

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И. М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Будник Иван Александрович

**Механизмы нарушений гемостатического потенциала крови и
пути его коррекции при геморрагических состояниях**

14.03.03 – Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
доцент О. Л. Морозова

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. Современные представления о механизмах нарушения гемостатического потенциала крови и принципах его коррекции при геморрагических состояниях (обзор литературы).....	18
1.1. Травматическая коагулопатия	19
1.2. Первичная иммунная тромбоцитопения.....	38
1.3. Тромбастения Гланцмана	46
1.4. Дисфункция тромбоцитов при антитромбоцитарной терапии	54
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	58
2.1. Материал исследования.....	58
2.2. Методы исследования.....	60
2.2.1. Приготовление обогащенной и бедной тромбоцитами плазмы, бестромбоцитарной плазмы, плазмы без клеточных микрочастиц и эритроцитарной массы	60
2.2.2. Ротационная тромбоэластометрия	62
2.2.3. Тест генерации тромбина.....	63
2.2.4. Исследование адгезии и агрегации тромбоцитов при высокой скорости сдвига	63
2.2.5. Световая трансмиссионная агрегометрия	64
2.2.6. Исследование стабильности связи между интегринами $\alpha\text{IIb}\beta_3$ и фибриногеном в динамике агрегации тромбоцитов	65
2.2.7. Фракционирование тромбоцитов.....	65
2.2.8. Электрофорез в полиакриламидном геле	66
2.2.9. Вестерн-блоттинг	67
2.3. Экспериментальные модели геморрагических состояний	68
2.3.1. Модель травматической коагулопатии <i>in vitro</i>	68
2.3.2. Модель изолированной тромбоцитопении <i>in vitro</i>	69
2.3.3. Модель тромбастении Гланцмана <i>in vitro</i>	70
2.4. Гемостатические препараты	70

2.5. Статистический анализ.....	71
Глава 3. Нарушения гемостатического потенциала крови и его коррекция при травматической коагулопатии.....	75
3.1. Вклад гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушение гемостатического потенциала крови.....	75
3.2. Коррекция гемостатического потенциала крови в условиях гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза.....	79
3.3. Коррекция гемостатического потенциала крови в условиях гемодилюции в зависимости от уровня фибринолитической активности плазмы.....	87
3.4. Коррекция гемостатического потенциала крови в условиях гиперфибринолиза в зависимости от вида действующего активатора плазминогена	109
Глава 4. Нарушения гемостатического потенциала крови и его коррекция при тромбоцитопении.....	121
4.1. Способ оценки функций тромбоцитов в условиях тромбоцитопении	121
4.2. Коррекция гемостатического потенциала крови в зависимости от тяжести тромбоцитопении	129
4.3. Коррекция гемостатического потенциала крови в условиях тяжелой тромбоцитопении в зависимости от уровня фибринолитической активности плазмы и гемодилюции	136
Глава 5. Нарушения гемостатического потенциала крови и его коррекция при тромбастении Гланцмана	148
5.1. Генерация тромбина при тромбастении Гланцмана и возможности ее коррекции с помощью rFVIIa.....	148
5.2. Верификация модели тромбастении Гланцмана <i>in vitro</i>	158
5.3. Коррекция гемостатического потенциала крови при тромбастении Гланцмана в зависимости от уровня фибринолитической активности плазмы....	163
5.4. Стимуляция тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с G-белком, как способ коррекции формирования кровяного сгустка в модели тромбастении Гланцмана	173

Глава 6. Нарушение гемостатического потенциала крови при использовании препаратов для антитромбоцитарной терапии	180
6.1. Закономерности формирования комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет» в тромбоцитах	180
6.2. Формирование комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет» в присутствии ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов P2Y ₁₂ и P2Y ₁ тромбоцитов	197
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	208
ВЫВОДЫ	275
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	277
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	279
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	282

ВВЕДЕНИЕ

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 [155]. Летальность при этом достигает 40 % и не имеет заметной тенденции к снижению [291, 305, 325]. Ежегодно в мире от острой массивной кровопотери погибают около 1,9 млн человек, из них около 1,5 млн — от кровотечений в результате травмы [81].

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 [206]. 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 [262, 312].

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 [170, 293]. 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 [174, 198]. Кроме того, гемотрансфузия связана с риском острого повреждения легких, циркуляторной перегрузки, анафилаксии, аллоиммунизации и других осложнений [20, 54]. В связи с этим в настоящее время активно разрабатываются алгоритмы целенаправленной гемо-

статической терапии, основанные на применении концентратов факторов свертывания [12, 351]. 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 [142].

