

На правах рукописи

Будник Иван Александрович

**МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КРОВИ
И ПУТИ ЕГО КОРРЕКЦИИ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ**

14.03.03 – Патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Морозова Ольга Леонидовна

Официальные оппоненты:

Уразова Ольга Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра патофизиологии, заведующий кафедрой.

Петрищев Николай Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, кафедра патофизиологии с курсом клинической патофизиологии, профессор кафедры.

Долгих Владимир Терентьевич – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», кафедра общей патологии Института высшего и дополнительного профессионального образования, заведующий кафедрой.

Ведущая организация:

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2020 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.08 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1, и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Острая массивная кровопотеря является серьезным осложнением тяжелых травм, обширных хирургических вмешательств, патологических родов и других форм патологии и встречается с частотой 25–45 случаев на 100 000 населения в год (Halmin M. et al., 2016). Летальность при этом достигает 40% и не имеет заметной тенденции к снижению (Pham H. P. et al., 2013; Ranucci M. et al., 2013; Say L. et al., 2014). Ежегодно в мире от острой массивной кровопотери погибают около 1,9 млн человек, из них около 1,5 млн — от кровотечений в результате травмы (Cannon J. W., 2018).

Механизмы адаптации к быстрой потере значительной части объема циркулирующей крови (ОЦК) малоэффективны и, как правило, приводят к возникновению вторичных расстройств в различных системах организма, в том числе в системе гемостаза (Йовенко И. А. и др., 2017; Kornblith L. Z. et al., 2019). Инфузия больших объемов кристаллоидных растворов, присоединение гипотермии и ацидоза усугубляют нарушения гемостатического потенциала крови и приводят в итоге к развитию диффузного, трудноконтролируемого капиллярного кровотечения, которое невозможно остановить методами хирургического гемостаза. Возникновение такого коагулопатического кровотечения и является одной из главных потенциально предотвратимых причин смерти пациентов с острой массивной кровопотерей (Morrison J. J. et al., 2016; Rossaint R. et al., 2013).

Экстренная коррекция гемостатического потенциала крови при больших кровотечениях представляет собой большую проблему. В настоящее время в большинстве случаев для этого проводится переливание компонентов аллогенной крови в фиксированном соотношении доз (Holcomb J. B. et al., 2015; Ponschab M. et al., 2015). Поскольку концентрация факторов свертывания в донорской плазме невелика, применение этого подхода у пациентов с выраженным дефицитом факторов свертывания не позволяет повысить их концентрацию до целевого уровня (Innerhofer P. et al., 2013; Khan S. et al., 2015). Кроме того, гемотрансфузия связана с риском острого повреждения легких, циркуляторной перегрузки, анафилаксии, аллоиммунизации и других осложнений (Жибурт Е. и др., 2018; Шихмирзаев Т. А. и др., 2018). В связи с этим в настоящее время активно разрабатываются алгоритмы целенаправленной гемостатической терапии, основанные на применении концентратов факторов свертывания (Буланов А. Ю. и др., 2013; Stein P. et al., 2017). Однако применение этих препаратов в условиях гемодилюции и гиперфибринолиза, свойственных пациентам с острой массивной кровопотерей, дает противоречивые результаты и не всегда позволяет достичь желаемого результата (Godier et al., 2018).

Особую сложность представляет экстренная коррекция гемостатического потенциала при кровотечениях, возникших на фоне состояний высокого геморрагического риска, поскольку

изменения в системе гемостаза, обусловленные кровопотерей и последующей инфузионно-трансфузионной терапией, накладываются на изначально имеющиеся нарушения в системе гемостаза (Kozek-Langenecker S. A., 2015). В большинстве случаев повышенная кровоточивость обусловлена расстройствами тромбоцитарного звена системы гемостаза (Платонова О. А. и др. 2017; Casari C. et al., 2016; Krishnegowda M. et al., 2015). Влияние системных гемостатиков на гемостатический потенциал крови у пациентов с различными формами тромбоцитопении и тромбоцитопатии, особенно при их сочетании с гемодилуцией и гиперфибринолизом, остается во многом неизученным.

Вышеуказанное свидетельствует о необходимости совершенствования методов экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при состояниях высокого геморрагического риска. Для этого необходимо расширить представления о механизмах нарушения гемостатического потенциала при этих состояниях, изучить влияние на него различных гемостатических препаратов и сформулировать новые, патогенетически обоснованные подходы к его коррекции. Решению этой проблемы и посвящено настоящее диссертационное исследование.

Степень разработанности темы исследования

Большую роль в патогенезе травматической коагулопатии играют гемодилуция, гиперфибринолиз, гипотермия и ацидоз (Bolliger D. et al., 2010; Wang W. et al., 2016), однако их относительный вклад в нарушение гемостатического потенциала требует уточнения. Эффективность концентратов факторов свертывания при этой патологии системы гемостаза показана не во всех исследованиях (Jeppsson A. et al., 2016; Nascimento V. et al., 2016), что в ряде случаев могло быть обусловлено зависимостью вызываемых ими эффектов от конкретного сочетания вышеуказанных патогенетических факторов, что в настоящее время изучено недостаточно.

Тромбоцитопения приводит к снижению гемостатического потенциала, хотя связь между содержанием тромбоцитов и тяжестью кровотечений обнаруживается не всегда, что может быть обусловлено сопутствующей дисфункцией тромбоцитов (Middelburg R. A. et al., 2016; Pansy J. et al., 2010). Оценка функций тромбоцитов в условиях тромбоцитопении затруднена, поскольку большинство методов исследования тромбоцитарного звена системы гемостаза чувствительны к содержанию тромбоцитов (Пономаренко Е. А. и др., 2019; Paniccia R. et al., 2015). Преодолеть это ограничение можно путем разработки критериев оценки функций тромбоцитов, учитывающих их содержание в крови. Методы экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при тяжелой тромбоцитопении на сегодняшний день сводятся к переливанию тромбоцитарного концентрата (Меликян А. Л. и др., 2016). Возможности применения системных гемостатиков при этой патологии практически не изучены.

Для купирования тяжелых кровотечений при тромбастении Гланцмана рекомендовано применение концентрата рекомбинантного активированного фактора VII (rFVIIa), эффективность которого при данной патологии составляет 50–100 % (Di Minno G. et al., 2015). В то же время у некоторых пациентов его применение в той же дозе вызывает тромботические осложнения (Rajpurkar M. et al., 2014). Причины столь значительной межиндивидуальной вариабельности изучены недостаточно. Влияние других концентратов факторов свертывания на гемостатический потенциал при тромбастении Гланцмана практически не исследовано. Поскольку содержание тромбоцитов при этой патологии остается в пределах нормальных значений, возможным направлением для коррекции гемостаза может стать стимуляция прокоагулянтной активности тромбоцитов, однако на сегодняшний день эта возможность не изучена.

Назначение антитромбоцитарных препаратов связано с риском геморрагических осложнений, в том числе больших кровотечений (Барбараш О. Л., 2016; Gimbel M. E. et al., 2018). Применение существующих методов оценки остаточной реактивности тромбоцитов для персонализированного подбора дозы этих препаратов не позволило добиться значимого снижения частоты кровотечений (Valgimigli M. et al., 2018). Одним из ключевых событий в ходе агрегации тромбоцитов является формирование комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет». Знания о влиянии антитромбоцитарных препаратов на его формирование могут стать основой для разработки нового метода оценки степени угнетения функций тромбоцитов на фоне антитромбоцитарной терапии, однако до настоящего времени этот вопрос не был предметом специального исследования.

Цель исследования

Изучить молекулярно-клеточные механизмы нарушений гемостатического потенциала крови и разработать новые эффективные подходы к его коррекции при состояниях высокого геморрагического риска.

Задачи исследования

1. Определить относительный вклад гемодилуции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушение формирования кровяного сгустка и изучить возможности его коррекции путем комбинированного применения гемостатических препаратов.
2. Изучить возможности коррекции формирования кровяного сгустка в условиях гемодилуции с помощью гемостатических препаратов в зависимости от уровня фибринолитической активности.
3. Провести сравнительный анализ эффектов различных гемостатических препаратов на формирование кровяного сгустка в условиях гиперфибринолиза, индуцированного тканевым или урокиназным активатором плазминогена.

4. Разработать критерии оценки адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов и формирования кровяного сгустка в зависимости от содержания тромбоцитов в крови и использовать их у пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией.
5. Исследовать возможности коррекции гемостатического потенциала крови в модели изолированной тромбоцитопении *in vitro* с помощью концентратов факторов свертывания в зависимости от содержания тромбоцитов в крови и уровня фибринолитической активности.
6. Изучить генерацию тромбина у пациентов с тромбастенией Гланцмана и обосновать персонализированный подход к ее коррекции с помощью концентрата рекомбинантного активированного фактора VII.
7. Исследовать возможность коррекции формирования кровяного сгустка в модели тромбастении Гланцмана *in vitro* с помощью концентратов факторов свертывания в зависимости от уровня фибринолитической активности, а также путем стимуляции прокоагулянтной активности тромбоцитов.
8. Изучить влияние ингибиторов функций тромбоцитов на формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ –цитоскелет» как возможный механизм развития геморрагических осложнений при использовании антитромбоцитарных препаратов.

Научная новизна

Впервые в условиях гемодилуции установлен относительный вклад гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушение гемостатического потенциала крови и показано, что коррекция выявленных нарушений в модели травматической коагулопатии обеспечивается путем комбинированного применения гемостатических препаратов в субэффективных концентрациях. Сформулированы принципы коррекции гемостатического потенциала крови в зависимости от степени гемодилуции, уровня и механизмов индукции фибринолитической активности, степени снижения содержания тромбоцитов и нарушения их функциональной активности. При этом выявлены наиболее эффективные комбинации гемостатических препаратов, позволяющие достигать максимального результата в зависимости от конкретного сочетания вышеуказанных патогенетических факторов.

Разработана оригинальная модель изолированной тромбоцитопении *in vitro*, предусматривающая возможность контроля содержания тромбоцитов в образце крови. С помощью этой модели определены критерии оценки адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов и их участия в формировании кровяного сгустка в зависимости от тяжести тромбоцитопении. Применение этих критериев у пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией позволило установить, что снижение гемостатического потенциала крови при данной патологии обусловлено именно снижением содержания тромбоцитов при их нормальной функциональной активности.

Впервые установлено, что в зависимости от степени коррекции генерации тромбина с помощью концентрата rFVIIa *ex vivo* пациенты с тромбастенией Гланцмана (ТГ) могут быть разделены на три категории: пациенты с «сильным», «средним» и «слабым» ответом. Разработана модель ТГ *in vitro*, с помощью которой установлено, что коррекция формирования кровяного сгустка достигается путем стимуляции прокоагулянтной активности тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с гетеротримерным G-белком, в частности через рецепторы тромбина (PAR-1 и PAR-4), АДФ (P2Y₁ и P2Y₁₂) и тромбоксана A₂ (TP).

Получены новые знания о закономерностях формирования комплекса «фибриноген–интегрин αIIbβ₃–цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов. При этом показана роль сигнализации от рецепторов, сопряженных с гетеротримерным G-белком, активации интегринов αIIbβ₃ «изнутри наружу», физического соединения тромбоцитов друг с другом через фибриноген, сигнализации от интегринов αIIbβ₃ «снаружи внутрь» и полимеризации β-актина. Показано, что механизм угнетения функций тромбоцитов под влиянием ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов P2Y₁₂, используемых для проведения двойной антитромбоцитарной терапии, а также антагонистов рецепторов P2Y₁ включает нарушение формирования указанного комплекса.

Теоретическая и практическая значимость

Настоящая работа расширяет представления о роли гемодилуции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза — ключевых патогенетических факторов травматической коагулопатии — в нарушении гемостатического потенциала крови и обосновывает новые подходы к его коррекции. Показано, что комбинированное применение антифибринолитиков и концентратов факторов свертывания с разным механизмом действия позволяет достигать значимой коррекции формирования кровяного сгустка при их использовании даже в субэффективных концентрациях. Перенос этого подхода в клиническую практику может повысить эффективность гемостатической терапии при травматической коагулопатии без существенного увеличения риска тромботических осложнений. В работе также установлены новые принципы коррекции гемостатического потенциала крови, учитывающие наличие и тяжесть гемодилуции, уровень фибринолитической активности и механизмы ее индукции, содержание и функциональное состояние тромбоцитов, что свидетельствует о необходимости персонализированного применения гемостатических средств в зависимости от конкретного сочетания вышеуказанных патогенетических факторов.

Разработан новый подход к оценке адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов и их участия в формировании кровяного сгустка, который может быть использован для выявления дисфункции тромбоцитов у пациентов с тромбоцитопенией различного генеза и более точной

оценки степени геморрагического риска. Применение этого подхода у пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией показало, что снижение эффективности тромбоцитарного звена системы гемостаза при данной патологии обусловлено, прежде всего, снижением содержания тромбоцитов при их нормальной адгезивной, агрегационной, прокоагулянтной и контрактильной активности, а следовательно, причину различной кровоточивости при сходном содержании тромбоцитов следует искать в иных аспектах их физиологии.

Изучение возможности коррекции генерации тромбина при ТГ с помощью концентрата rFVIIa *ex vivo* позволило выделить три категории пациентов в зависимости от силы ответа на этот препарат: пациенты с «сильным», «средним» и «слабым» ответом, — что объясняет межиндивидуальную вариабельность его гемостатической эффективности в клинической практике. Данный подход может быть использован для предварительной оценки чувствительности пациента к rFVIIa, персонализированного подбора дозы препарата и прогнозирования эффективности гемостатической терапии. Установленная в модели ТГ возможность коррекции формирования кровяного сгустка путем стимуляции тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с гетеротримерным G-белком, уточняет представления о роли этих рецепторов и интегринов $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ в регуляции прокоагулянтной функции тромбоцитов и открывает новое патогенетически обоснованное направление гемостатической терапии при этой патологии. Расширение арсенала гемостатических препаратов для купирования больших кровотечений при ТГ имеет большое значение, поскольку в настоящее время концентрат rFVIIa является единственным препаратом, рекомендованным для этой цели.

Получены новые знания о закономерностях формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов и влиянии на этот процесс ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов P2Y₁ и P2Y₁₂. При этом установлено, что амплитуда агрегации тромбоцитов не всегда отражает степень угнетения функциональной активности тромбоцитов и что тестирование прочности связи интегринов $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ с фибриногеном и исследование ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ с цитоскелетом в динамике агрегации тромбоцитов может стать основой для разработки нового метода оценки остаточной реактивности тромбоцитов и персонализированного подбора дозы и вида антитромбоцитарных препаратов.

Методология и методы исследования

Объектом исследования явилась система гемостаза при состояниях высокого геморрагического риска.

Предметом исследования стали механизмы нарушения гемостатического потенциала крови при геморрагических состояниях и возможности его коррекции с помощью гемостатических препаратов в зависимости от сочетания действующих патогенетических факторов.

Теоретической основой исследования стали достижения фундаментальной и прикладной медицинской науки, сформулированные в трудах отечественных и зарубежных ученых, посвященных патофизиологии нарушений гемостатического потенциала крови, а также международные и национальные клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике кровотечений при различных геморрагических состояниях.

Методологической основой исследования был избран метод моделирования геморрагических состояний, позволяющий изучать вклад определенных патогенетических факторов в их развитие и возможности коррекции гемостатического потенциала крови с помощью гемостатических средств, еще не используемых при этих состояниях в клинической практике. При выполнении данной работы использовался также ряд других общенаучных и специальных методов исследования. Последние приведены в разделе «Материалы и методы исследования» (с. 13–16).

Основные положения, выносимые на защиту

1. В условиях гемодилюции гиперфибринолиз, гипотермия и ацидоз оказывают различное влияние на формирование и лизис кровяного сгустка. Коррекция формирования сгустка достигается комбинированным применением гемостатических препаратов даже в субэффективных концентрациях. При этом фибриноген ослабляет антифибринолитический эффект транексамовой кислоты.
2. В условиях гемодилюции возможность коррекции формирования кровяного сгустка с помощью гемостатических препаратов зависит от уровня фибринолитической активности плазмы.
3. В условиях гиперфибринолиза возможность коррекции формирования кровяного сгустка с помощью гемостатических препаратов зависит от вида действующего активатора плазминогена.
4. При первичной иммунной тромбоцитопении снижение адгезии и агрегации тромбоцитов и плотности кровяного сгустка обусловлено уменьшением содержания тромбоцитов в крови при сохранении их нормальной функциональной активности.
5. При тромбоцитопении возможность коррекции формирования кровяного сгустка с помощью гемостатических препаратов зависит от содержания тромбоцитов в крови и уровня фибринолитической активности плазмы.
6. В зависимости от степени коррекции генерации тромбина с помощью концентрата рекомбинантного активированного фактора VII пациенты с тромбастенией Гланцмана могут быть разделены на три категории: пациенты с «сильным», «средним» и «слабым» ответом, причем степень коррекции генерации тромбина не зависит от вида мутации, лежащей в основе данной патологии.

