin, J.F., Bath, P.M., Burr, M.L. (1991) Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction, *Lancet*, **338**, 1409–1411.
  94. Eisen, A., Bental, T., Assali, A., Kornowski, R., Lev, E.I. (2013) Mean platelet volume as a predictor for long-term outcome after percutaneous coronary intervention, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, **36**, 469–474.
  95. Klovaite, J., Benn, M., Yazdanyar, S., Nordestgaard, B.G. (2011) High platelet volume and increased risk of myocardial infarction: 39 531 participants from the general population, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **9**, 49–56.
  96. López-Jiménez, R.A., Martín-Herrero, F., González-Porrás, J.R., Sánchez-Barba, M., Pabón-Osuna, C.M. (2013) Immature platelet fraction: a new prognostic marker in acute coronary syndrome, *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, **66**, 147–148.
  97. Ibrahim, H., Schutt, R.S., Hannawi, B., DeLao, T., Barker, C.M., Kleiman, N.S. (2014) Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes, *Journal of the American College of Cardiology*, **64**, 2122–2129.
  98. Freynhofer, M.K., Iliev, L., Bruno, V., Rohla, M., Egger, F., Weiss, T.W., Hübl, W., Willheim, M., Wojta, J., Huber, K. (2017) Platelet turnover predicts outcome after coronary intervention, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **117**, 923–933.
  99. Tscharré, M., Farhan, S., Bruno, V., Rohla, M., Egger, F., Weiss, T.W., Hübl, W., Willheim, M., Wojta, J., Geppert, A., Huber, K., Freynhofer, M.K. (2019) Impact of platelet turnover on long-term adverse cardiovascular outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention, *European Journal of Clinical Investigation*, **49**, 13157.
  100. Perl, L., Matatov, Y., Koronowski, R., Lev, E.I., Solodky, A. (2020) Prognostic significance of reticulated platelet levels in diabetic patients with stable coronary artery disease, *Platelets*, **31**, 1012–1018.
  101. Zhao, Y., Lai, R., Zhang, Y., Shi, D. (2020) The prognostic value of reticulated platelets in patients with coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **7**, 57–61.