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 [211]. В большинстве случаев повышенная кровоточивость обусловлена расстройствами тромбоцитарного звена системы гемостаза [39, 86, 214]. Влияние системных гемостатиков на гемостатический потенциал крови у пациентов с различными формами тромбоцитопении и тромбоцитопатии, особенно при их сочетании с гемодилюцией 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 гемодилюция, гиперфибринолиз, гипотермия и ацидоз [71, 382], однако их относительный вклад в нарушение гемостатического потенциала требует уточнения. Эффективность концентратов факторов свертывания при этой патологии системы гемостаза показана не во всех исследованиях [181, 269], 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 [249, 284]. Оценка функций тромбоцитов в условиях тромбоцитопении затруднена, поскольку большинство методов исследования тромбоцитарного звена системы гемостаза чувствительны к содержанию тромбоцитов [41, 283]. 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 [35]. 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 % [250]. В то же время у некоторых пациентов его применение в той же дозе вызывает тромботические осложнения [302]. 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 [6, 140]. Применение существующих методов оценки остаточной реактивности тромбоцитов для персонализированного подбора дозы этих препаратов не позволило добиться значимого снижения частоты кровотечений [375]. Одним из ключевых событий в ходе агрегации тромбоцитов является формирование комплекса «фибриноген–интегрин

αIIbβ3–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 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» как возможный механизм развития геморрагических осложнений при использовании антитромбоцитарных препаратов.

Научная новизна

Впервые в условиях гемодилюции 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 гемодилюции, 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 α IIb β 3–цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов. При этом показана роль сигнализации от рецепторов, сопряженных с гетеротримерным G-белком, активации интегринов α IIb β 3 «изнутри наружу», физического соединения тромбоцитов друг с другом через фибриноген, сигнализации от интегринов α IIb β 3 «снаружи внутрь» и полимеризации β -актина. Показано, что механизм угнетения функций тромбоцитов под влиянием ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов P2Y₁₂, используемых для проведения двойной анти-тромбоцитарной терапии, а также антагонистов рецепторов P2Y₁ включает нарушение формирования указанного комплекса.

Теоретическая и практическая значимость

Настоящая работа расширяет представления о роли гемодилюции, 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 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ 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 $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов и влиянии на этот процесс ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$. При этом установлено, что амплитуда агрегации тромбоцитов не всегда отражает степень угнетения функциональной активности тромбоцитов и что тестирование прочности связи интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с фибриногеном и исследование ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом в динамике агрегации тромбоцитов может стать основой для разработки нового метода оценки остаточной реактивности тромбоцитов и персонализированного подбора дозы и вида антиагрегационных препаратов.

Методология и методы исследования

Объектом исследования явилась система гемостаза при геморрагических состояниях.

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 подробно описаны в главе 2 «Материалы и методы исследования».

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 тромбоастенией 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 $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ включает нарушение формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет». Сигнализация от рецептора $P2Y_{12}$ необходима для обеспечения прочности связи фибриногена с интегринами $\alpha IIb\beta 3$ 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 конференция 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 тромбоастенией 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 B. 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 том числе 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.

Глава 1

Современные представления о механизмах нарушения гемостатического потенциала крови и принципах его коррекции при геморрагических состояниях (обзор литературы)

Острая массивная кровопотеря встречается с частотой 25–45 случаев на 100 000 населения в год [155] и отличается высокой летальностью без заметной тенденции к снижению за последние годы [291, 305, 325]. Кровотечения, требующие активации протокола массивной трансфузии, возникают у 5–19 % пациентов с травмами [169, 323], из которых около 40 % умирают в течение нескольких часов после госпитализации [291]. Большие кровотечения являются осложнением сердечно-сосудистых операций в 0,6–11 % случаев [59, 69, 290], из которых около 13 % приводят к смерти пациента в раннем послеоперационном периоде [305]. Тяжелые акушерские кровотечения осложняют течение 2–4 % родов [43, 291, 394] и становятся причиной смерти родильниц в 27 % случаев [325]. Кровотечения из желудочно-кишечного тракта также являются одной из частых причин острой массивной кровопотери, которая в 1–33 % случаев приводит к смерти пациента [254]. На сегодняшний день большие кровотечения являются ведущей потенциально предотвратимой причиной смерти при всех вышеуказанных состояниях [262]. Ежегодно в мире от острой массивной кровопотери погибают около 1,9 млн человек, причем около 1,5 млн из них — от кровотечений в результате травмы [81].

В клинической практике под острой массивной кровопотерей понимается потеря одного и более ОЦК (с учетом объема коррекции) в течение 24 ч или 50 % ОЦК в течение 3 ч [291] или кровопотеря, требующая трансфузии ≥ 5 доз эритроцитов в течение 4 ч, ≥ 6 доз эритроцитов в течение 6 ч или ≥ 10 доз эритроцитов в течение 24 ч [394]. Поскольку эти определения ретроспективны и не могут быть использованы для оценки тяжести продолжающегося кровотечения, предлагаются другие определения, учитывающие скорость кровопотери. В соответствии с этим

критерием под массивной кровопотерей понимают также кровотечение со скоростью 150 мл/мин и более в сочетании с признаками гемодинамической нестабильности или трансфузию ≥ 4 доз эритроцитов в течение 1 ч [82].