7. При тромбастении Гланцмана коррекция формирования кровяного сгустка с помощью гемостатических препаратов зависит от фибринолитической активности плазмы. Коррекция достигается также путем стимуляции прокоагулянтной активности тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с гетеротримерным G-белком.
8. Механизм угнетения функций тромбоцитов под влиянием ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов P2Y₁ и P2Y₁₂ включает нарушение формирования комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет». Сигнализация от рецептора P2Y₁₂ необходима для обеспечения прочности связи фибриногена с интегринами α IIb β 3 и их ассоциации с цитоскелетом.

Степень достоверности результатов исследования

Высокая достоверности результатов и обоснованность выводов исследования обеспечена использованием в работе современных и общепринятых методов исследования, адекватных поставленной цели и задачам; использованием сертифицированных реактивов и оборудования; тщательным планированием каждого эксперимента, при необходимости с участием соответствующих специалистов; использованием методов статистического анализа, соответствующих дизайну конкретного эксперимента; непротиворечивостью полученных результатов и их сопоставимостью с результатами других авторов; обсуждением результатов исследования на международных и всероссийских научных конференциях; публикацией результатов исследования в ведущих рецензируемых научных журналах.

Апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на следующих научных мероприятиях: XXII Congress of the ISTH (Бостон, 2009); the 6th International Platelet Symposium (Маале-ха-Хамиша, 2010); the 6th Congress of the FISEB (Эйлат, 2011); XXIII Congress of the ISTH (Киото, 2011); the 21st International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis (Брайтон, 2012); XXIV Congress of the ISTH, (Амстердам, 2013); the 8th International Platelet Symposium (Маале-ха-Хамиша, 2014 г.); XXV Congress of the ISTH (Торонто, 2015); VI Международная конференция «Проблема безопасности в анестезиологии» (Москва, 2015); XVII Всероссийская конференция с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 2015); VI Международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения — 2015», (Санкт-Петербург, 2015); the 60th Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (Мюнстер, 2016); the 36th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine (Брюссель, 2016); X юбилейная Международная научно-практическая конференция молодых ученых-медиков (Курск, 2016); XXII Всероссийская конфе-

рениция с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии — 2016» (Санкт-Петербург, 2016); III Конгресс гематологов России (Москва, 2016); 70-я юбилейная Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2016 г.); XIX Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2016); the 21st Congress of the European Hematology Association (Копенгаген, 2016); 15-й Съезд общероссийской общественной организации «Федерация анестезиологов и реаниматологов» (Москва, 2016); 8-я Всероссийская конференция по клинической гемостазиологии и гемореологии (Москва, 2016); Международная конференция травматологов-ортопедов «Применение современных технологий лечения в российской травматологии и ортопедии» (Москва, 2016); XXIII Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии — 2017» (Санкт-Петербург, 2017); XXVI Congress of the ISTH (Берлин, 2017); XXXIII International Congress of the World Federation of Hemophilia (Глазго, 2018); XXIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Лабораторная служба в современных реалиях» (Москва, 2019).

По итогам рассмотрения на заседании кафедры патофизиологии Института клинической медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) диссертация рекомендована к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.03 – Патологическая физиология, протокол № 5 от 01.11.2019.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автору принадлежит ведущая роль в выборе научного направления, постановке цели и задач, выборе методов исследования. Привлечение здоровых добровольцев и пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией и тромбастенией Гланцмана к участию в исследовании и взятие у них биоматериала обеспечили врачи Института тромбоза и гемостаза Медицинского центра им. Х. Шибы (Израиль), на базе которого выполнена экспериментальная часть работы. При этом автор самостоятельно выполнил все описанные в диссертации эксперименты, статистическую обработку, анализ и обобщение полученных результатов. Автор внес определяющий вклад в оформление результатов исследования в виде статей, опубликованных в рецензируемых научных изданиях. Вклад ученых, оказавших содействие в выполнении работы, отражен в публикациях по теме диссертации. На разных этапах работы научное консультирование проводили В. Shenkman, N. Savion и О. Л. Морозова.

Связь с планом научного направления

Тема диссертации утверждена на заседании Межфакультетского ученого совета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 6 от 25.06.2019.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры патофизиологии и кафедры патологии человека Института клинической медицины и кафедры патологии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в учебный процесс и научную работу кафедры патологической физиологии им. акад. А. А. Богомольца и научную работу Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.03.03 — Патологическая физиология (медицинские науки). Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований специальности, конкретно пунктам 1, 2, 9 и 10.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 62 работы, в т. ч. 16 статей (15 оригинальных статей и 1 обзор литературы), из которых 4 опубликованы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, утвержденный Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, и 12 — в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и/или Web of Science (средневзвешенный импакт-фактор — 2,497) и считающихся входящими в указанный перечень (в соответствии с письмом Министерства образования и науки Российской Федерации № 13-6518 от 01.12.2015).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 325 страницах, содержит 8 таблиц и 55 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 54 источника на русском и 344 — на английском языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования

Материалом исследования явилась кровь, полученная от 256 здоровых добровольцев (145 мужчин и 111 женщин) в возрасте от 20 до 60 лет, 12 пациентов (4 мужчин и 8 женщин) с первичной хронической иммунной тромбоцитопенией (ИТП) в возрасте от 21 до 52 лет и 24 пациентов (11 мужчин и 13 женщин) с тромбастенией Гланцмана (ТГ) типа 1 в возрасте от 21 до 50 лет, находившихся под наблюдением в отделении гематологии Медицинского центра имени Х. Шибя (Израиль). Перед включением в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

Взятие крови осуществляли пункцией срединной локтевой вены с использованием вакуумных пробирок, содержащих 3,2 % раствор трехзамещенного цитрата натрия. Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП), бестромбоцитарную плазму, плазму без клеточных микрочастиц и эритроцитарную массу получали путем дифференциального центрифугирования цельной цитратной крови при комнатной температуре (КТ).

Тромбоэластометрию проводили с помощью анализатора ROTEM (Pentapharm, Германия). Для теста NATEM в кювету помещали 20 мкл реагента star-tem (0,2 моль/л CaCl_2) и 20 мкл натрий-фосфатного буфера (PBS, pH 7,4), для теста EXTEM — 20 мкл реагента star-tem и 20 мкл разведенного 1 : 100 реагента ex-tem (содержит тканевой фактор и фосфолипиды), для теста INTEM — 20 мкл реагента star-tem и 20 мкл реагента in-tem (содержит фосфолипиды частичного тромбопластина и эллаговую кислоту). Далее в кювету добавляли 300 мкл крови или плазмы и в течение 60 мин при 37 °С (если не указано иное) регистрировали формирование (и лизис) кровяного сгустка (тэмограмму). Оценивали скорость формирования сгустка ($A\alpha$, градусы), максимальную плотность сгустка (MCF, мм) и время начала его лизиса (LOT, мин).

Тест генерации тромбина выполняли методом калиброванной автоматизированной тромбинографии (Nemker et al., 2003). Для этого в лунки 96-луночного планшета помещали 20 мкл рабочего буфера и 80 мкл ОТП. Генерацию тромбина инициировали добавлением 20 мкл рабочего буфера, содержащего 100 ммоль/л CaCl_2 и 5 ммоль/л флуорогенного субстрата тромбина Z-GGR-AMC (Bachem, Швейцария). Флуоресцентный сигнал регистрировали с помощью флуориметра Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Германия) при длине волны экстинкции 390 нм и длине волны эмиссии 460 нм в течение 45 мин при 37 °С. Единицы флуоресценции переводили в единицы концентрации тромбина с помощью программы (Thrombinoscope, version 3.0.0.29), сопряженной с флуориметром, и представляли в виде кривой (тромбограммы). Оценивали время инициации (мин), пиковую концентрацию тромбина (ПКТ, нмоль/л) и эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП, нмоль/л × мин).

Исследование адгезии и агрегации тромбоцитов при высокой скорости сдвига проводили с помощью анализатора Impact-R (DiaMed, Швейцария). Для этого 130 мкл крови помещали на дно полистиреновых ячеек и подвергали воздействию скорости сдвига $1\ 800\ \text{с}^{-1}$ в течение 2 мин при КТ. Затем ячейку отмывали от крови с помощью PBS и адгезированные тромбоциты и их агрегаты окрашивали красителем May-Grünwald. Полученный препарат исследовали с помощью программы для анализа изображений, сопряженной с анализатором Impact-R. Адгезию и агрегацию тромбоцитов оценивали по площади покрытия ячейки адгезированными частицами (SC, %).

Световую трансмиссионную агрегометрию проводили с помощью агрегометра AggRAM (Helena Laboratories, США). Для этого 225 мкл ОТП помещали в кюветы агрегометра, после чего добавляли 25 мкл индуктора агрегации тромбоцитов. Агрегацию оценивали по изменению светопропускания ОТП после добавления в нее индуктора агрегации. Запись агрегатограммы осуществляли в течение 5–15 мин при $37\ ^\circ\text{C}$ и непрерывном перемешивании магнитной мешалкой со скоростью 600 об/мин. Об агрегации тромбоцитов судили по увеличению светопропускания ОТП после добавления в нее индуктора агрегации, принимая исходное значение светопропускания ОТП за 0 %, а светопропускание бедной тромбоцитами плазмы за 100 %.

Исследование стабильности связи между интегрином $\alpha\text{IIb}\beta_3$ и фибриногеном в динамике агрегации тромбоцитов. Спустя 1, 3 или 5 мин после индукции агрегации в ОТП добавляли 4,5 мкмоль/л эптифибатида (препарат Integrilin; Schering-Plough, США), вытесняющего фибриноген из связи с интегрином $\alpha\text{IIb}\beta_3$ и тем самым вызывающего дезагрегацию тромбоцитов. О стабильности связи интегрин $\alpha\text{IIb}\beta_3$ с фибриногеном судили по скорости эптифибатидиндуцированной дезагрегации тромбоцитов, которую оценивали по снижению светопропускания за первые 15 с после добавления эптифибатида и выражали в %/мин (чем больше скорость дезагрегации, тем меньше стабильность связи).

Фракционирование тромбоцитов проводили по методу Fox (1985). В кюветы с ОТП добавляли равный объем двукратного лизирующего буфера, содержащего 2 % об. Тритона X-100, охлажденного до $0\ ^\circ\text{C}$. Сразу после этого кюветы погружали в лед на 30 мин. Полученный лизат центрифугировали при $10\ 000\ \text{g}$ в течение 10 мин при $4\ ^\circ\text{C}$. Супернатант удаляли, а к осадку, содержащему не растворимую в Тритоне X-100 (цитоскелетную) фракцию, добавляли двукратный буфер для образцов, содержащий 40 мг/мл додецилсульфата натрия (ДСН), и 5 % об. β -меркаптоэтанола. Содержимое пробирок перемешивали на вортексе и помещали в термоблок, нагретый до $100\ ^\circ\text{C}$. Образцы выдерживали в термоблоке, периодически перемешивая на вортексе, до полного растворения осадка.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН применяли для разделения белков цитоскелетной фракции тромбоцитов. Электрофорез проводили с помощью системы

Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, США) с использованием 4 % концентрирующего и 7,5 % разделяющего геля. Поскольку агрегация тромбоцитов сопровождается значительной реорганизацией их цитоскелета, тубулин, актин и иные белки, способные ассоциироваться со структурами цитоскелета, не могли быть использованы в качестве контрольных белков для подтверждения одинаковой загрузки белка, содержащегося в образцах цитоскелетных фракций, в лунки геля. В связи с этим особое внимание было уделено загрузке равных объемов образцов.

Вестерн-блоттинг использовали для идентификации и количественной оценки разделенных белков цитоскелетной фракции тромбоцитов. Разделенные белки переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL (Amersham Biosciences, Великобритания) с использованием трансферного буфера, содержащего 20 % об. метанола. После переноса белков мембрану инкубировали в блокирующем растворе в течение 60 мин, а затем с первичными антителами в течение 8 ч при 4 °С. После удаления не связавшихся первичных антител мембрану инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в течение 60 мин при КТ. Визуализацию связавшихся вторичных антител осуществляли с помощью реакции усиленной хемилюминесценции. Хемилюминесцентный сигнал регистрировали с помощью рентгеновской пленки и оценивали по оптической плотности полученных на пленке полос.

Экспериментальные модели геморрагических состояний:

1. Модель травматической коагулопатии *in vitro* включала гемодилюцию, гиперфибринолиз, гипотермию и/или ацидоз. *Гемодилюцию* (30, 40 или 60 %) моделировали добавлением в кровь Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (25 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 7,4), *гиперфибринолиз* — добавлением тканевого (tPA; препарат Actilyse, Boehringer Ingelheim, Германия) или урокиназного (uPA; препарат Actosolv, Eumedica Pharmaceuticals, Бельгия) активатора плазминогена; *ацидоз* (pH 7,0–7,1) — добавлением 1,2 мг/мл молочной кислоты (Sigma Aldrich, Израиль); *гипотермию* (31 °С) — путем задания соответствующей температуры термостата тромбоэластометра во время выполнения теста.

2. Модель изолированной тромбоцитопении *in vitro* создавали путем разделения цельной крови на эритроцитарную массу, ОТП, бестромбоцитарную плазму с последующим смешиванием этих компонентов в объемном соотношении $x : y : z$ соответственно, где x — отношение гематокрита цельной крови к гематокриту эритроцитарной массы, y — отношение необходимого содержания тромбоцитов в восстановленной крови к содержанию тромбоцитов в ОТП (в $л^{-1}$), z — разность единицы и суммы x и y .

3. Модель тромбастении Гланцмана *in vitro* создавали путем инкубации цельной крови с эпителин-1 (препарат Integrilin, Schering-Plough, США) в конечной концентрации 25 мкг на 1 мл плазмы в течение 20 мин при КТ.

Гемостатические препараты, использованные в работе: транексамовая кислота (ТКК; препарат Суклокарпон, Pfizer, Бельгия); концентрат фибриногена (препарат Наемосомплеттан Р, CSL Behring, Германия); концентрат фактора фон Виллебранда (VWF; препарат Наемате Р, CSL Behring, Германия); концентрат фактора XIII (FXIII; препарат Fibrogammin Р; CSL Behring, Германия); концентрат рекомбинантного активированного фактора VII (rFVIIa; препарат NovoSeven, Novo Nordisk, Дания); активированный концентрат протромбинового комплекса (АКПК; препарат FEIBA, Baxter, Австрия). В работе были также использованы: фибриноген (F4883, Sigma-Aldrich, Израиль) и активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI; P0059, Sigma-Aldrich, Израиль). В тексте концентрации всех указанных препаратов даны в пересчете на 1 мл плазмы крови.

Статистический анализ результатов выполнен с помощью программы IBM SPSS Statistics for Windows, version 23.0 (IBM Corp., США). Количественные данные представлены в виде среднего (M) \pm стандартное отклонение (SD). Для сравнения средних использовали параметрические методы анализа в соответствии с дизайном конкретного эксперимента. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

2. Нарушения гемостатического потенциала крови и его коррекция при травматической коагулопатии

Исследование относительного вклада гемодилуции, tPA-индуцированного гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушение формирования кровяного сгустка в модели травматической коагулопатии *in vitro* показало, что гемодилуция вызывала снижение αA (скорости формирования сгустка) с $71,3 \pm 2,4^\circ$ до $66,7 \pm 6,1^\circ$ ($P = 0,033$) и MCF с $64,3 \pm 3,4$ мм до $54,6 \pm 4,2$ мм ($P < 0,001$). В условиях гемодилуции: индукция фибринолиза не влияла на αA , но потенцировала снижение MCF, которая достигала $46,7 \pm 7,6$ мм ($P = 0,001$), и спустя $22,1 \pm 4,0$ мин от начала формирования сгустка вызывала его лизис (LOT); гипотермия приводила к снижению αA до $55,4 \pm 6,2^\circ$ ($P < 0,001$), не влияя при этом на MCF, а при сочетании с гиперфибринолизом — потенцировала вызванное им снижение MCF, так что она составила $38,8 \pm 8,6$ мм ($P < 0,001$), и вместе с тем отдаляла LOT до $29,8 \pm 6,6$ мин ($P < 0,001$); ацидоз не оказывал влияния на формирование и лизис сгустка (Рисунок 2.1).

При изучении возможности коррекции формирования кровяного сгустка в модели травматической коагулопатии *in vitro* с помощью комбинаций концентрата фибриногена, АКПК и ТКК при их использовании в *субэффективных* концентрациях (в которых по отдельности они не оказывают влияния на плотность кровяного сгустка) было установлено, что добавление в кровь концентрата фибриногена в комбинации с АКПК или ТКК повышало MCF с $25,8 \pm 2,3$ мм до $32,1 \pm 2,4$ мм ($P = 0,007$) и $32,0 \pm 2,6$ мм ($P = 0,015$) соответственно, а добавление АКПК

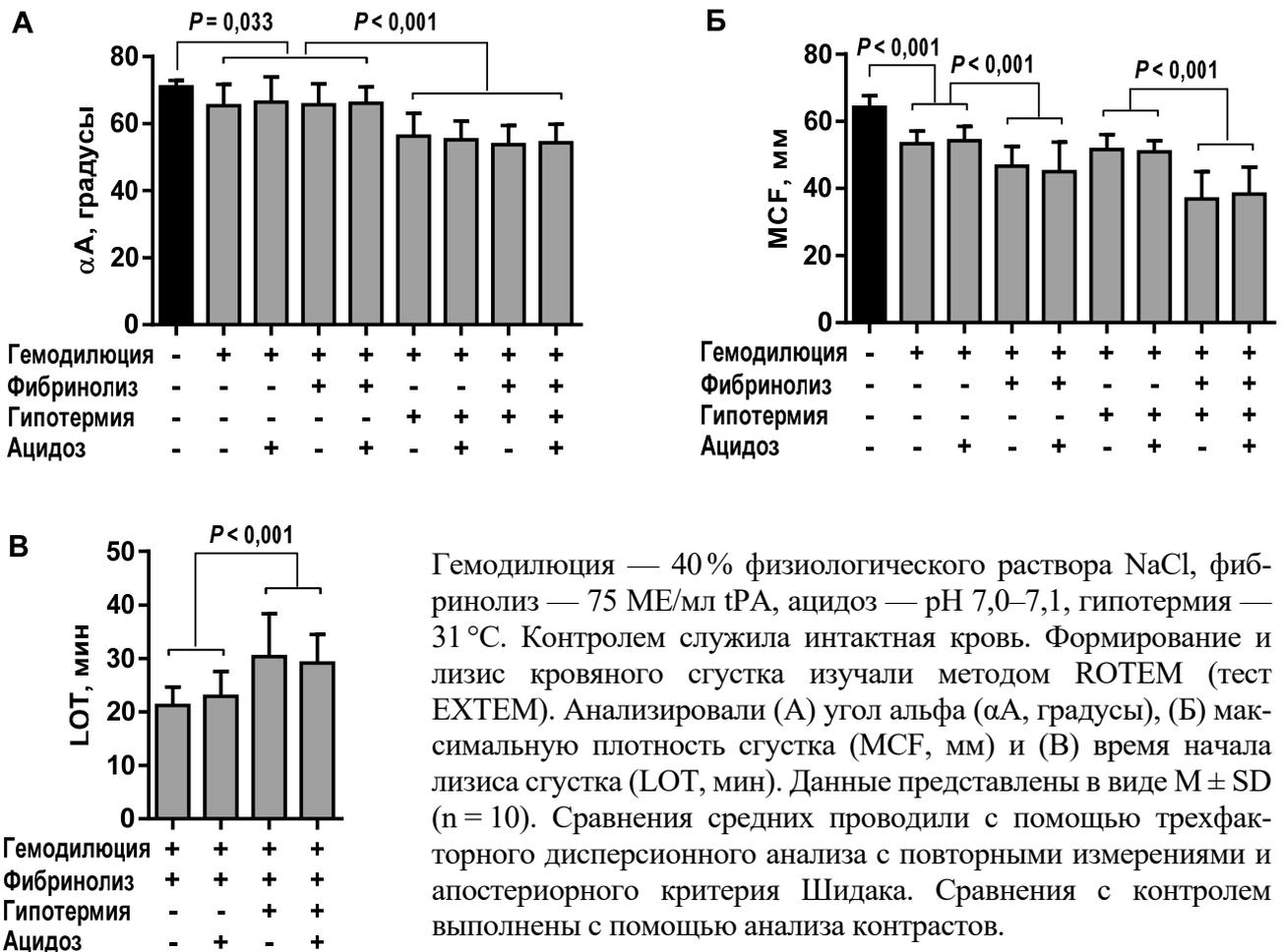
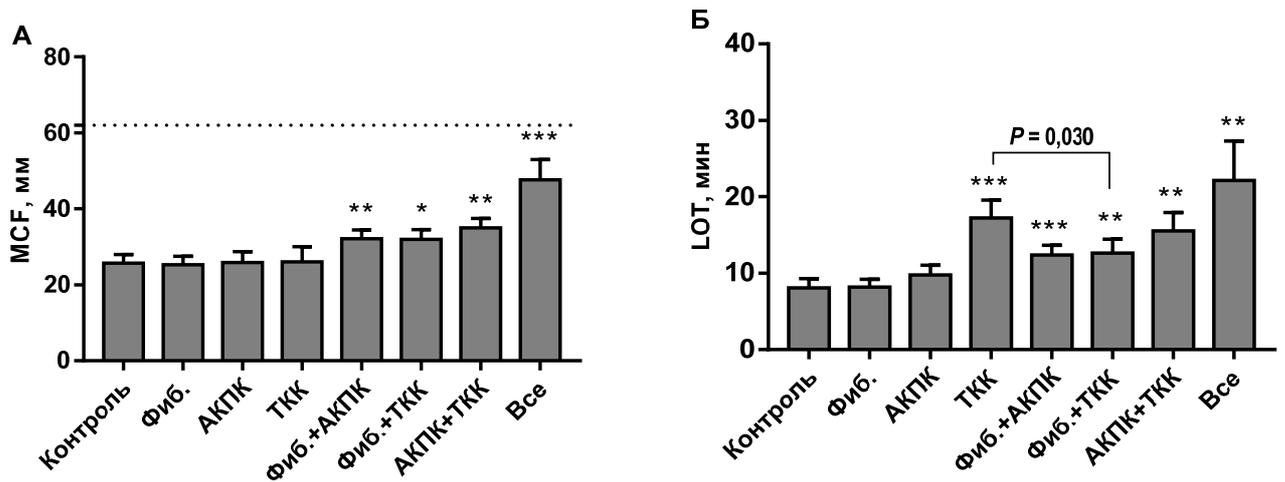


Рисунок 2.1 — Вклад гемодилюции, фибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушение формирования кровяного сгустка в модели травматической коагулопатии *in vitro*

в комбинации с ТКК — до $35,0 \pm 2,4$ ($P = 0,002$) (Рисунок 2.2, А). При одновременном применении всех трех препаратов MCF достигала $47,6 \pm 5,3$ мм, что было статистически значимо больше, чем при их использовании в двойных комбинациях ($P < 0,05$ для всех трех сравнений).

Добавление в кровь концентрата фибриногена и АКПК по отдельности не влияло на лизис сгустка, однако их одновременное добавление вызывало заметный антифибринолитический эффект, о чем свидетельствовало увеличение LOT с $8,1 \pm 1,2$ мин до $12,4 \pm 1,3$ мин ($P < 0,001$). В этих же условиях ТКК увеличивала LOT до $17,3 \pm 2,3$ мин ($P < 0,001$). Примечательно, что добавление ТКК в комбинации с концентратом фибриногена повышало LOT лишь до $12,6 \pm 1,8$ мин ($P = 0,002$), что было статистически значимо *меньше*, чем при использовании ТКК отдельно ($P = 0,030$) (Рисунок 2.2, Б). (В дополнительных экспериментах повышение концентрации фибриногена в плазме приводило к дальнейшему ослаблению антифибринолитического эффекта ТКК.) Степень угнетения лизиса сгустка при комбинированном применении АКПК и ТКК не отличалось от таковой при использовании ТКК отдельно. При одновременном использовании всех трех гемостатиков LOT возрастало до $22,2 \pm 5,1$ мин, что было статистически значимо



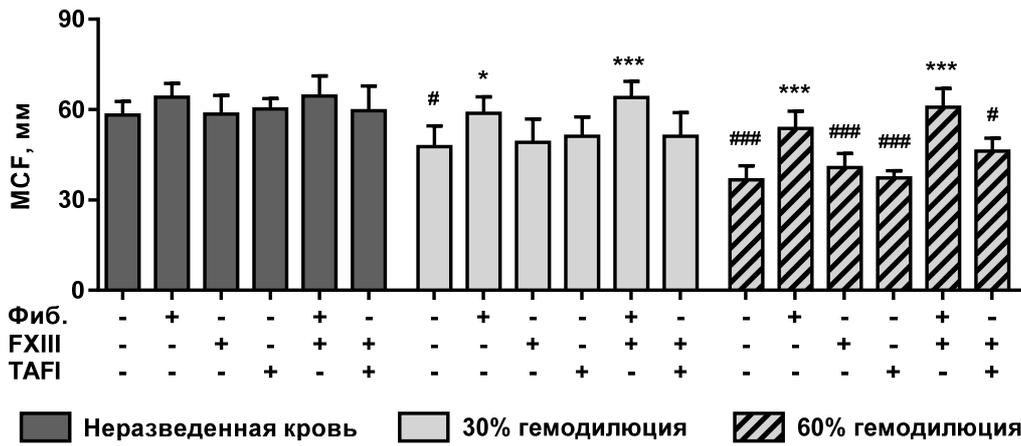
Модель травматической коагулопатии *in vitro* включала гемодилюцию (40 %), гиперфибринолиз (150 МЕ/мл tPA), ацидоз (pH 7,0–7,1) и гипотермию (31 °C). В кровь добавляли 0,375 мг/мл фибриногена (Фиб.), 0,33 ЕД/мл АКПК и/или 47,5 мкг/мл транексамовой кислоты (ТТК). В контрольные образцы добавляли PBS. Формирование и лизис кровяного сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали (А) максимальную плотность сгустка (MCF, мм) и (Б) время начала лизиса (LOT, мин). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 8$). Пунктирной линией обозначен уровень MCF в нормальной крови. Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, сравнения с контролем.

Рисунок 2.2 — Влияние фибриногена, АКПК и ТТК в субэффективных концентрациях на формирование и лизис кровяного сгустка в модели травматической коагулопатии *in vitro*

больше, чем при их использовании в любых двойных комбинациях ($P < 0,05$ для всех трех сравнений).

Далее мы изучили возможность коррекции формирования кровяного сгустка в условиях гемодилюции (как базового компонента модели травматической коагулопатии *in vitro*) в зависимости от уровня фибринолитической активности. Установлено, что в отсутствие гиперфибринолиза разведение крови на 30 % вызывало снижение MCF с $58,3 \pm 4,5$ мм до $47,8 \pm 6,8$ мм ($P = 0,044$). В этих условиях добавление в кровь концентрата фибриногена повышало MCF до $58,8 \pm 5,5$ мм ($P = 0,026$), что не отличалось от ее значения в контроле для неразведенной крови (Рисунок 2.3). Добавление концентрата FXIII и TAFI как по отдельности, так и одновременно не оказывало влияния на MCF. Комбинированное применение концентратов фибриногена и FXIII вызывало такой же эффект, как и применение концентрата фибриногена отдельно. Аналогичные эффекты наблюдались и при 60 % гемодилюции. Таким образом, в условиях гемодилюции и отсутствии гиперфибринолиза для коррекции формирования кровяного сгустка было достаточно применить концентрат фибриногена.

В условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза и 30 % гемодилюции MCF снижалась до $20,1 \pm 12,0$ мм и спустя $9,9 \pm 7,5$ мин от начала формирования сгустка начинался его лизис. Добавление концентратов фибриногена, FXIII или TAFI вызывало увеличение MCF до $42,6 \pm 6,2$ мм, $36,5 \pm 10,3$ мм и $43,6 \pm 11,4$ мм соответственно ($P < 0,001$ для каждого сравнения),

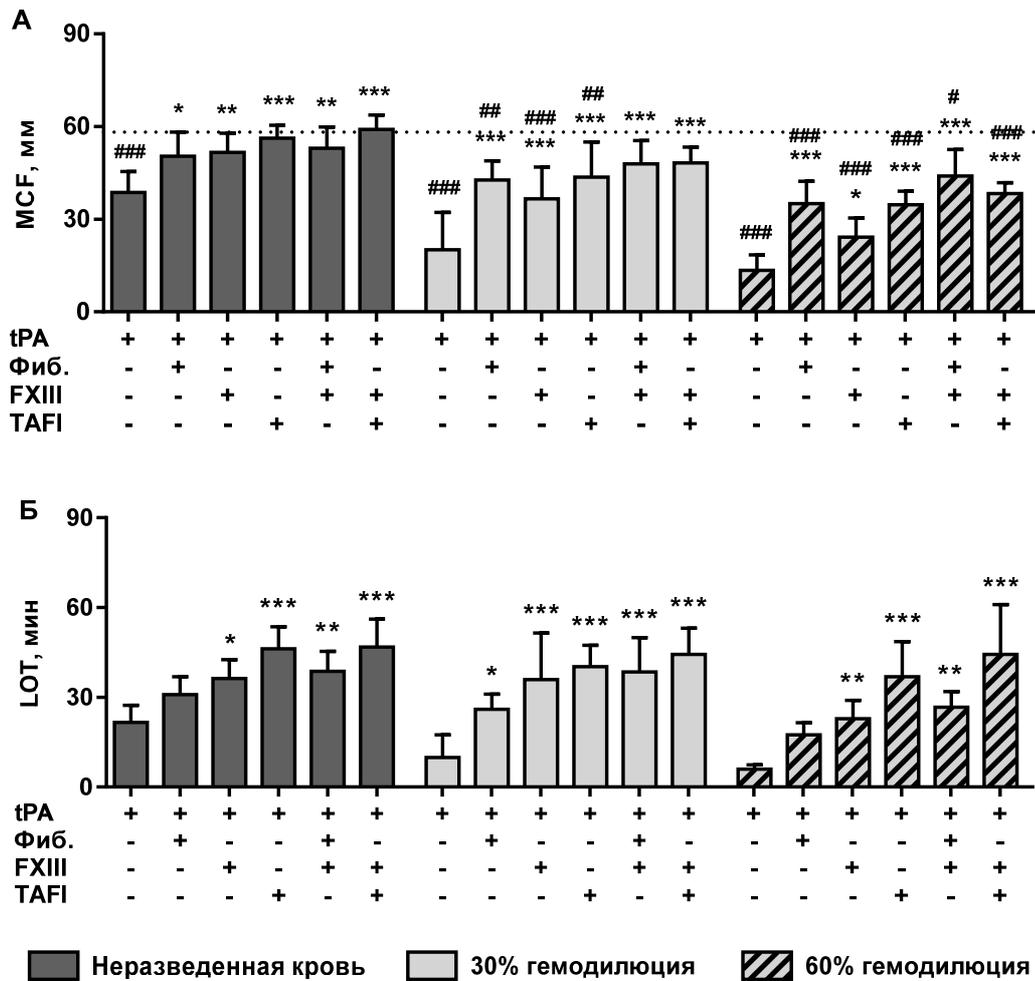


В кровь, разведенную Трис-буферизированным 0,9 % раствором NaCl (pH 7,4), добавляли 3 мг/мл фибриногена (Фиб.), 2 МЕ/мл FXIII и/или 2 ЕД/мл TAFI. В контрольные образцы добавляли PBS. Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA. Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали максимальную плотность сгустка (MCF, мм). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ — сравнение с соответствующим контролем; # $P < 0,05$, ### $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ — сравнение с контролем для неразведенной крови.

Рисунок 2.3 — Влияние концентратов фибриногена, FXIII и TAFI на формирование кровяного сгустка при гемодилюции *in vitro*

при этом все указанные значения MCF оставались ниже, чем в контроле для неразведенной крови при отсутствии гиперфибринолиза ($P = 0,003$, $P < 0,001$ и $P = 0,003$ соответственно) (Рисунок 2.4, А). Применение этих препаратов сопровождалось также отдалением LOT до $26,0 \pm 5,0$ мин ($P = 0,015$), $35,9 \pm 15,5$ мин ($P < 0,001$) и $40,2 \pm 7,1$ мин ($P < 0,001$) соответственно (Рисунок 2.4, Б). В этих же условиях добавление в кровь концентрата FXIII в комбинации с концентратом фибриногена или TAFI вызывало наибольшую коррекцию MCF, так что значение этого показателя не отличалось от его значения в контроле для неразведенной крови при отсутствии гиперфибринолиза; однако коррекция MCF не сопровождалась дополнительным увеличением LOT. Таким образом, в условиях гиперфибринолиза и 30 % гемодилюции для максимальной одновременной коррекции формирования и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка необходимо было комбинированное применение концентратов фибриногена и FXIII или концентрата фибриногена и TAFI. Аналогичная закономерность в действии указанных гемостатиков прослеживалась и при tPA-индуцированном гиперфибринолизе в условиях 60 % гемодилюции.