Потеря более 30–40 % ОЦК вызывает стереотипный комплекс реакций, затрагивающих все системы организма. При этом изменения, возникающие в системе гемостаза, приводят к глубоким нарушениям гемостатического потенциала крови и развитию вторичного тяжелого, трудноконтролируемого диффузного капиллярного кровотечения, характеризующегося множественным подтеканием крови из мест хирургических разрезов и травм, из слизистых оболочек, из мест пункций вен и инъекций. Остановить такое кровотечение методами хирургического гемостаза практически невозможно. Особую опасность представляют кровотечения у пациентов с геморрагическими диатезами, поскольку изменения в системе гемостаза, обусловленные кровопотерей, накладываются у них на изначально имеющиеся нарушения гемостатического потенциала крови. Спасти жизнь пациента с тяжелым коагулопатическим кровотечением можно только путем применения специальной стратегии экстренной коррекции гемостатического потенциала крови [21].

Целью настоящего обзора литературы явилось рассмотрение механизмов расстройств гемостатического потенциала крови, возникающих вследствие острой массивной кровопотери в результате тяжелой травмы (травматической коагулопатии), а также возможностей его экстренной коррекции с помощью современных фармакологических гемостатических средств системного действия. Отдельное внимание уделяется механизмам нарушения гемостатического потенциала крови и методам его коррекции при патологии тромбоцитарного звена системы гемостаза как наиболее часто встречающейся причины предрасположенности пациента к развитию тяжелых кровотечений при травмах и хирургических операциях.

1.1. Травматическая коагулопатия

Травматическая коагулопатия представляет собой комплекс расстройств в системе гемостаза, возникающих у каждого 3–4-го пациента с тяжелой травмой и

большим кровотечением. Клинически травматическая коагулопатия проявляется в виде диффузного капиллярного кровотечения. Возникновение этого расстройства системы гемостаза ассоциировано с большей потребностью пациента в гемотрансфузии, большей частотой развития полиорганной недостаточности, более длительным пребыванием в отделении интенсивной терапии и четырехкратным увеличением риска смерти пациента [74, 230].

Лабораторная диагностика травматической коагулопатии основывается на определении протромбинового времени (ПВ) или производных этого показателя [протромбиновое отношение (ПО), международное нормализованное отношение (МНО) и другие]. Во многих исследованиях в качестве диагностического критерия травматической коагулопатии принимается значение ПО или МНО $> 1,2$ [131, 251]. Увеличение ПВ коррелирует с тяжестью шока и позволяют прогнозировать исход заболевания при развитии кровотечения у пациента с травмой [131]. Использование активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) для диагностики травматической коагулопатии считается менее предпочтительным ввиду его меньшей чувствительности к снижению уровня факторов свертывания в плазме по сравнению с ПВ [393]. В последнее время параллельно с этими традиционными коагуляционными тестами для выявления расстройств системы гемостаза у пациентов с травмами все чаще используются вязкоэластические методы (ротационная тромбоэластометрия и тромбоэластография) [10, 37], однако общепринятые диагностические критерии травматической коагулопатии, основанные на результатах этих методов, пока не установлены [144].

В развитии травматической коагулопатии выделяют две стадии — раннюю и позднюю [206]. Ранняя стадия возникает уже спустя несколько минут после травмы и острой массивной кровопотери, обнаруживается еще до начала каких-либо лечебных мероприятий и, таким образом, представляет собой эндогенный ответ организма на повреждение и гипоперфузию тканей. Совокупность нарушений в системе гемостаза, возникающих на этой стадии травматической коагулопатии, как правило, обозначается понятием *острой травматической коагулопатии*. Поздняя стадия возникает в связи с началом интенсивной терапии, включающей инфузию

кристаллоидных растворов (зачастую в избыточном объеме) и трансфузию эритроцитарной массы, и характеризуется присоединением гемодилюции, гипотермии и ацидоза, потенцирующих расстройства системы гемостаза. Совокупность нарушений в системе гемостаза, возникающих на поздней стадии травматической коагулопатии, обозначается также понятием *ятрогенной коагулопатии*. Рассмотрим механизмы развития травматической коагулопатии более подробно.

Острая травматическая коагулопатия

В развитии острой травматической коагулопатии выделяют несколько ключевых патогенетических факторов, в том числе активацию протеина С, снижение концентрации факторов свертывания, активацию фибринолиза, дисфункцию тромбоцитов и эндотелия.