Ключевую роль в развитии гиперфибринолиза у пациентов с тяжелой травмой играет высвобождение tPA из активированных эндотелиальных клеток. Однако недавно было показано, что спустя три часа после травмы имеет место также повышение уровня uPA, который вносит существенный вклад в нарушение гемостатического потенциала крови (Hijazi et al., 2015). Несмотря на то что tPA и uPA выполняют одну и ту же основную каталитическую функцию

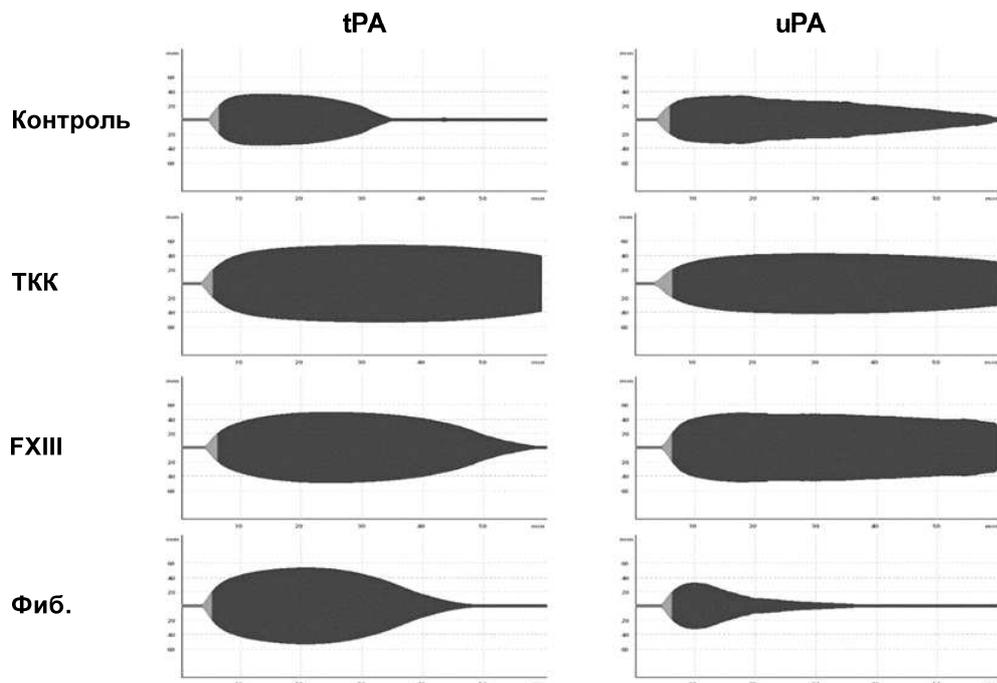


В кровь, разведенную Трис-буферизированным 0,9 % раствором NaCl (рН 7,4), добавляли 3 мг/мл фибриногена (Фиб.), 2 МЕ/мл FXIII и/или 2 ЕД/мл TAFI. В контрольные образцы добавляли PBS. Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA. Формирование и лизис кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали (А) максимальную плотность сгустка (MCF, мм) и (Б) время начала лизиса (LOT, мин). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ — сравнение с соответствующим контролем; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ — сравнение с контролем для неразведенной крови, не содержащей tPA (уровень обозначен пунктирной линией).

Рисунок 2.4 — Влияние концентратов фибриногена, FXIII и TAFI на формирование и лизис кровяного сгустка при гемодилюции и гиперфибринолизе *in vitro*

(превращение пламиногена в пламин), их молекулярная структура и механизм действия отличаются, что может отразиться на эффективности применения гемостатических препаратов. В связи с этим мы провели сравнительный анализ возможности коррекции формирования и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка в условиях гиперфибринолиза, индуцированного tPA или uPA.

Исследования показали, что добавление в кровь tPA или uPA в полумаксимальных эффективных концентрациях приводило к снижению MCF с $60,0 \pm 2,2$ мм до $42,2 \pm 5,9$ мм и



В цельную кровь добавляли 10 мкг/мл ТКК, 2 МЕ/мл FXIII или 3 мг/мл фибриногена. В контрольные образцы добавляли PBS. Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA или 33 МЕ/мл uPA. Формирование и лизис сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Представлены репрезентативные тэмограммы одного из десяти независимых экспериментов.

Рисунок 2.5 — Влияние ТКК, концентрата FXIII и концентрата фибриногена на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза *in vitro*

$36,5 \pm 6,8$ мм соответственно ($P < 0,001$ для обоих сравнений) и вызывало лизис сгустка, время начала которого (LOT) составило $23,7 \pm 4,1$ мин и $18,5 \pm 5,8$ мин соответственно (Рисунок 2.5).

Добавление в кровь ТКК в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза вызывало увеличение MCF до $54,9 \pm 6,2$ мм ($P = 0,002$) и $45,1 \pm 5,9$ мм ($P = 0,084$) соответственно и отдаление LOT до $50,5 \pm 7,7$ мин и $53,1 \pm 6,5$ мин ($P < 0,001$ для обоих сравнений) соответственно. Следовательно, применение ТКК обеспечивало увеличение плотности и фибринолитической устойчивости сгустка вне зависимости от вида действующего активатора плазминогена.

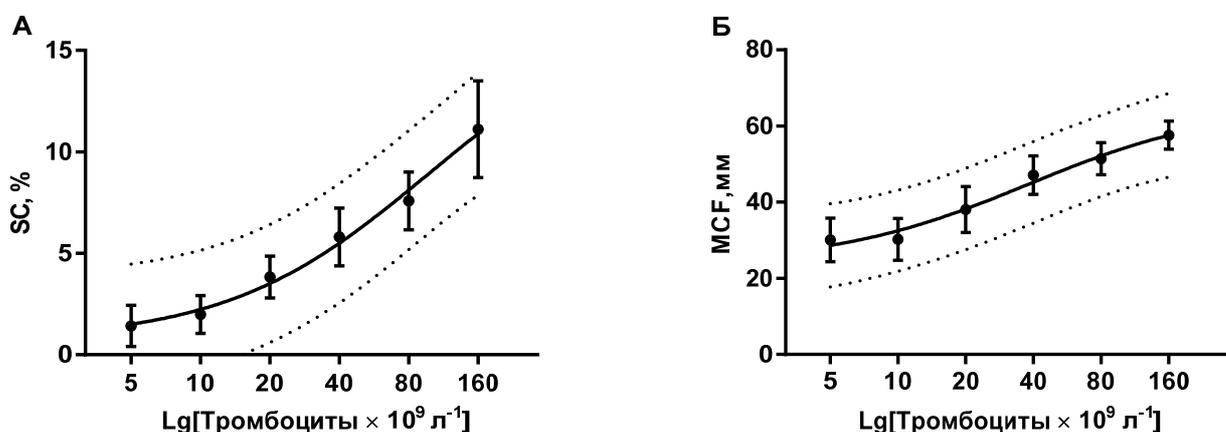
Концентрат FXIII в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза вызывал увеличение MCF до $53,3 \pm 6,6$ мм ($P = 0,042$) и $49,5 \pm 5,5$ мм ($P = 0,002$) и отдаление LOT до $39,4 \pm 5,2$ мин и $43,5 \pm 6,2$ ($P < 0,001$ для обоих сравнений) соответственно. Иными словами, добавление в кровь концентрата FXIII способствовало увеличению плотности и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка как в условиях tPA-, так и в условиях uPA-индуцированного гиперфибринолиза.

Добавление в кровь концентрата фибриногена в условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза приводило к увеличению MCF до $57,2 \pm 4,7$ мм ($P < 0,001$) и LOT до $29,4 \pm 4,5$ мин ($P = 0,096$), что свидетельствовало о повышении плотности и фибринолитической устойчивости

кровенного сгустка. Напротив, добавление этого препарата в присутствии uPA не оказывало заметного влияния на MCF и приводило к еще большему сокращению LOT, которое составило $11,0 \pm 2,5$ мин ($P = 0,017$) (Рисунок 2.5), т. е. вызывало противоположный, профибринолитический эффект. Разнонаправленное действие концентрата фибриногена в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза обнаруживалось не только при использовании теста EXTEM (как в описанном выше эксперименте), но и в тестах NATEM и INTEM. Более того, оно воспроизводилось при использовании фибриногена разных производителей и наблюдалось не только в цельной крови, но и в ОТП и плазме без клеточных микрочастиц.

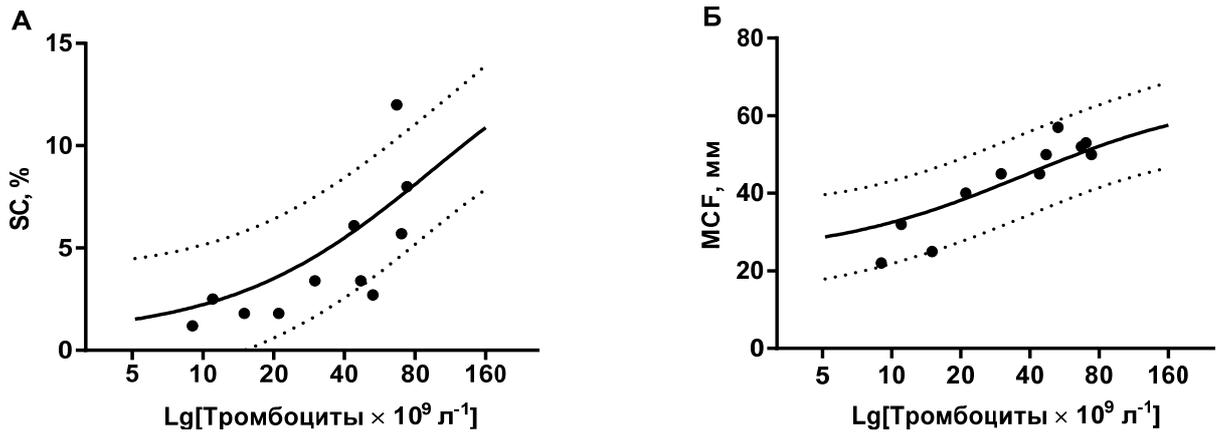
3. Нарушения гемостатического потенциала крови и его коррекция при тромбоцитопении

Для разработки критериев оценки функциональной активности тромбоцитов в условиях тромбоцитопении мы изучили адгезию и агрегацию тромбоцитов при высокой скорости сдвига, а также формирование кровяного сгустка в модели изолированной тромбоцитопении *in vitro* со средним содержанием тромбоцитов в крови от 5×10^9 до 160×10^9 л⁻¹ и на основе полученных данных для каждого изученного показателя построили кривую наилучшего приближения, отражающую зависимость показателя от содержания тромбоцитов, и установили границы 95 % предсказательного интервала (Рисунок 3.1). Поскольку для создания модели тромбоцитопении была использована кровь здоровых добровольцев, предсказательные интервалы охватывали 95 %



Исследование выполнено на модели изолированной тромбоцитопении *in vitro* (содержание тромбоцитов указано на рисунке). **А.** Адгезию и агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью анализатора Impact-R при скорости сдвига 1800 с⁻¹ и оценивали по площади покрытия ячейки (SC, %). **Б.** Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM) и оценивали по максимальной плотности сгустка (MCF, мм). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 10$). На основе полученных данных методом нелинейного регрессионного анализа строили кривую наилучшего приближения (сплошная линия) и находили соответствующий 95 % предсказательный интервал (ограничен пунктирными линиями).

Рисунок 3.1 — Кривые наилучшего приближения и 95 % предсказательные интервалы для показателей адгезии и агрегации тромбоцитов и формирования кровяного сгустка в модели изолированной тромбоцитопении *in vitro*



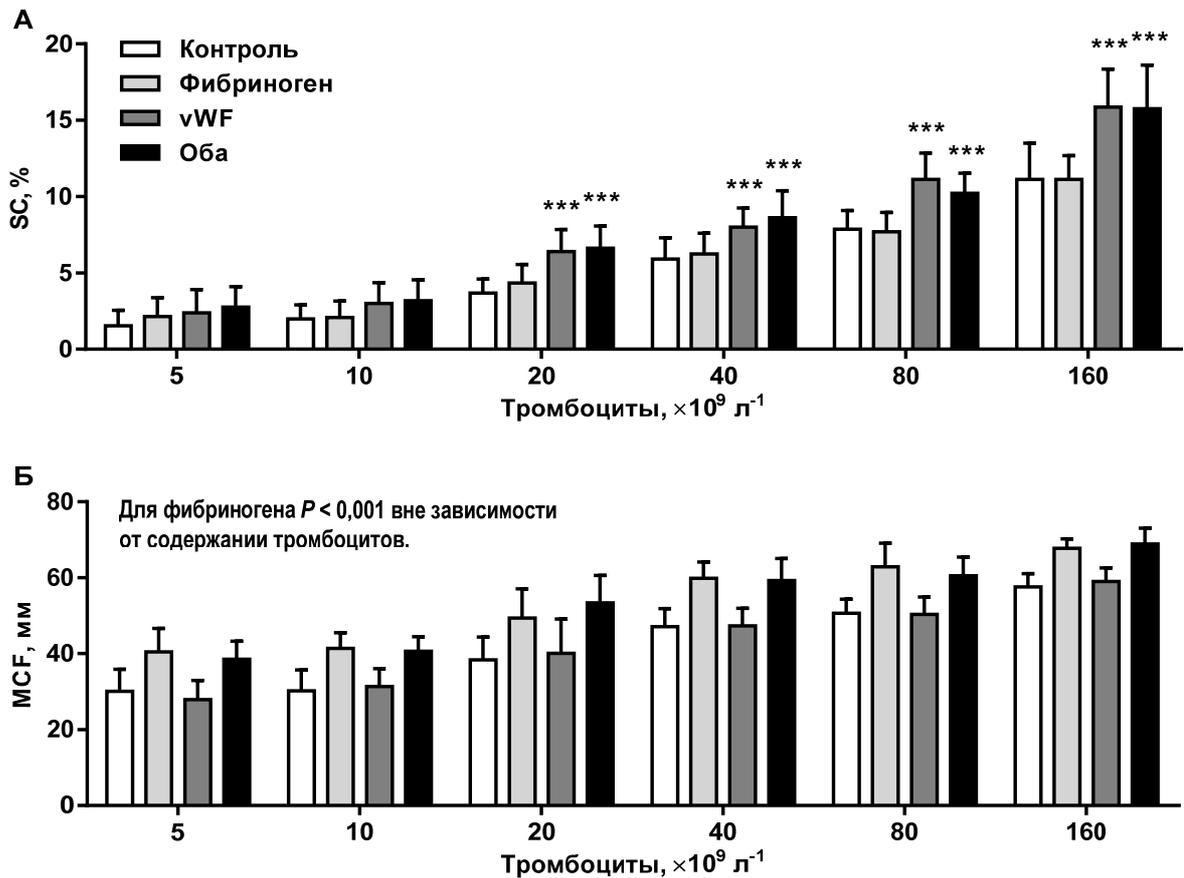
Исследовали кровь 12 пациентов с первичной ИТП. А. Адгезию и агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью анализатора Impact-R при скорости сдвига 1800 с^{-1} и оценивали по площади покрытия ячейки (SC, %). Б. Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM) и оценивали по максимальной плотности сгустка (MCF, мм). Результаты каждого измерения обозначены точкой. Кривая наилучшего приближения (сплошная линия) и 95% предсказательный интервал (ограничен пунктирными линиями) определены в модели изолированной тромбоцитопении *in vitro* (см. Рисунок 3.1).

Рисунок 3.2 — Оценка адгезии и агрегации тромбоцитов и формирования кровяного сгустка у пациентов с первичной ИТП

значений, характерных для определенного содержания в крови функционально полноценных тромбоцитов. Следовательно, выпадение значения за границы этих интервалов означало бы нарушение соответствующей функции тромбоцитов.

Найденные предсказательные интервалы были использованы в качестве критериев оценки функциональной активности тромбоцитов у 12 пациентов с первичной ИТП, у которых содержание тромбоцитов в крови составило от 2×10^9 до $74 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$. Исследование адгезии и агрегации тромбоцитов при высокой скорости сдвига и формирования кровяного сгустка у этих пациентов показало, что значения показателей SC и MCF хотя и уменьшались по мере снижения содержания тромбоцитов в крови ($r = 0,81$, $P = 0,015$ и $r = 0,89$, $P < 0,001$ соответственно), но оставались в пределах соответствующего предсказательного интервала в подавляющем большинстве случаев (Рисунок 3.2). Эти данные свидетельствуют о том, что снижение гемостатического потенциала крови у обследованных пациентов, выразившееся в снижении вышеуказанных показателей, было обусловлено уменьшением содержания тромбоцитов в крови при сохранении у них нормальной функциональной активности.

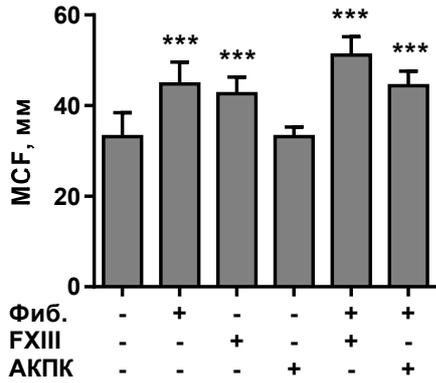
При исследовании возможности усиления адгезии и агрегации тромбоцитов при высокой скорости сдвига в модели изолированной тромбоцитопении *in vitro* было установлено, что при содержании тромбоцитов 5×10^9 и $10 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ концентрат VWF не оказывал влияния на SC, но увеличивал значение этого показателя при содержании тромбоцитов в диапазоне от 20×10^9 до $160 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ ($P < 0,001$, сравнение с контролем для каждого содержания тромбоцитов), тогда как



В кровь с указанным на рисунке содержанием тромбоцитов добавляли 3 мг/мл фибриногена и/или 2 МЕ/мл VWF. В контрольные образцы добавляли PBS. **А.** Адгезию и агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью анализатора Impact-R при скорости сдвига 1800 с^{-1} , оценивали площадь покрытия ячейки (SC, %). **Б.** Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM), оценивали максимальную плотность сгустка (MCF, мм). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 10$). Сравнения средних проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями. Для показателя SC обнаружен статистически значимый эффект взаимодействия между видом добавленного препарата и содержанием тромбоцитов ($P < 0,001$), поэтому апостериорные сравнения средних проводили отдельно для каждого содержания тромбоцитов, используя при этом критерий Шидака: $***P < 0,001$, сравнение с соответствующим контролем. Для показателя MCF эффект взаимодействия не был статистически значимым, поэтому сравнивали только главные эффекты вышеуказанных факторов, используя при этом критерия Шидака.

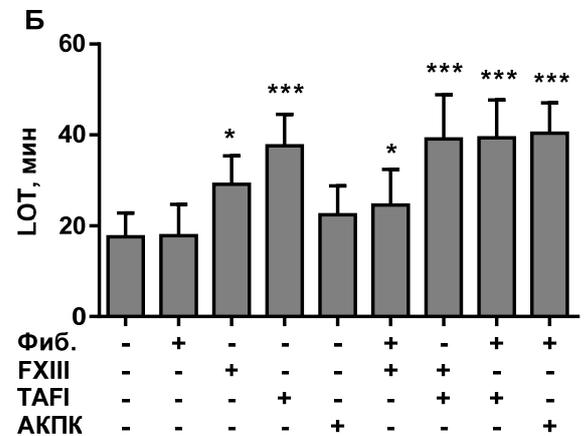
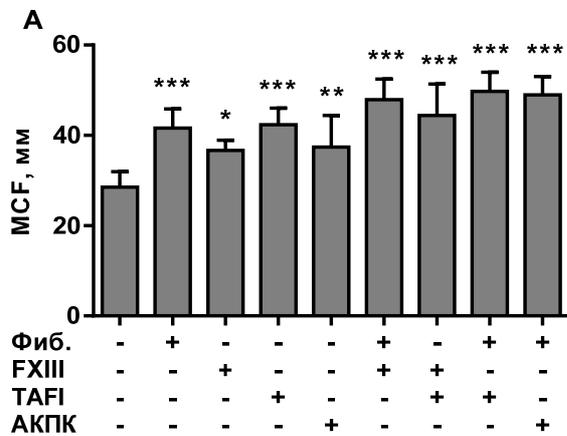
Рисунок 3.3 — Влияние концентратов фибриногена и VWF на адгезию и агрегацию тромбоцитов и формирование кровяного сгустка в модели изолированной тромбоцитопении *in vitro*

концентрат фибриногена не оказывал влияния на SC и не модифицировал эффект концентрата VWF при их одновременном применении (Рисунок 3.3, А). При исследовании возможности коррекции формирования кровяного сгустка в этой же модели оказалось, что концентрат фибриногена вызывал увеличение MCF в среднем на 11,3 мм ($P < 0,001$), причем этот эффект не зависел от содержания тромбоцитов в крови, а концентрат VWF не оказывал влияния на этот показатель и не модифицировал эффект концентрата фибриногена при их комбинированном применении (Рисунок 3.3, Б).



В кровь с содержанием тромбоцитов $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ добавляли 3 мг/мл фибриногена (Фиб.), 2 МЕ/мл FXIII и/или 2 ЕД/мл АКПК. В контрольные образцы добавляли PBS. Формирование кровяного сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали максимальную плотность сгустка (MCF, мм). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака: *** $P < 0,001$, сравнения с контролем.

Рисунок 3.4 — Влияние концентратов фибриногена, FXIII и АКПК на формирование кровяного сгустка в модели тяжелой изолированной тромбоцитопении *in vitro*



В кровь с содержанием тромбоцитов $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ добавляли 3 мг/мл фибриногена (Фиб.), 2 МЕ/мл FXIII, 2 ЕД/мл АКПК и/или 0,25 ЕД/мл TAFI. В контрольные образцы добавляли PBS. Фибринолиз индуцировали добавлением 150 МЕ/мл tPA. Формирование и лизис кровяного сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали (А) максимальную плотность сгустка (MCF, мм) и (Б) время начала лизиса (LOT, мин). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, сравнения с контролем.

Рисунок 3.5 — Влияние концентратов фибриногена, FXIII, АКПК и TAFI на формирование и лизис кровяного сгустка в модели тяжелой изолированной тромбоцитопении и гиперфибринолиза *in vitro*

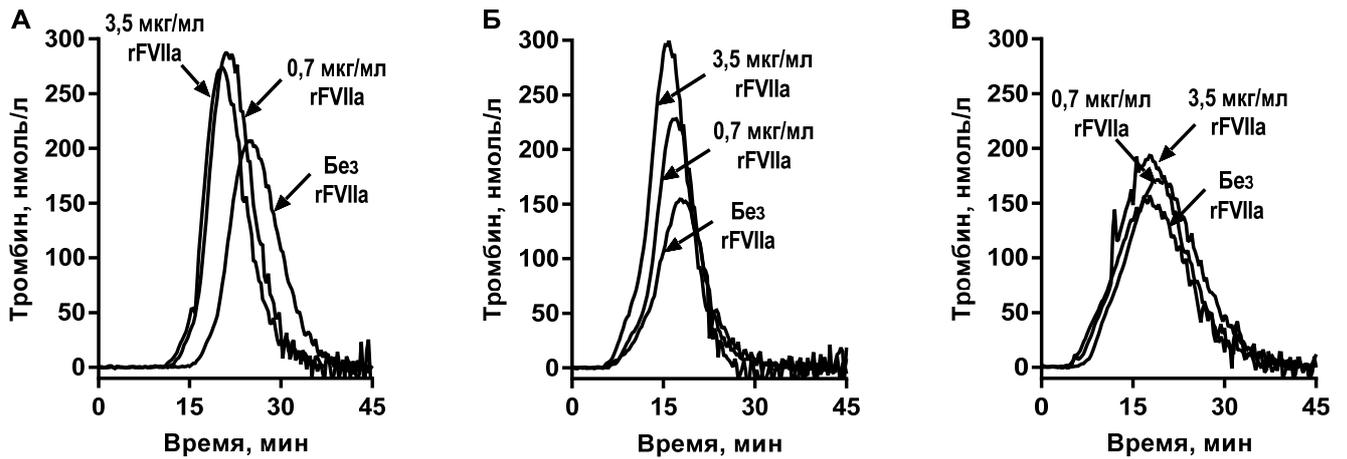
Дальнейшее исследование возможности коррекции формирования кровяного сгустка в модели тяжелой изолированной тромбоцитопении *in vitro* (среднее содержание тромбоцитов $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$) показало, что добавление в кровь концентратов фибриногена или FXIII повышало значение MCF с $33,1 \pm 5,3$ мм до $44,8 \pm 4,9$ мм ($P < 0,001$) и $42,6 \pm 3,7$ мм ($P < 0,001$) соответственно, а их одновременное применение увеличивало MCF до $51,1 \pm 4,1$ мм, что было статистически значимо больше, чем при использовании этих препаратов по отдельности ($P = 0,024$ и

$P < 0,001$ соответственно) (Рисунок 3.4). Добавление АКПК не оказывало влияния на MCF и не модифицировало эффект концентрата фибриногена при их одновременном применении.

При сочетании *тяжелой* изолированной тромбоцитопении *in vitro* с tPA-индуцированным гиперфибринолизом MCF снижалась до $28,5 \pm 3,4$ мм и наблюдался лизис сгустка, время начала которого (LOT) составляло $17,6 \pm 5,2$ мин. В этих условиях добавление в кровь фибриногена или АКПК вызывало увеличение MCF соответственно до $41,6 \pm 4,2$ мм ($P < 0,001$) и $37,4 \pm 7,0$ мм ($P = 0,006$), не оказывая влияния на LOT. В отличие от этого добавление FXIII или TAFI вызывало увеличение обоих показателей: MCF возрастал до $36,6 \pm 2,3$ мм ($P = 0,017$) и $42,4 \pm 3,7$ мм ($P < 0,001$), LOT — до $29,1 \pm 6,2$ мин ($P = 0,034$) и $37,6 \pm 6,9$ мин ($P < 0,001$) соответственно, т. е. увеличение плотности сгустка сопровождалось угнетением его лизиса (Рисунок 3.5). Комбинированное применение фибриногена и АКПК обеспечивало дополнительное увеличение MCF, которая составила $49,0 \pm 4,1$ мм ($P = 0,044$, сравнение с фибриногеном), и замедляло лизис сгустка, так что LOT было близко к его значению при использовании TAFI. При одновременном добавлении в кровь фибриногена и TAFI также отмечалось дополнительное увеличение MCF, которая составила $49,8 \pm 4,2$ мм и статистически значимо превышала ее значение при их использовании по отдельности ($P = 0,017$ и $P = 0,044$ соответственно), однако LOT при этом не отличалось от его значения при использовании TAFI отдельно. Комбинированное применение фибриногена и FXIII или FXIII и TAFI не вызывало дополнительной коррекции ни одного из этих показателей. Таким образом, при сочетании *тяжелой* изолированной тромбоцитопении с tPA-индуцированным гиперфибринолизом одновременная максимальная коррекция плотности и фибринолитической устойчивости сгустка обеспечивалась применением концентрата фибриногена в комбинации с АКПК или TAFI.

4. Нарушения гемостатического потенциала крови и его коррекция при тромбастении Гланцмана

У пациентов с ТГ, по сравнению со здоровыми добровольцами, отмечалось снижение генерации тромбина, что выражалось в увеличении времени инициации на 40 % ($P < 0,001$) и снижении ПКТ и ЭТП на 26 % ($P = 0,003$) и 27 % ($P < 0,001$) соответственно. Добавление в ОТП rFVIIa в концентрациях 0,7–7,0 мкг/мл вызывало коррекцию генерации тромбина, однако степень этой коррекции существенно варьировала. Так, у 4/24 (17 %) пациентов добавление rFVIIa в наименьшей из указанных концентраций вызывало максимальную коррекцию генерации тромбин («сильный» ответ), у 14/24 (58 %) пациентов степень коррекции была пропорциональна концентрации rFVIIa («средний» ответ) и у 6/24 (25 %) пациентов добавление rFVIIa даже в высокой концентрации не приводило к значимой коррекции генерации тромбина («слабый» ответ) (Рисунок 4.1).



В ОТП, полученную из крови пациентов с ТГ, добавляли rFVIIa в концентрациях, указанных на рисунке. Генерацию тромбина индуцировали путем рекальцификации ОТП. Приведены репрезентативные тромбограммы, отражающие различные типы ответа на добавление rFVIIa. А — «сильный» ответ; Б — «средний» ответ; В — «слабый» ответ.

Рисунок 4.1 — Типы ответа на добавление rFVIIa в ОТП пациентов с тромбастенией Гланцмана

Из анамнеза пациентов с ТГ было известно, что у 15/24 (63 %) в основе данной патологии лежала мутация IJ1 и у 8/24 (33 %) — мутация Aгаb. Проведенный анализ показал, что степень коррекции изученных показателей генерации тромбина при добавлении rFVIIa в ОТП не зависела от того, какая из указанных мутаций имела место у пациентов.

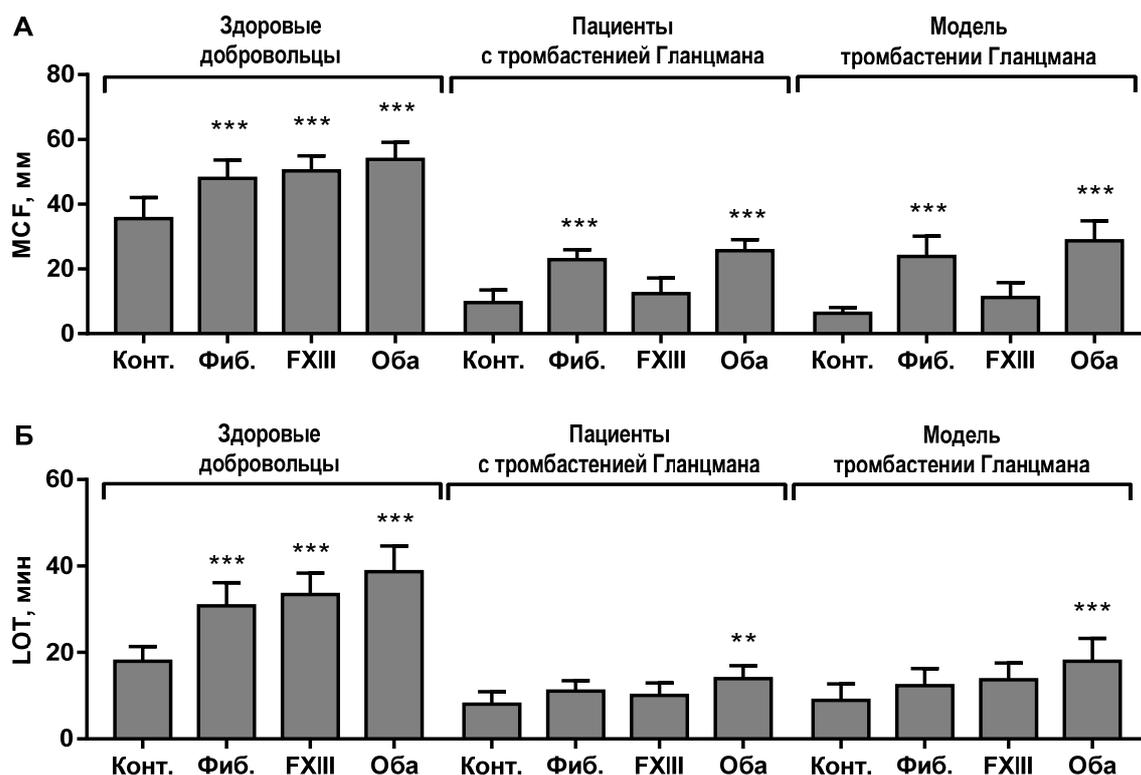
При исследовании возможности коррекции формирования кровяного сгустка при ТГ было установлено, что добавление в кровь пациентов концентрата фибриногена повышало MCF с $15,0 \pm 6,2$ мм до $28,8 \pm 5,0$ мм ($P < 0,001$), а добавление концентрата FXIII не оказало влияния на MCF и не модифицировало эффект концентрата фибриногена при их одновременном применении (Рисунок 4.2). Спонтанный лизис сгустка при ТГ не наблюдался.

В условиях гиперфибринолиза, индуцированного добавлением tPA в кровь, полученную от пациентов с ТГ, MCF снижалась до $9,6 \pm 3,9$ мм. При этом добавление в кровь концентрата фибриногена повышало MCF до $22,9 \pm 3,0$ мм ($P < 0,001$), а добавление концентрата FXIII не оказывало влияния на данный параметр и не модифицировало эффект концентрата фибриногена при их одновременном применении. Индукция фибринолиза вызывала лизис сгустка, время начала которого (LOT) составляло $8,1 \pm 2,9$ мин. При добавлении в кровь концентратов фибриногена и FXIII по отдельности LOT статистически значимо не отличалось от исходного уровня, однако при одновременном добавлении этих препаратов отмечалось увеличение этого показателя до $13,9 \pm 3,1$ мин ($P = 0,002$) (Рисунок 4.3). Аналогичные результаты были получены и в модели ТГ.



В кровь добавляли 3 г/л фибриногена (Фиб.), 2 МЕ/мл FXIII или оба препарата одновременно. В контрольные образцы (Конт.) добавляли такой же объем PBS (pH 7,4). Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали максимальную плотность сгустка (MCF, мм) Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ — сравнение с соответствующим контролем.