Протеин С. Тяжелое повреждение тканей приводит к экспозиции тканевого фактора, активации коагуляционного звена системы гемостаза и генерации значительного количества тромбина. Одновременно с этим под влиянием катехоламинов и других биологически активных веществ, выделяющихся в кровь при тяжелой травме, происходит системная активация эндотелия, одним из проявлений которой является увеличение экспрессии на мембране эндотелиальных клеток тромбомодулина. Связывание тромбина с тромбомодулином приводит к изменению его субстратной специфичности, так что тромбин утрачивает способность превращать фибриноген в фибрин и приобретает способность активировать протеин С [28, 133]. Повышение уровня активированного протеина С (aPC) отмечается у 25–33 % пациентов с тяжелыми травмами, что ассоциировано с более высокой потребностью в гемотрансфузии и смертностью. aPC инактивирует фактор Va (FVa) и фактор VIIIa (FVIIIa), что ограничивает дальнейшую генерацию тромбина, а также инактивирует ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), что приводит к снижению инактивации тканевого активатора плазминогена (tPA) и усилению генерации плазмина [75, 109, 170]. Кроме того, ограничивая генерацию тромбина, aPC снижает активацию активируемого тромбином ингибитора

фибринолиза (TAFI), что приводит к увеличению количества остатков лизина в структуре фибриновой сети и тем самым делает ее более подверженной лизису.

Факторы свертывания. Мощная активация коагуляционного звена системы гемостаза при тяжелой травме вскоре приводит к снижению уровня факторов свертывания, причем степень их дефицита коррелирует с тяжестью травмы и шока. При этом генерация тромбина, как правило, сохраняется на достаточно высоком уровне [285], что отчасти обусловлено потреблением антитромбина (анти-тромбина III) и снижением его активности в плазме пациента.

Уровень фибриногена при травматической коагулопатии снижается раньше (еще до начала инфузионной терапии) и в большей степени по сравнению с другими факторами свертывания [165]. Это обусловлено потерей фибриногена вследствие кровотечения, потребления в результате активации свертывания, а также снижения его синтеза гепатоцитами при травме. Гипофибриногенемия является независимым предиктором большего объема кровопотери и смерти пациента в послеоперационном периоде [242]. Восполнение уровня фибриногена включено в протоколы лечения травматической коагулопатии, однако вопросы о том, какой уровень фибриногена является целевым и улучшает ли введение фибриногена исход заболевания, до сих пор остаются открытыми.

Тромбоциты. На стадии острой травматической коагулопатии уровень тромбоцитов в крови у большинства пациентов остается в пределах нормальных значений, но спустя 2 ч после госпитализации постепенно снижается, в среднем со скоростью $1 \times 10^9 \text{ л}^{-1}/\text{ч}$ [348]. Отчасти это связано с потреблением тромбоцитов в результате активации системы гемостаза, потерей тромбоцитов вследствие продолжающегося кровотечения, трансфузией кристаллоидов, плазмы и эритроцитарной массы, вызывающих разведение тромбоцитов в общем объеме крови [165]. Содержание тромбоцитов при травме отрицательно коррелирует с тяжестью травмы и смертностью пациентов [348]. При этом показано, что трансфузия тромбоцитов пациентам с травмой не обеспечивает немедленного восстановления уровня тромбоцитов в крови [381] и не влияет на исход заболевания у пациентов с травматическим повреждением мозга [61]. Более того, в одном исследовании было

показано, что трансфузия тромбоцитов может даже увеличивать смертность пациентов с травмой.

Возможным объяснением небольшой эффективности трансфузии тромбоцитов является быстрое нарушение их функциональной активности под влиянием биологически активных веществ, высвобождающихся в кровь при травме [381]. Показано, что даже при нормальном содержании тромбоцитов около половины пациентов демонстрируют нарушения агрегации тромбоцитов сразу после травмы [389]. Однако нарушение агрегации тромбоцитов не предсказывает потребность в трансфузии тромбоцитарного концентрата. Необходимы дальнейшие исследования биологии тромбоцитов при тяжелой травме.

Фибринолиз. В зависимости от уровня фибринолитической активности плазмы (по данным тромбоэластографии) пациенты с травмой делятся на три категории: 64 % составляют пациенты с «выключенным» фибринолизом (fibrinolysis shutdown), у которых признаки спонтанного лизиса кровяного сгустка практически отсутствуют [лизис сгустка через 30 мин после достижения его максимальной плотности ($LY30 \leq 0,8\%$); 18 % — пациенты с умеренным («физиологическим») фибринолизом ($LY30 = 0,9-2,9\%$); и 18 % — пациенты с гиперфибринолизом ($LY30 \geq 3\%$) [259]. Схожее распределение пациентов было установлено и в другом исследовании [260]. Степень фибринолитической активности не коррелирует с полом, возрастом пациента, тяжестью травмы и шока, но ассоциирована с различным уровнем смертности пациентов. Наименьшая смертность отмечается в группе с умеренным фибринолизом (3 %); бóльшая смертность — в группе с «выключенным» фибринолизом (17 %); и максимальная смертность — в группе с гиперфибринолизом (44 %).