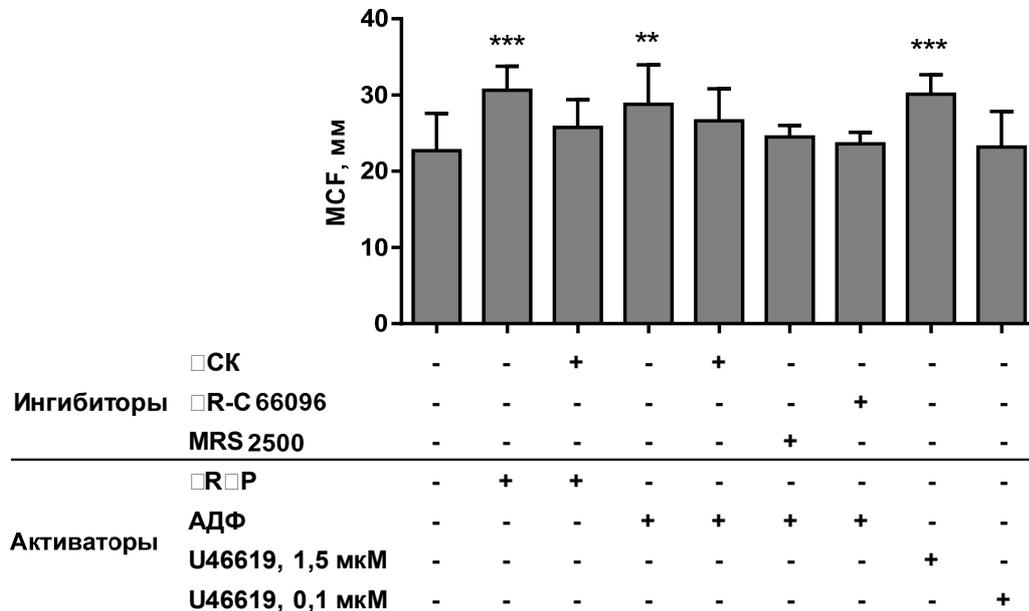
Рисунок 4.2 — Влияние фибриногена и FXIII на формирование и лизис кровяного сгустка у здоровых добровольцев и при тромбастении Гланцмана в условиях гиперфибринолиза



В кровь добавляли 3 г/л фибриногена (Фиб.), 2 МЕ/мл FXIII или оба препарата одновременно. В контрольные образцы (Конт.) добавляли такой же объем PBS (pH 7,4). Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA. Формирование и лизис кровяного сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали (А) максимальную плотность сгустка (MCF, мм) и (Б) время начала лизиса (LOT, мин). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ — сравнение с соответствующим контролем.

Рисунок 4.3 — Влияние фибриногена и FXIII на формирование и лизис кровяного сгустка у здоровых добровольцев и при тромбастении Гланцмана в условиях гиперфибринолиза

При исследовании возможности коррекции плотности кровяного сгустка в модели ТГ с путем стимуляции тромбоцитарных рецепторов, сопряженных с G-белком, было установлено, что сочетанная стимуляция рецепторов PAR-1 и PAR-4 с помощью TRAP, равно как и рецепторов P2Y₁ и P2Y₁₂ с помощью АДФ вызывала увеличение MCF с $22,7 \pm 4,9$ мм до $30,6 \pm 3,2$ мм ($P < 0,001$) и $28,8 \pm 5,1$ мм ($P = 0,005$) соответственно (Рисунок 4.4). Преинкубация с ацетилсалициловой кислотой (АСК) полностью отменяла стимулирующий эффект TRAP и АДФ, тогда как стимуляция тромбоцитов через рецепторы TP с помощью 1,5 мкмоль/л U46619 (стабильного аналога тромбоксана A₂) вызывала такое же увеличение MCF, что и стимуляция тромбоцитов с помощью TRAP или АДФ.



Кровь, полученную от здоровых добровольцев, инкубированной с 25 мкг/мл эптифибатидом (для создания модели ТГ), а затем — с 10 мкмоль/л MRS2500, 10 мкмоль/л AR-C66096 и/или 0,5 ммоль/л ацетилсалициловой кислоты (АСК). Далее в кровь добавляли активаторы тромбоцитов: 50 мкмоль/л TRAP, 1,25 мкмоль/л АДФ, 0,1 или 1,5 мкмоль/л U46619, — и начинали регистрацию формирования кровяного сгустка (тест NATEM). Оценивали максимальную плотность сгустка (MCF, мм). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 10$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака. $**P < 0,01$, $***P < 0,001$ — сравнение с образцами, не содержащими указанных активаторов тромбоцитов.

Рисунок 4.4 — Коррекция плотности кровяного сгустка в модели тромбастении Гланцмана *in vitro* путем стимуляции тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с G-белком

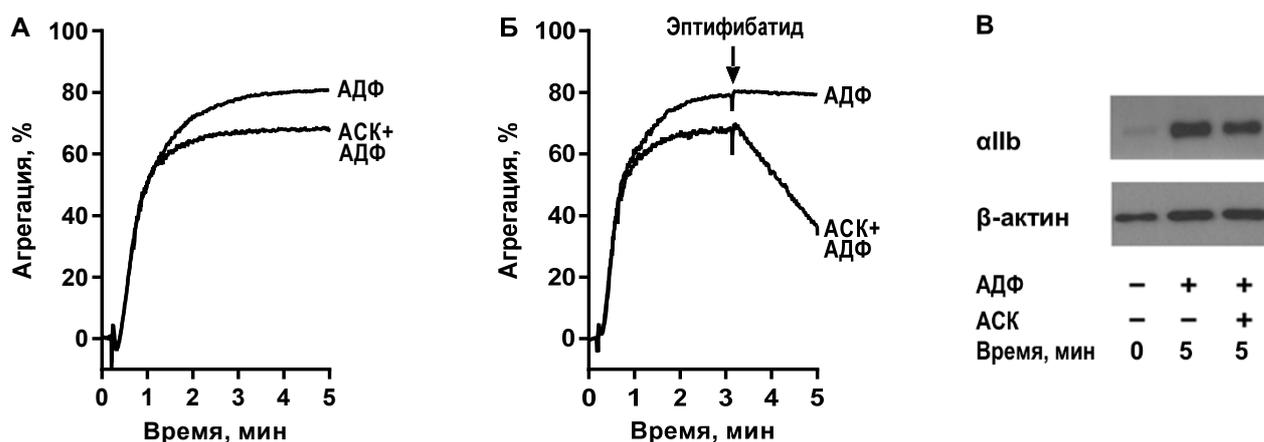
5. Влияние ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов P2Y₁ и P2Y₁₂ на формирование комплекса «фибриноген–интегрин αIIbβ₃–цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов

Ацетилсалициловая кислота (АСК). В контроле АДФ вызывал устойчивую агрегацию тромбоцитов, которая составила $84,7 \pm 6,1$ %. В образцах, проинкубированных с АСК, отмечалась менее выраженная агрегация, составившая $69,0 \pm 5,8$ % ($P < 0,001$) (Рисунок 5.1, А). Добавление в ОТП эптифибатида спустя 3 мин после индукции агрегации в контроле не вызывало дезагрегации, а в образцах, проинкубированных с АСК, вызывало дезагрегацию тромбоцитов со скоростью $21,6 \pm 4,9$ %/мин, что свидетельствовало о пониженной прочности связи между интегринными αIIbβ₃ и фибриногеном (Рисунок 5.1, Б).

Анализ цитоскелетных фракций показал, что максимальное количество β-актина и αIIb содержалось в цитоскелете контрольных агрегировавших тромбоцитов (принято за 100 %). Цитоскелет покоящихся тромбоцитов содержал $68,4 \pm 6,6$ % β-актина и следы αIIb. Цитоскелет агрегировавших тромбоцитов, обработанных АСК, содержал близкое к 100 % количество β-актина и $61,5 \pm 12,2$ % αIIb, что было статистически значимо меньше по сравнению с содержанием αIIb в контрольных агрегировавших тромбоцитах ($P = 0,002$) (Рисунок 5.1, В).

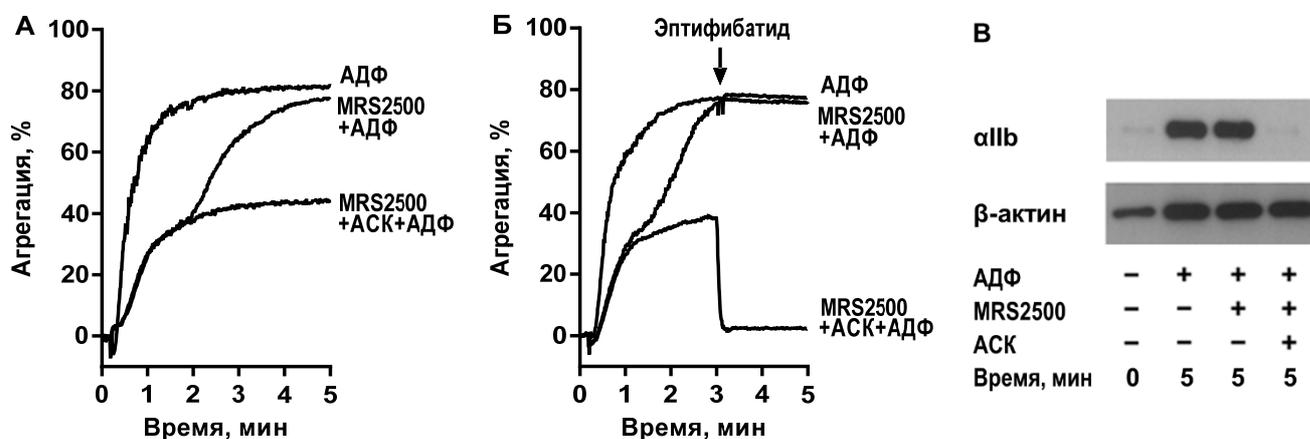
Антагонист рецептора P2Y₁. В образцах ОТП, проинкубированных с MRS2500 (антагонист рецептора P2Y₁), АДФ вызывал двухволновую агрегацию тромбоцитов. Первая волна продолжалась $1,6 \pm 0,2$ мин и достигала амплитуды $37,4 \pm 5,6$ %, затем начиналась вторая волна, так что максимальная амплитуда агрегации составила $79,4 \pm 8,2$ %, что статистически значимо не отличалось от ее значения в контроле. Дополнительная преинкубация ОТП с АСК вызывала отмену второй волны агрегации, в результате чего максимальная амплитуда составила $41,4 \pm 7,6$ % ($P < 0,001$, сравнение с контролем) (Рисунок 5.2, А). Добавление эптифибатида спустя 3 мин после индукции агрегации тромбоцитов в контрольных образцах и в образцах, проинкубированных с MRS2500, не отражалось на динамике агрегации тромбоцитов, тогда как в образцах, проинкубированных одновременно с MRS2500 и АСК, вызывало их стремительную дезагрегацию, скорость которой составила $122,3 \pm 15,6$ %/мин, что свидетельствовало о еще более низкой прочности связи интегрина αIIbβ₃ с фибриногеном (Рисунок 5.2, Б).

Исследование состава цитоскелетных фракций показало, что цитоскелет контрольных тромбоцитов, агрегировавших в течение 5 мин, содержал максимальное количество β-актина и αIIb (100 %), а цитоскелет покоящихся тромбоцитов — $53,3 \pm 16,4$ % β-актина и следы αIIb. Преинкубация ОТП с MRS2500 не оказывала влияния на накопление указанных белков в цитоскелетной фракции, так что спустя 5 мин после индукции агрегации количество каждого из них было близко к 100 %. Преинкубация ОТП одновременно с MRS2500 и АСК не отражалась на



А. ОТП инкубировали с 0,5 ммоль/л ацетилсалициловой кислоты (АСК) или соответствующим растворителем, после чего в ОТП добавляли 10 мкмоль/л АДФ для индукции агрегации тромбоцитов. **Б.** В параллельных экспериментах через 3 мин после индукции агрегации в образцы добавляли 4,5 мкмоль/л эптифибатида. **В.** В параллельных экспериментах через указанные на рисунке промежутки времени после индукции агрегации образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β -актина и субъединицы α IIb интегрин α IIb β 3. Представлены результаты одного из четырех независимых экспериментов.

Рисунок 5.1 — Влияние ацетилсалициловой кислоты на формирование комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет» в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов



А. ОТП инкубировали с 10 мкмоль/л MRS2500 (антагонист рецептора P2Y₁), 0,5 ммоль/л ацетилсалициловой кислоты (АСК) или соответствующими растворителями, после чего в ОТП добавляли 10 мкмоль/л АДФ для индукции агрегации тромбоцитов. **Б.** В параллельных экспериментах через 3 мин после индукции агрегации в ОТП добавляли 4,5 мкмоль/л эптифибатида. **В.** В параллельных экспериментах через указанные на рисунке промежутки времени после индукции агрегации образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β -актина и субъединицы α IIb интегрин α IIb β 3. Представлены результаты одного из четырех независимых экспериментов.

Рисунок 5.2 — Влияние антагониста рецептора P2Y₁ на формирование комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет» в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

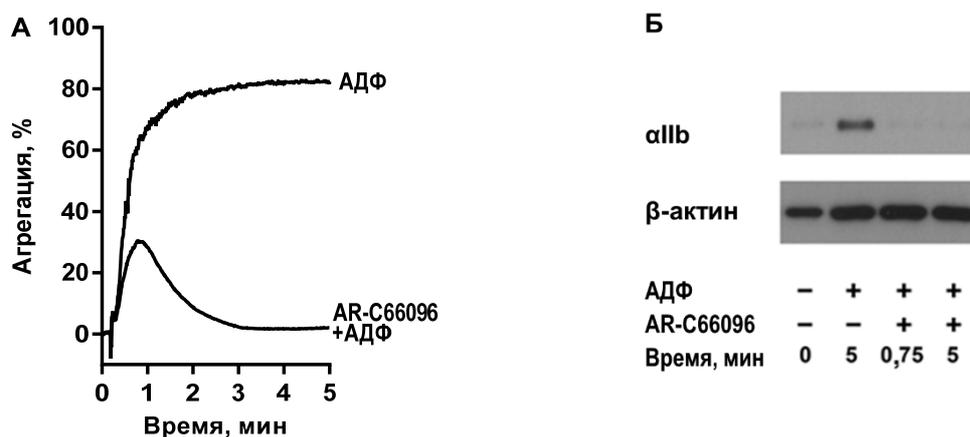
накоплении β -актина в цитоскелетной фракции тромбоцитов, но полностью отменяла накопление α IIb в динамике АДФ-индуцированной агрегации (Рисунок 5.2, В).

Антагонист рецептора P2Y₁₂. В образцах ОТП, проинкубированных с AR-C66096 (антагонист рецептора P2Y₁₂), АДФ вызывал спонтанно обратимую агрегацию тромбоцитов с максимальной амплитудой $34,6 \pm 5,0 \%$, которая отмечалась спустя $0,75 \pm 0,11$ мин после стимуляции тромбоцитов (Рисунок 5.3, А) и свидетельствовала о наименьшей прочности связи между интегринными α IIb β 3 и фибриногеном.

Анализ цитоскелетных фракций показал, что максимальное количество β -актина и α IIb содержалось в цитоскелете контрольных агрегировавших тромбоцитов (100 %). Цитоскелет покоящихся тромбоцитов содержал $60,4 \pm 10,5 \%$ β -актина и следы α IIb. Преинкубация ОТП с AR-C66096 не отражалась на накоплении β -актина в цитоскелетной фракции в динамике АДФ-индуцированной агрегации, так что его количество спустя 0,75 и 5 мин было близко к 100 %, но полностью отменяла ассоциацию α IIb с цитоскелетом тромбоцитов (Рисунок 5.3, Б).

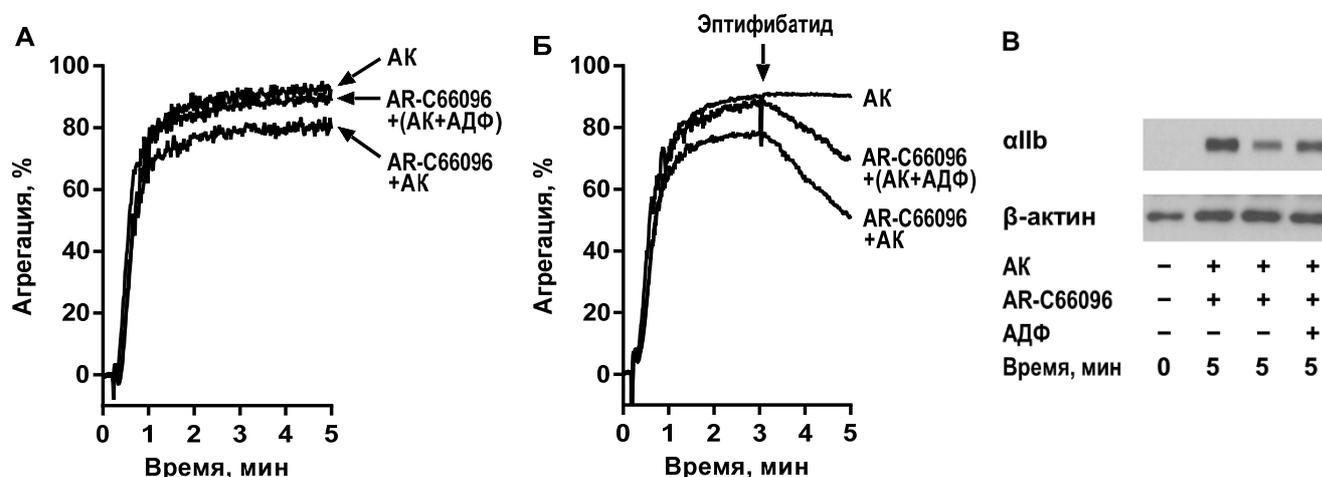
Для уточнения роли сигнализации от рецептора P2Y₁₂ в формировании комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет» были проведены дополнительные эксперименты, в которых агрегацию тромбоцитов индуцировали с помощью арахидоновой кислоты (АК). В контроле АК-индуцированная агрегация тромбоцитов составила $89,7 \pm 2,1 \%$. Преинкубация ОТП с AR-C66096 приводила к ее снижению до $79,6 \pm 6,9 \%$ ($P = 0,023$) (Рисунок 5.4, А). Добавление эптифибатида в контрольные образцы через 3 мин после индукции агрегации не вызывало дезагрегации тромбоцитов, а его добавление в образцы, проинкубированные с AR-C66096, вызывало дезагрегацию со скоростью $14,9 \pm 2,5 \%$ /мин (Рисунок 5.4, Б), что свидетельствовало о снижении прочности связи между интегринными α IIb β 3 и фибриногеном. Двойная стимуляция тромбоцитов, проинкубированных с AR-C66096, смесью АК и АДФ приводила к увеличению агрегации тромбоцитов до $87,2 \pm 5,2 \%$, что статистически значимо не отличалось от таковой в контроле, но, несмотря на это, добавление эптифибатида по-прежнему вызывало дезагрегацию тромбоцитов, скорость которой составила $13,2 \pm 3,6 \%$ /мин, что не отличалось от ее значения в образцах, проинкубированных с AR-C66096 и стимулированных только АК.

Изучение состава цитоскелетных фракций показало, что цитоскелет контрольных тромбоцитов, агрегировавших под влиянием АК, содержал максимальное количество β -актина и α IIb (100 %), а цитоскелет покоящихся тромбоцитов — $68,4 \pm 6,6 \%$ β -актина и следы α IIb. Преинкубация ОТП с AR-C66096 не отражалась на количестве β -актина, но приводила к снижению количества α IIb в цитоскелетной фракции тромбоцитов до $53,7 \pm 25,6 \%$ ($P = 0,016$) (Рисунок 5.4, В). Агрегация тромбоцитов, проинкубированных с AR-C66096, индуцированная смесью АК и АДФ, сопровождалась большей (на $27,5 \pm 16,8 \%$) ассоциацией α IIb с цитоскелетом



А. ОТП инкубировали с 10 мкмоль/л AR-C66096 (антагонист рецептора P2Y₁₂) или PBS (контроль), после чего в ОТП добавляли 10 мкмоль/л АДФ для индукции агрегации тромбоцитов. **Б.** В параллельных экспериментах через указанные на рисунке промежутки времени после индукции агрегации образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β-актина и субъединицы αIIb интегрина αIIbβ₃. Представлены результаты одного из четырех независимых экспериментов.

Рисунок 5.3 — Влияние антагониста рецептора P2Y₁₂ на формирование комплекса «фибриноген–интегрин αIIbβ₃–цитоскелет» в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов



А. ОТП инкубировали с 10 мкмоль/л AR-C66096 (антагонист рецептора P2Y₁₂) или PBS, после чего в ОТП добавляли 1,5 ммоль/л арахидоновой кислотой (АК) или смесь 1,5 ммоль/л АК и 10 мкмоль/л АДФ для индукции агрегации тромбоцитов. **Б.** В параллельных экспериментах через 3 мин после индукции агрегации в ОТП добавляли 4,5 мкмоль/л эптифибатида. **В.** В параллельных экспериментах через указанные на рисунке промежутки времени после индукции агрегации образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β-актина и субъединицы αIIb интегрина αIIbβ₃. Представлены результаты одного из четырех независимых экспериментов.

Рисунок 5.4 — Влияние антагониста рецептора P2Y₁₂ на формирование комплекса «фибриноген–интегрин αIIbβ₃–цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой

по сравнению с таковой в аналогичных образцах, стимулированных только АК, однако это значение было по-прежнему меньше 100 % ($P < 0,05$). Следовательно, снижение ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ с цитоскелетом и снижение прочности связи между $\alpha\text{IIb}\beta_3$ и фибриногеном, обнаруженное при стимуляции тромбоцитов с помощью АК в присутствии AR-C66096, было специфически обусловлено дефицитом сигнализации от рецептора P2Y_{12} и не являлось простым следствием снижения степени агрегации тромбоцитов.

ВЫВОДЫ

1. В условиях гемодилуции гиперфибринолиз, индуцированный тканевым активатором плазминогена, потенцирует снижение плотности сгустка; гипотермия потенцирует снижение скорости формирования сгустка, а при сочетании с гиперфибринолизом приводит к дополнительному снижению плотности сгустка, но замедляет его лизис; ацидоз не оказывает влияния на формирование и лизис сгустка. При сочетании гемодилуции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза коррекция плотности кровяного сгустка достигается комбинированным применением концентрата фибриногена, активированного концентрата протромбинового комплекса и/или транексамовой кислоты в *субэффективных* концентрациях. Повышение концентрации фибриногена в плазме снижает антифибринолитический эффект транексамовой кислоты.
2. При гемодилуции, не осложненной гиперфибринолизом, коррекция формирования кровяного сгустка достигается с помощью концентрата фибриногена. При гемодилуции, осложненной гиперфибринолизом, индуцированным тканевым активатором плазминогена, коррекция формирования и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка требует применения концентрата фактора XIII в комбинации с концентратом фибриногена или активируемым тромбином ингибитором фибринолиза.
3. При гиперфибринолизе, индуцированном *тканевым* активатором плазминогена, транексамовая кислота, концентрат фактора XIII и концентрат фибриногена вызывают коррекцию формирования и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка. При гиперфибринолизе, индуцированном *урокиназным* активатором плазминогена, транексамовая кислота и концентрат фактора XIII также вызывают коррекцию формирования и фибринолитической устойчивости сгустка, а концентрат фибриногена угнетает его формирование и способствует лизису.
4. Применение разработанных критериев оценки адгезии и агрегации тромбоцитов и формирования кровяного сгустка, учитывающих содержание тромбоцитов в крови, у пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией свидетельствует о том, что снижение гемостати-

ческого потенциала крови при данной патологии обусловлено снижением содержания тромбоцитов в крови при их нормальной функциональной активности.

5. При тромбоцитопении усиление адгезии и агрегации тромбоцитов достигается с помощью концентрата фактора фон Виллебранда, причем степень коррекции пропорциональна содержанию тромбоцитов, тогда как коррекция плотности кровяного сгустка достигается с помощью концентрата фибриногена вне зависимости от содержания тромбоцитов. При тяжелой тромбоцитопении, не осложненной гиперфибринолизом, наибольшая коррекция скорости формирования и плотности сгустка достигается применением концентрата фибриногена в комбинации с активированным концентратом протромбинового комплекса или концентратом фактора XIII. При тяжелой тромбоцитопении, осложненной гиперфибринолизом, индуцированным тканевым активатором плазминогена, наибольшая коррекция скорости формирования, плотности и фибринолитической устойчивости сгустка достигается применением концентрата фибриногена в комбинации с активированным концентратом протромбинового комплекса или активируемым тромбином ингибитором фибринолиза.
6. В зависимости от степени коррекции генерации тромбина с помощью концентрата рекомбинантного активированного фактора VII пациенты с тромбастенией Гланцмана типа 1 могут быть разделены на три категории: пациенты с «сильным», «средним» и «слабым» ответом на указанный препарат, причем степень коррекции генерации тромбина не зависит от вида мутации, лежащей в основе данной патологии.
7. При тромбастении Гланцмана, не осложненной гиперфибринолизом, коррекция формирования кровяного сгустка достигается с помощью концентрата фибриногена. При тромбастении Гланцмана, осложненной гиперфибринолизом, индуцированным тканевым активатором плазминогена, коррекция формирования и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка достигается комбинированным применением концентратов фибриногена и фактора XIII. В модели этой патологии коррекция формирования кровяного сгустка осуществляется также путем стимуляции прокоагулянтной активности тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с G-белком, причем этот эффект зависит от синтеза тромбоксана A₂.
8. Механизм угнетения агрегации тромбоцитов при использовании ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов P2Y₁ и P2Y₁₂ включает нарушение формирования в тромбоцитах комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет», что выражается как в снижении прочности связи интегринов α IIb β 3 с фибриногеном, так и в снижении их ассоциации с цитоскелетом. Сигнализация от рецептора P2Y₁₂ необходима для обеспечения прочности связи фибриногена с интегринами α IIb β 3 и их ассоциации с цитоскелетом. Анализ формирования указанного комплекса является альтернативным методом оценки степени угнетения функциональной активности тромбоцитов под влиянием антитромбоцитарных препаратов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При выборе дозы транексамовой кислоты необходимо учитывать не только уровень фибринолитической активности, но и концентрацию фибриногена в плазме. При повышении уровня фибриногена в плазме рекомендуется использование транексамовой кислоты в более высокой концентрации.
2. В условиях гемодилуции для коррекции формирования кровяного сгустка при отсутствии гиперфибринолиза целесообразно использовать концентрат фибриногена, а при наличии гиперфибринолиза, индуцированного тканевым активатором плазминогена, — комбинацию концентратов фибриногена и фактора XIII.
3. В условиях гиперфибринолиза, индуцированного тканевым активатором плазминогена, для коррекции формирования кровяного сгустка целесообразно использовать транексамовую кислоту, концентрат фактора XIII или концентрат фибриногена, а в условиях гиперфибринолиза, индуцированного урокиназным активатором плазминогена, — транексамовую кислоту или концентрата фактора XIII (использование концентрата фибриногена нецелесообразно).
4. В условиях тромбоцитопении для коррекции формирования кровяного сгустка при отсутствии гиперфибринолиза целесообразно использовать концентрат фибриногена, а при наличии гиперфибринолиза, индуцированного тканевым активатором плазминогена, — концентрат фибриногена в комбинации с активированным концентратом протромбинового комплекса или активированным тромбином ингибитором фибринолиза.
5. Для персонализированного подбора дозы концентрата рекомбинантного активированного фактора VII для коррекции гемостатического потенциала крови при тромбастении Гланцмана целесообразно проводить *ex vivo* оценку возможности коррекции генерации тромбина с помощью этого препарата.
6. Для коррекции формирования кровяного сгустка при тромбастении Гланцмана в случае отсутствия гиперфибринолиза целесообразно использовать концентрат фибриногена, а при наличии гиперфибринолиза, индуцированного тканевым активатором плазминогена, — комбинацию концентратов фибриногена и фактора XIII.
7. При назначении ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецептора P2Y₁₂ тромбоцитов для контроля степени угнетения их функциональной активности целесообразно оценивать амплитуду агрегатограммы и формирование комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет» (прочность связи интегринов α IIb β 3 с фибриногеном и их ассоциацию с цитоскелетом) в динамике агрегации тромбоцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Savion, N. Shear induced platelet adhesion stimulates cortactin tyrosine phosphorylation / N. Savion, **I. Budnik**, B. Shenkman // The XXII Congress of the ISTH (Boston, July 11–16, 2009). — Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2009. — Vol. 7, suppl. 2. — P. 638.
2. **Будник, И. А.** Современные представления о сдвиговой регуляции функции тромбоцитов / **И. А. Будник**, Г. Е. Бриль // **Успехи современной биологии**. — 2009. — Т. 129, № 2. — С. 198–211.
3. **Budnik, I.** Different role of platelet activation and adhesion receptors in regulation of cortactin tyrosine phosphorylation and cytoskeleton dynamics / **I. Budnik**, B. Shenkman, N. Savion // The 6th International Platelet Symposium (Ma'ale Hachamisha, May 14–18, 2010). — Ma'ale Hachamisha, 2010. — P. [25].
4. *In vitro* addition of von Willebrand factor and fibrinogen to blood with reconstituted and immune thrombocytopenia improves hemostasis as assessed by ROTEM and Impact-R tests / B. Shenkman, M. Misgav, **I. Budnik**, U. Martinowitz // The 6th International Platelet Symposium (Ma'ale Hachamisha, May 14–18, 2010). — Ma'ale Hachamisha, 2010. — P. [36].
5. Interaction of adhesion receptors and cortactin with actin cytoskeleton in activated platelet / N. Savion, **I. Budnik**, N. Rosenberg, B. Shenkman // The 6th Congress of the Federation of all the Israel Societies for Experimental Biology (Eilat, February 7–10, 2011). — Eilat, 2011. — P. 39.
6. Savion, N. Platelet aggregation mediated via either α IIb β 3 or GPIb leads to cytoskeleton association of both of the receptors / N. Savion, **I. Budnik**, B. Shenkman // The XXIII Congress of the ISTH (Kyoto, July 23–28, 2011). — Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2011. — Vol. 9, suppl. 2. — P. 317.
7. Effect of fibrinogen and factor XIII on clot formation and thrombin generation in Glanzmann thrombasthenia blood / B. Shenkman, T. Livnat, M. Misgav, **I. Budnik**, U. Martinowitz // The XXIII Congress of the ISTH (Kyoto, July 23–28, 2011). — Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2011. — Vol. 9, suppl. 2. — P. 137.
8. Differential roles of fibrinogen and von Willebrand factor on clot formation and platelet adhesion in reconstituted and immune thrombocytopenia / M. Misgav, B. Shenkman, **I. Budnik**, Y. Einav, U. Martinowitz // **Anesthesia and Analgesia**. — 2011. — Vol. 112, № 5. — P. 1034–1040. — DOI: 10.1213/ ANE.0b013e318212fffc.
9. The *in-vitro* effect of fibrinogen, factor XIII and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor on clot formation and susceptibility to tissue plasminogen activator-induced fibrinolysis in hemodilution model / B. Shenkman, T. Livnat, A. Lubetsky, I. Tamarin, **I. Budnik**, Y. Einav, U. Martinowitz // **Blood Coagulation and Fibrinolysis**. — 2012. — Vol. 23, № 5. — P. 370–378. — DOI: 10.1097/ MBC.0b013e328352cb3f.

10. Plasma tissue-type plasminogen activator increases fibrinolytic activity of exogenous urokinase-type plasminogen activator / B. Shenkman, T. Livnat, **I. Budnik**, I. Tamarin, Y. Einav, U. Martinowitz // **Blood Coagulation and Fibrinolysis**. — 2012. — Vol. 23, № 8. — P. 729–733. — DOI: 10.1097/MBC.0b013e32835897d5.
11. The *in vivo* effect of fibrinogen and factor XIII on clot formation and fibrinolysis in Glanzmann's thrombasthenia / B. Shenkman, T. Livnat, M. Misgav, **I. Budnik**, Y. Einav, U. Martinowitz // **Platelets**. — 2012. — Vol. 23, № 8. — P. 604–610. — DOI: 10.3109/09537104.2011.642031.
12. Plasma tPA increases fibrinolytic activity of exogenous uPA: modulating role of fibrinogen and factor XIII / B. Shenkman, **I. Budnik**, T. Livnat, Y. Einav, U. Martinowitz // The 21st International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis (Brighton, July 1–5, 2012). — Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2012. — Vol. 10, № 6. — P. e4.
13. **Budnik, I.** The role of platelet actin polymerization and agonist-induced cortactin tyrosine phosphorylation in α Ib β 3 expression, activation, cytoskeleton association and fibrinogen binding / **I. Budnik**, B. Shenkman, N. Savion // Abstracts of the XXIV Congress of the ISTH (Amsterdam, June 29 – July 4, 2013). — Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2013. — Vol. 11, suppl. 2. — P. 894.
14. **Budnik, I.** Role of heterotrimeric G proteins in regulation of α Ib β 3 fibrinogen affinity and α Ib β 3 cytoskeleton association / **I. Budnik**, B. Shenkman, N. Savion // The XXIV Congress of the ISTH (Amsterdam, June 29 – July 4, 2013). — Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2013. — Vol. 11, suppl. 2. — P. 896.
15. **Budnik, I.** Central role of G α i protein in regulation of fibrin(ogen)– α Ib β 3–cytoskeleton complex formation and function / **I. Budnik**, B. Shenkman, N. Savion // The 8th International Platelet Symposium (Ma'ale Hachamisha, April 3–6, 2014). — Ma'ale Hachamisha, 2014. — P. 114.
16. *In vitro* evaluation of clot quality and stability in a model of severe thrombocytopenia: effect of fibrinogen, factor XIII and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor / B. Shenkman, Y. Einav, T. Livnat, **I. Budnik**, U. Martinowitz // **Blood Transfusion**. — 2014. — Vol. 12, № 1. — P. 78–84. — DOI: 10.2450/2013.0068-13.
17. **Budnik, I.** The role of heterotrimeric G proteins in regulation of GPIIb-IIIa activation and platelet contractility / **I. Budnik**, B. Shenkman, N. Savion // The XXV Congress of the ISTH (Toronto, June 20–25, 2015). — Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2015. — Vol. 13, suppl. 2. — P. 405.
18. **Будник, И. А.** Влияние фибриногена и XIII фактора свертывания крови на формирование кровяного сгустка при гемодилуции / **И. А. Будник**, Б. З. Шенкман, Г. Е. Бриль // VI Международная конференция «Проблема безопасности в анестезиологии» (Москва, 4–6 октября 2015 г.). — Анестезиология и реаниматология. — 2015. — Прил. к № 4. — С. 18.