Механизмы развития гиперфибринолиза при травме до конца не изучены. Тем не менее исследования указывают на то, что это может быть связано с высвобождением в плазму большого количества tPA из эндотелия под влиянием тромбина, катехоламинов и других биологически активных веществ, выделяющихся в кровь при травме [83, 91]. Кроме того, повышению фибринолитической активности может способствовать снижение уровня PAI-1 в плазме в связи с его

расщеплением под влиянием аРС и снижением содержания тромбоцитов, являющихся одним из источников PAI-1. Все эти факторы способствуют большей генерации плазмина, развитию фибриногенолиза и гиперфибринолиза и повышению риска кровотечений в периоперационном периоде. Недавно было показано, что определенную роль в развитии гиперфибринолиза может играть и урокиназный активатор плазминогена (uPA), экспрессия которого усиливается спустя 3 ч после травмы [166].

Эндотелий. Травматическая коагулопатия сопровождается активацией эндотелия, проявляющейся в том числе высвобождением tPA из телец Вайбеля–Паладе, а также слущиванием гликокаликса, о чем свидетельствует повышение уровня синдекана-1 в плазме пациентов. Слущивание гликокаликса приводит к аутогепаринизации крови пациента, поскольку входящие в его состав гликоз-аминогликаны вызывают противосвертывающий эффект: хондроитинсульфат повышает эффективность ингибирования тромбина тромбомодулином, а гепаран-сульфат — антитромбином [281]. Повышение уровня синдекана-1 ассоциировано с более высокой смертностью пациентов с тяжелой травмой. Кроме того, при травме отмечается дезорганизация плотных контактов между эндотелиальными клетками, что приводит к повышению проницаемости сосудистой стенки, способствует экссудации и эмиграции лейкоцитов. Повышению проницаемости эндотелия частично препятствует повышение в плазме уровня аРС, выполняющего цитопротекторную функцию.

Ятрогенная коагулопатия:

роль гемодилюции, гипотермии и ацидоза

Острая травматическая коагулопатия в дальнейшем усугубляется при соединении *гипотермии* и *ацидоза*, что традиционно обозначается понятием «летальной триады». Это понятие может быть расширено до «летального квартета», если к трем вышеуказанным факторам добавить четвертый — *гемодилюцию*, играющую значительную роль в нарушении гемостатического потенциала крови на начальном этапе реанимационных мероприятий [383].

Гемодилюция присутствует у всех пациентов с острой массивной кровопотерей. Изначально она обусловлена перемещением жидкости из интерстициального пространства во внутрисосудистое по причине снижения внутрисосудистого гидростатического давления (физиологическая аутогемодилюция) [227]. В дальнейшем гемодилюция усиливается в результате инфузионно-трансфузионной терапии [5, 25].

Взаимоотношение между рисками и общим объемом введенной жидкости при острой массивной кровопотере имеет U-образную форму: как недостаточная, так и избыточная инфузия плазмозаменителей ассоциирована с повышением риска смерти пациента [277]. Агрессивная инфузионная терапия при тяжелых травмах увеличивает частоту встречаемости травматической коагулопатии [230], потребность в трансфузии компонентов донорской крови [116] и снижает выживаемость пациентов [160, 191].

Гемодилюция оказывает существенное влияние на систему гемостаза. Разведение факторов свертывания приводит к снижению активности теназных и протромбиназного комплексов. Одновременно снижается и концентрация антикоагулянтов, в том числе антитромбина (антитромбина III). Это приводит к пролонгации полужизни фактора Ха (FXa) и способствует поддержанию генерации тромбина при травме на высоком уровне, несмотря на снижение концентрации факторов свертывания [71]. Кроме того, снижение концентрации фибриногена приводит к уменьшению количества фибрина в кровяном сгустке, а следовательно, и количества несубстратных сайтов (антитромбина I), отвечающих за секвестрирование FXa и тромбина в сгустке. В результате больше тромбина остается в плазме в свободном виде [373]. Показано, что разведение плазмы на 50 % не отражается на генерации тромбина [258].

Характерное для гемодилюции снижение концентрации фибриногена, а также фактора XIII (FXIII) отражается на структуре фибриновой сети. Снижение концентрации фибриногена приводит к формированию более толстых, слабо переплетенных и мало разветвленных нитей фибрина [203, 317], что в итоге обуславливает формирование более проницаемого сгустка с повышенной

подверженностью лизису [115, 347]. Клинически это ассоциировано с увеличением объема кровопотери при травмах и хирургических операциях [90, 115]. Снижение активности FXIII приводит к уменьшению образования «сшивок» между молекулами фибрина, уменьшению механической жесткости и плотности сгустка [78], недостаточному связыванию естественных антифибринолитиков с фибрином [130], нарушению ретракции сгустка и повышению его подверженности лизису [189].