19. **Будник, И. А.** Фармакологическая коррекция формирования кровяного сгустка при гемодилюции / **И. А. Будник**, Б. З. Шенкман, Г. Е. Брилли // XVII Всероссийская конференция с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 19–20 ноября 2015 г.). — М., 2015. — С. 19–20.
20. Rotation thromboelastometry analysis of clot formation and fibrinolysis in severe thrombocytopenia: effect of fibrinogen, activated prothrombin complex concentrate, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor / B. Shenkman, Y. Einav, T. Livnat, **I. Budnik**, U. Martinowitz // **International Journal of Laboratory Hematology**. — 2015. — Vol. 37, № 4. — P. 521–529. — DOI: 10.1111/ijlh.12331.
21. **Budnik, I.** Synergistic effect of signaling from receptors of soluble platelet agonists and outside-in signaling in formation of a stable fibrinogen–integrin α IIb β 3–actin cyto-skeleton complex / **I. Budnik**, B. Shenkman, N. Savion // **Thrombosis Research**. — 2015. — Vol. 135, № 1. — P. 114–120. — DOI: 10.1016/j.thromres. 2014.10.005.
22. **Budnik, I.** Role of G protein signaling in formation of the fibrin(ogen)–integrin α IIb β 3–actin cyto-skeleton complex in platelets / **I. Budnik**, B. Shenkman, N. Savion // **Platelets**. — 2016. — Vol. 27, № 6. — P. 563–575. — DOI: 10.3109/09537104.2016. 1147544.
23. **Budnik, I.** Blockade of actin polymerization stabilizes G α q-mediated platelet aggregation, promotes release reaction and aggregation induced by direct α IIb β 3 integrin activation but inhibits clot retraction / **I. Budnik**, B. Shenkman, N. Savion // The 60th Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (Muenster, February 17–20, 2016). — Muenster, 2016. — P. A36.
24. **Budnik, I.** Antifibrinolytic efficacy of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor exceeds that of fibrinogen and factor XIII in hemodilution model / **I. Budnik**, B. Shenkman // The 60th Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (Muenster, February 17–20, 2016). — Muenster, 2016. — P. A86.
25. **Будник, И. А.** Возможности фармакологической коррекции фибринолитической устойчивости кровяного сгустка при дилуционной коагулопатии / **И. А. Будник** // VI Международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения — 2015» (Санкт-Петербург, 2–4 декабря 2015). — СПб., 2015. — С. 281.
26. **Budnik, I.** Correction of impaired clot quality and stability by fibrinogen and activated prothrombin complex concentrate in a model of severe thrombocytopenia / **I. Budnik**, B. Shenkman // Abstracts of the 36th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine (Brussels, March 15–18, 2016). — Critical Care. — 2016. — Vol. 20, suppl. 2. — P. 56.
27. **Будник, И. А.** Фармакологическая коррекция гемостатического потенциала крови в модели тяжелой тромбоцитопении / **И. А. Будник** // Международная научно-практическая кон-

- ференция, посвященная 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фармацевтического факультета «Университетская наука: взгляд в будущее» (Курск, 4–5 февраля 2016 г.). — Курск, 2016. — Т. II. — С. 366–369.
28. **Будник, И. А.** Новые способы фармакологической коррекции системы гемостаза и фибринолиза при тяжелой тромбоцитопении и дилуционной коагулопатии / **И. А. Будник** // X Юбилейная Международная научно-практическая конференция молодых ученых-медиков (Курск, 26–27 февраля 2016 г.). — Курск, 2016. — Т. I. — С. 111–113.
29. **Будник, И. А.** Коррекция формирования кровяного сгустка с помощью препаратов фибриногена, антиингибиторного коагулянтного комплекса и активируемого тромбином ингибитора фибринолиза в модели тяжелой тромбоцитопении, гемодилуции и гиперфибринолиза / **И. А. Будник** // XI Международная (XX Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, 17 марта 2016 г.). — М., 2016. — С. 61–62.
30. **Budnik, I.** Fibrinogen, activated prothrombin complex concentrate, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor act in concert to improve clot quality in a model of severe thrombocytopenia, hemodilution, and hyperfibrinolysis / **I. Budnik**, B. Shenkman // Abstracts of the 2016 Summit of the Thrombosis and Hemostasis Societies of North America (Chicago, April 14–16, 2016). — American Journal of Hematology. — Vol. 91, № 9. — P. E410–E411.
31. **Будник, И. А.** Различный эффект препаратов фактора фон Виллебранда и фибриногена на адгезию тромбоцитов и формирование кровяного сгустка при первичной иммунной тромбоцитопении / **И. А. Будник** // III Конгресс гематологов России (Москва, 14–16 апреля 2016 г.). — Гематология и трансфузиология. — 2016. — Т. 61, № S1(1). — С. 94.
32. **Будник, И. А.** Коррекция формирования кровяного сгустка при нормальной и повышенной фибринолитической активности крови в модели тяжелой тромбоцитопении / **И. А. Будник** // XVII Всероссийская научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» (Киров, 13–15 апреля 2016 г.). — Киров, 2016. — С. 288–289.
33. **Будник, И. А.** Формирование комплекса фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –актин в динамике агрегации тромбоцитов / **И. А. Будник** // XVII Всероссийская научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» (Киров, 13–15 апреля 2016 г.). — Киров, 2016. — С. 289–290.
34. **Будник, И. А.** Различный эффект фибриногена и концентрата протромбинового комплекса на формирование кровяного сгустка в модели тяжелой тромбоцитопении / **И. А. Будник** // XXII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Акту-

- альные проблемы патофизиологии — 2016» (Санкт-Петербург, 7–8 апреля 2016 г.). — СПб., 2016. — С. 17–19.
35. Будник, И. А. Новый способ коррекции гемостатического потенциала крови при первичной иммунной тромбоцитопении / И. А. Будник // XIX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 23 апреля 2016 г.). — СПб., 2016. — Т. XIX. — С. 103–104.
 36. Будник, И. А. Патогенез нарушений тромбоцитарного и коагуляционного звена системы гемостаза при травматической коагулопатии / И. А. Будник // XIX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 23 апреля 2016 г.). — СПб., 2016. — Т. XIX. — С. 105–106.
 37. Будник, И. А. Дилузионная коагулопатия: новые возможности коррекции / И. А. Будник // 70-я Юбилейная Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 21–22 апреля 2016 г.). — Ярославль, 2016. — С. 92–93.
 38. Будник, И. А. Нарушения формирования кровяного сгустка при гиперфибринолизе и возможности их коррекции / И. А. Будник // Всероссийская заочная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы патофизиологии: теоретические и клинические аспекты». — Бюллетень медицинских интернет-конференций. — 2016. — Т. 6, № 11. — С. 1566.
 39. Будник, И. А. Формирование комплекса «актин–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ –фибриноген» в динамике адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов: роль гетеротримерного G-белка G_{α_z} / И. А. Будник // Всероссийская заочная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы патофизиологии: теоретические и клинические аспекты». — Бюллетень медицинских интернет-конференций. — 2016. — Т. 6, № 11. — С. 1567.
 40. Budnik, I. Contribution of hemodilution, fibrinolysis, acidosis, and hypothermia to derangement of clot formation in the in vitro model of trauma-induced coagulopathy / I. Budnik, B. Shenkman, U. Martinowitz // The 21st Congress of the European Hematology Association (Copenhagen, June 9–12, 2016). — Haematologica. — 2016. — Vol. 101, № s1. — P. 407.
 41. Будник, И. А. Механизмы нарушения формирования кровяного сгустка в модели травматической коагулопатии / И. А. Будник // 15-й Съезд общероссийской общественной организации «Федерация анестезиологов и реаниматологов» (Москва, 17–20 сентября 2016 г.). — М., 2016. — С. 253–254.
 42. Нарушения формирования кровяного сгустка и дисфункция тромбоцитов в модели травматической коагулопатии *in vitro* / И. А. Будник, Б. Шенкман, Ю. Эйнав, У. Мартинович / 8-я

- Всероссийская Конференция по клинической гемостазиологии и гемореологии (Москва, 20–22 октября 2016). — Тромбоз, гемостаз и реология. — 2016. — № 3 (67), прил. 1. — С. 78–79.
43. Будник, И. А. Роль гемодилуции, фибринолиза, гипотермии и ацидоза в патогенезе травма-индуцированной коагулопатии / И. А. Будник / Всероссийский Конгресс с международным участием «Хирургия — XXI век: соединяя традиции и инновации» (Москва, 6–8 июня 2016 г.). — М., 2016. — С. 32–33.
 44. Будник, И. А. Механизмы нарушения коагуляционного и тромбоцитарного звена системы гемостаза в модели травматической коагулопатии *in vitro* / И. А. Будник, Б. Шенкман / Сборник тезисов международной конференции травматологов-ортопедов «Применение современных технологий лечения в российской травматологии и ортопедии» (Москва, 3–4 ноября 2016 г.). — М., 2016. — С. 37.
 45. Будник, И. А. Вклад активации гетеротримерного G-белка G_{ai2} тромбоцитов в формирование комплекса «актин–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –фибриноген» / И. А. Будник // Международная научно-практическая конференция «Наука сегодня: фундаментальные и прикладные исследования» (Вологда, 28 сентября 2016 г.). — Вологда, 2016. — С. 165–166.
 46. Будник, И. А. Роль активации гетеротримерных G-белков G_{aq} и G_{ai} в ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом тромбоцитов / И. А. Будник // II Международная научно-практическая конференция «Фундаментальные научные исследования: теоретические и практические аспекты» (Кемерово, 29 сентября 2016 г.). — Кемерово, 2016. — Т. II. — С. 103–105.
 47. Будник, И. А. Влияние прямой активации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ и агрегации тромбоцитов на образование цитоскелетного комплекса / И. А. Будник // Международная научно-практическая конференция «Актуальные подходы и направления научных исследований XXI века» (Самара, 30 сентября 2016 г.). — Самара, 2016. — С. 194–195.
 48. Будник, И. А. Ассоциация интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом в динамике агрегации тромбоцитов, индуцированной антителами против LIBS6 / И. А. Будник // XV Международная научно-практическая конференция «Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире» (Санкт-Петербург, 4 октября 2016 г.). — СПб., 2016. — Т. 1. — С. 158–160.
 49. Будник, И. А. Реорганизации цитоскелета тромбоцитов в динамике агрегации, индуцированной путем активации рецептора $P2Y_{12}$ / И. А. Будник // III Международная научно-практическая конференция «Приоритетные направления современной науки» (Москва, 23 сентября 2016 г.). — М., 2016. — С. 136–138.
 50. Будник, И. А. Интеграция комплекса «фибриноген– $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов / И. А. Будник // XXIV Международная научно-

- практическая конференция «Достижения вузовской науки» (Новосибирск, 31 августа 2016 г.). — Новосибирск, 2016. — С. 28–32.
51. Будник, И. А. Реорганизация цитоскелета тромбоцитов при селективной активации гетеротримерных G-белков Gαq, Gαi и Gα12/13 / И. А. Будник // Международная научно-практическая конференция «Проблемы, перспективы и направления инновационного развития науки» (Уфа, 1 октября 2016 г.). — Уфа, 2016. — Часть 2. — С. 191–193.
 52. Role of heterotrimeric G proteins in platelet activation and clot formation in platelets treated with integrin αIIbβ3 inhibitor / I. Budnik, B. Shenkman, H. Hauschner et al. // The XXVI Congress of the ISTH (Berlin, July 8–13, 2017). — Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. — 2017. — Vol. 1, suppl. 1. — P. 1262.
 53. Будник, И. А. Роль гетеротримерных G-белков в регуляции формирования кровяного сгустка / И. А. Будник // XXIII Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2017» (Санкт-Петербург, 13–14 апреля 2017 г.). — СПб., 2017. — С. 46–47.
 54. Model of trauma-induced coagulopathy including hemodilution, fibrinolysis, acidosis and hypothermia: Impact on blood coagulation and platelet function / B. Shenkman, I. Budnik, Y. Einav, H. Hauschner, M. Andrejchin, U. Martinowitz // **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**. — 2017. — Vol. 82, № 2. — P. 287–292. — DOI: 10.1097/TA.0000000000001282.
 55. Влияние концентратов фибриногена, фактора XIII и активируемого тромбином ингибитора фибринолиза на плотность и фибринолитическую устойчивость кровяного сгустка в модели гиперфибринолиза / И. А. Будник, О. Л. Морозова, А. А. Цымбал, Б. Шенкман, Ю. Эйнав // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. — 2017. — Т. 61, № 4. — С. 44–50. — DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8522.
 56. Correction of coagulopathy in thrombocytopenia and Glanzmann thrombasthenia models by fibrinogen and factor XIII as assessed by thromboelastometry / I. Budnik, B. Shenkman, O. Morozova, J. Andreichyn, Y. Einav // **Pathophysiology**. — 2018. — Vol. 25, № 4. — P. 347–351. — DOI: 10.1016/j.pathophys.2018.05.005.
 57. Role of heterotrimeric G proteins in platelet activation and clot formation in platelets treated with integrin αIIbβ3 inhibitor / I. Budnik, B. Shenkman, H. Hauschner, U. Martinowitz, N. Savion // **Platelets**. — 2018. — Vol. 29, № 3. — P. 265–269. — DOI: 10.1080/09537104.2017.1295136.
 58. Анализ влияния транексамовой кислоты, фактора XIII и концентрата фибриногена на формирование и лизис кровяного сгустка при избыточном фибринолизе, индуцированном тканевым и урокиназным активатором плазминогена / И. А. Будник, О. Л. Морозова, А. А. Цымбал, Б. Шенкман, Ю. Эйнав // **Гематология и трансфузиология**. — 2018. — Т. 63, № 1. — С. 55–64. — DOI: 10.25837/HAT.2018.86..1..005.

59. Коррекция формирования кровяного сгустка с помощью концентрата фибриногена и активированного концентрата протромбинового комплекса в модели тяжелой тромбоцитопении / **И. А. Будник**, О. Л. Морозова, А. А. Цымбал, Б. Шенкман, Ю. Эйнав // **Патогенез**. — 2018. — Т. 16, № 2. — С. 23–29. — DOI: 10.25557/2310-0435.2018.02.23-29.
60. Recombinant factor VIIa for treatment of patients with Glanzmann thrombasthenia — a thrombin generation-based study / T. Levy, **I. Budnik**, A. Arie Barg et al. // The XXXIII International Congress of the World Federation of Hemophilia (Glasgow, May 20–24, 2018). — Haemophilia. — Vol. 24, № s5. — P. 99.
61. Low concentrations of recombinant factor VIIa may improve the impaired thrombin generation of Glanzmann thrombasthenia patients / S. Levy-Mendelovich, T. Levy, **I. Budnik**, A. Arie Barg, N. Rosenberg, U. Seligsohn, G. Kenet, T. Livnat // **Thrombosis and Haemostasis**. — 2019. — Vol. 119, № 1. — P. 117–127. — DOI: 10.1055/s-0038-1676348.
62. **Будник, И. А.** Тест генерации тромбина как метод предварительной оценки эффективности рекомбинантного фактора VIIa при тромбастении Гланцмана / **И. А. Будник** // XXIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Лабораторная служба в современных реалиях» (Москва, 20–22 марта 2019 г.). — М., 2019. — С. 16.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ	аденозин-5'-дифосфат
АК	арахидоновая кислота
АКПК	активированный концентрат протромбинового комплекса
АСК	ацетилсалициловая кислота
ДСН	додecilсульфат натрия
ЕД	единица действия биологической активности
ИТП	иммунная тромбоцитопения
КТ	комнатная температура
МЕ	международная единица биологической активности
ОТП	обогащенная тромбоцитами плазма
ТГ	тромбастения Гланцмана
ТКК	транексамовая кислота
А α	угол альфа
FXIII	фактор XIII (фибринстабилизирующий фактор)
G-белок	гетеротримерный белок, связывающий гуаниновые нуклеотиды
LOT	lysis onset time; время начала лизиса
М	mean; выборочное среднее

MCF	maximal clot firmness; максимальная плотность сгустка
n	количество наблюдений
PAR-1	protease-activated receptor 1; протеазой активируемый рецептор 1
PAR-4	protease-activated receptor 4; протеазой активируемый рецептор 4
PBS	phosphate-buffered saline; натрий-фосфатный буфер
<i>r</i>	коэффициент корреляции Пирсона
rFVIIa	рекомбинантный активированный фактор VII
ROTEM	rotational thromboelastometry; ротационная тромбоэластометрия
SD	standard deviation; выборочное стандартное отклонение
TAFI	thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor; активируемый тромбином ингибитор фибринолиза
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20; Трис-солевой буфер с добавлением Твина 20
TP	thromboxane-prostanoid (receptor); тромбоксан-простаноидный (рецептор)
tPA	tissue plasminogen activator; тканевой активатор плазминогена
TRAP	thrombin receptor-activating peptide; пептид, активирующий рецептор тромбина
uPA	urokinase plasminogen activator; урокиназный активатор плазминогена
VWF	von Willebrand factor; фактор фон Виллебранда