Вместе с тем гемодилюция способствует повышению фибринолитической активности плазмы. Прежде всего, это обусловлено снижением уровня α_2 -антиплазмина (основного ингибитора плазмина) и других естественных антифибринолитиков [70]. Кроме того, отмечается снижение уровня TAFI, отщепляющего концевые остатки лизина на фибриновых нитях, необходимые для связывания и активации плазминогена под влиянием tPA. Гемодилюция приводит также к снижению концентрации PAI-1, что способствует увеличению полужизни tPA, уровень которого при травме повышается вследствие усиленного высвобождения из эндотелиальных клеток под влиянием тромбина, адреналина, вазопрессина, брадикинина и других активаторов [71]. Таким образом, гемодилюция приводит к возникновению условий, с одной стороны способствующих генерации плазмина, а с другой — снижающих резистентность фибриновых нитей к лизису. У некоторых пациентов с травмой это приводит к развитию гиперфибринолиза.

Разведение крови отрицательно сказывается и на эффективности тромбоцитарного звена системы гемостаза. Это обусловлено как снижением содержания тромбоцитов в единице объема крови, так и снижением концентрации в плазме фактора фон Виллебранда (VWF), необходимого для адгезии и агрегации тромбоцитов при высоком напряжении сдвига [178]. Определенную роль играет также обусловленное гемодилюцией снижение гематокрита, поскольку это приводит к уменьшению вязкости крови и, как следствие, к снижению напряжения сдвига в потоке крови. Последнее отрицательно сказывается на взаимодействии VWF с коллагеном субэндотелиального матрикса и дополнительно ограничивает адгезию тромбоцитов.

Гипотермия. На момент госпитализации гипотермия обнаруживается у 10–66 % пациентов с травмами [161, 369, 377]. Средняя температура тела пациентов с травмой и гипотермией составляет 33,5 °С [161]. Гипотермия при травмах независимо ассоциирована с большим объемом кровопотери в периоперационном периоде, большей потребностью в гемотрансфузии и более высокой смертностью [177, 200].

Среди причин гипотермии при тяжелых травмах необходимо отметить нарушение механизмов терморегуляции под влиянием средств для премедикации (бензодиазепинов) и наркоза, а также замедление основного обмена, воздействие низкой температуры воздуха окружающей среды на обнаженные участки тела и инфузию недостаточно теплых плазмозаменителей и компонентов крови [111].

Гипотермия оказывает влияние на все звенья системы гемостаза. Так, гипотермия вызывает секвестрацию тромбоцитов в селезенке и печени и приводит к развитию транзиторной тромбоцитопении, угнетает синтез тромбоксана A_2 (ТХА₂) в тромбоцитах, снижает экспрессию гликопротеиновых рецепторов на их мембране, подавляет агрегацию тромбоцитов [363], снижает взаимодействие между рецепторным комплексом GPIIb-IX-V тромбоцитов и VWF [194], что в целом приводит к снижению эффективности тромбоцитарного звена системы гемостаза.

Гипотермия приводит к снижению скорости реакций коагуляционного звена системы гемостаза [1]. Показано, что при снижении температуры плазмы до 33 °С активность фактора IXa (FIXa), FXa и тромбина снижается до 50 % от нормы и ниже, несмотря на их нормальную концентрацию в плазме [186]. Снижение скорости ферментативных реакций коагуляционного каскада при гипотермии приводит к пролонгации ПВ и АЧТВ, что, однако, не всегда обнаруживается, поскольку большинство скрининговых коагуляционных тестов выполняется при температуре 37 °С [384]. Снижение температуры тела экспериментальных животных до 32 °С приводит к увеличению продолжительности фазы инициации генерации тромбина, что указывает на угнетение активности комплекса фактор VIIa/тканевой фактор (FVIIa/TF) [239].

Данные о влиянии гипотермии на формирование и лизис кровяного сгустка противоречивы. В одном из исследований показано, что снижение температуры крови с 40 до 25 °С приводит к прогрессирующему замедлению формирования сгустка и снижению его плотности [316]. Другие исследователи обнаружили, что гипотермия приводит к замедлению формирования сгустка, не оказывая влияния на его максимальную плотность [195]. В то же время было показано, что гипотермия снижает скорость формирования сгустка, но увеличивает его плотность [303]. Вероятно, изменения в процессе формирования кровяного сгустка обусловлены снижением содержания и/или дисфункцией тромбоцитов, а также снижением синтеза фибриногена в условиях гипотермии [239]. Влияние температуры на фибринолиз изучено недостаточно. Если одни авторы указывают на то, что гипотермия не влияет на выраженность фибринолиза у пациентов с травмой [384], то другие — что гипотермия усиливает фибринолиз [111].

Ацидоз встречается у 40–89 % пациентов с тяжелыми травмами [93, 341, 353]. Развитие ацидоза является независимым предиктором повышенной потребности в гемотрансфузии и более высокой смертности [353]. Установлено, что при снижении pH артериальной крови до 7,0 и ниже риск смерти пациента с травмой увеличивается в три раза [311].

Главной причиной ацидоза при тяжелых травмах и острой массивной кровопотери является гипоперфузия тканей [210]. Снижение органно-тканевого кровотока приводит к развитию циркуляторной гипоксии, накоплению молочной кислоты. Уровень молочной кислоты в плазме, степень ацидемии и дефицита оснований коррелируют с тяжестью полученной травмы [311]. Другой причиной ацидоза является инфузия больших объемов 0,9 % раствора хлорида натрия в качестве плазмозаменителя на начальном этапе реанимации [94]. Инфузия этого раствора приводит к повышению концентрации в плазме ионов хлора, что влечет перемещение ионов бикарбоната во внутриклеточное пространство. В результате их концентрация в плазме снижается, и развивается метаболический гиперхлоремический ацидоз [92].

Снижение рН плазмы вызывает ряд структурных изменений в тромбоцитах, способствующих их элиминации из кровотока [114], оказывает угнетающее влияние на агрегацию тромбоцитов [240].

Ацидоз оказывает отрицательное влияние и на коагуляционное звено системы гемостаза. Так, снижение рН до 7,0 приводит к снижению ферментативной активности FVIIa на 90 %, комплекса FXa/FVa — на 70 % и комплекса FVIIa/TF — на 55 % [248]. Ацидоз увеличивает ПВ и АЧТВ [303], а также подавляет фазу распространения в процессе генерации тромбина [156, 237, 239]. Эти эффекты, вероятно, обусловлены тем, что при повышении концентрации ионов водорода нарушаются ионные взаимодействия факторов свертывания друг с другом, а также с отрицательно заряженными фосфолипидами мембран тромбоцитов [164]. Гипотермия потенцирует угнетение активности факторов свертывания в условиях ацидоза [237, 363].

Влияние ацидоза на уровень и функциональную активность фибриногена изучено недостаточно. Согласно одним данным ацидоз не влияет на синтез фибриногена, но усиливает его расщепление (фибринолиз) [239]. Согласно другим данным концентрация фибриногена при ацидозе не меняется, но нарушается его функция, т. е. участие в формировании фибриновой основы кровяного сгустка.

Данные о влиянии ацидоза на формирование кровяного сгустка также противоречивы. Если в одном исследовании показано, что ацидоз замедляет формирование и снижает максимальную плотность сгустка [303], то в другом — что ацидоз не влияет на формирование кровяного сгустка, но потенцирует обусловленное гипотермией увеличение времени свертывания, снижение скорости формирования и плотности сгустка [113]. Отмечается также наличие сильной корреляционной связи между рН и скоростью уплотнения кровяного сгустка [119]. Влияние ацидоза на лизис сгустка изучено недостаточно. Одни авторы отмечают, что снижение рН приводит к замедлению лизиса сгустка [113], тогда как другие — что ацидоз не оказывает влияния на этот процесс [239].

***Принципы экстренной коррекции гемостатического потенциала
крови при травматической коагулопатии***

Коррекция гемостатического потенциала крови является важнейшим направлением интенсивной терапии при острой массивной кровопотери. Согласно Европейским рекомендациям по ведению пациентов с большим кровотечением и коагулопатией в результате травмы, прежде всего, рекомендуется как можно более раннее (желательно на месте происшествия) введение транексамовой кислоты (ТКК) [346]. Эта рекомендация основывается на результатах клинического исследования CRASH-2, включившего более 20 тыс. пациентов с травмами, в котором было показано, что применение ТКК позволяет уменьшить общую 28-дневную смертность на 1,5 %, в том числе смертность от кровотечения — на 0,8 % [104]. Однако дальнейший анализ результатов этого исследования показал, что введение ТКК в течение 1-го часа после травмы снижает риск смерти от кровотечения на 2,4 %, введение в интервале от 1 до 3 ч после травмы — на 1,3 %, а введение спустя 3 ч и более после травмы, наоборот, повышает риск смерти от кровотечения на 1,3 % [103]. В другом исследовании было установлено, что эффективность ТКК снижается на 10 % каждые 15 мин после травмы [135]. Более того, в двух крупных ретроспективных исследованиях было показано, что введение ТКК при тяжелой травме вообще не дает ожидаемого преимущества в выживаемости [157, 376], и еще в одном проспективном исследовании — что это преимущество получают пациенты только с наиболее тяжелой травмой [97]. Последнее, вероятно, объясняется тем, что именно у этой категории пациентов чаще всего отмечается развитие гиперфибринолиза, на подавление которого и направлено действие ТКК.

Зависимость эффектов ТКК от времени, прошедшего после травмы, может быть обусловлена участием различных механизмов поддержания фибринолитической активности в различные периоды после травмы. Так, в первые часы после травмы отмечается повышение уровня tPA, а спустя 3 ч — повышение уровня uPA [166]. Несмотря на то что оба активатора плазминогена выполняют одну и ту же основную каталитическую функцию (превращение плазминогена в плазмин), их

молекулярная структура и механизм действия существенно отличаются [32], что может отразиться на эффективности ТКК в условиях гиперфибринолиза, вызываемого tPA и uPA. В связи с этим перспективным представляется дифференцированный подход к назначению этого препарата, который учитывал бы индивидуальные особенности нарушения гемостатического потенциала крови пациента (степень гемодилюции, степень повышения фибринолитической активности плазмы, механизмы индукции гиперфибринолиза и другие).

После поступления пациента с тяжелой травмой и большим кровотечением в специализированное медицинское учреждение (а в некоторых случаях и на догоспитальном этапе) приступают к *начальной гемостатической реанимации*, под которой понимается комплекс мероприятий по эмпирической гемостатической поддержке пациента до получения первых результатов гемостазиологического мониторинга. Европейские рекомендации по ведению пациентов с большим кровотечением и коагулопатией в результате травмы предусматривают возможность применения двух подходов к начальной гемостатической реанимации [346]. Первый подход заключается в трансфузии плазмы и эритроцитов в соотношении доз не менее 1:2, второй подход — во введении концентрата фибриногена и трансфузии эритроцитов. Однозначного ответа на вопрос, какой из этих подходов лучше, на сегодняшний день нет. Тем не менее одно из исследований (RETIC), в которых сравнивались эти подходы к начальной гемостатической реанимации, было прекращено досрочно из-за однозначно большей выгоды для пациентов применения концентратов факторов свертывания по сравнению с плазмой [175].

Сразу после получения результатов гемостазиологического мониторинга приступают к *целенаправленной гемостатической терапии*. Показанием к ее началу является превышение нормальных значений ПВ и/или АЧТВ в 1,5 раза и более и/или наличие признаков дефицита факторов свертывания по данным вязкоэластических методов исследования [9]. В настоящее время общепринятыми являются два подхода к проведению целенаправленной гемостатической терапии. Первый подход основан на использовании донорской плазмы, второй — на использовании концентратов факторов свертывания [346]. При этом одной из

главных задач является повышение уровня фибриногена, поскольку при травмах его уровень снижается раньше и в большей степени по сравнению с уровнем других факторов свертывания [165]. Медианный уровень фибриногена у пациентов с травматической коагулопатией составляет 0,9 мг/мл [272]. Гипофибриногенемия (концентрация фибриногена в плазме ниже 1,5 г/л) ассоциирована с бóльшим объемом кровопотери и повышенной смертностью пациентов с травмой [14, 22, 266].

Переливание плазмы и эритроцитов в соотношении доз от 1 : 2 до 1 : 1 в целом обеспечивает снижение смертности пациентов с критическим кровотечением [170], однако этот подход имеет существенные ограничения. Показано, что концентрация фибриногена и других факторов свертывания в свежемороженой плазме невелика и варьирует от 1 до 3 г/л, а в патогенинактивированной плазме редко превышает 2 г/л [351]. По этой причине трансфузия плазмы не всегда позволяет повысить уровень фибриногена у пациента с гипофибриногенемией, а в ряде случаев может даже привести к его снижению (если концентрация фибриногена в донорской плазме окажется ниже, чем в плазме пациента) [134, 197, 198]. Необходимо также учитывать, что свежемороженная плазма не может быть перелита немедленно, поскольку некоторое время требуется для ее оттаивания. В связи с этим переливание плазмы проводится несколько позднее, чем переливание эритроцитов, а следовательно, целевое соотношение доз между ними достигается не сразу, а с задержкой. В период этой задержки уровень фибриногена снижается вследствие разведения плазмы пациента переливаемой эритроцитарной массой [154]. В то же время необходимо избегать избыточной трансфузии плазмы, поскольку это может привести к разведению эритроцитов и тромбоцитов в крови пациента [198, 293]. Разведение эритроцитов и снижение концентрации гемоглобина до 70–90 г/л потребует очередной трансфузии эритроцитов, а снижение содержания тромбоцитов до $50 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ потребует трансфузии тромбоцитарного концентрата [346]. Переливание дополнительных доз эритроцитов и тромбоцитов неизбежно приведет к разведению плазмы, так что целевой уровень факторов свертывания в плазме пациента так и не будет достигнут [174]. Кроме того, трансфузия плазмы ассоциирована с риском развития циркуляторной перегрузки,

острого повреждения легких, синдрома полиорганной недостаточности и других осложнений [20, 52, 185, 314].

В отличие от донорской плазмы использование концентратов факторов свертывания позволяет существенно повысить их уровень в плазме пациента без эффекта гемодилюции. Например, введение 2 г фибриногена (100 мл концентрата) эквивалентно введению 4 единиц (около 800 мл) свежезамороженной плазмы [268]. Преимущество использования концентратов факторов свертывания по сравнению с донорской плазмой заключается еще и в том, что это позволяет уменьшить риски, связанные с трансфузией компонентов аллогенной крови, сократить время от момента возникновения травмы до начала терапевтического вмешательства (на подготовку концентратов факторов свертывания к введению пациенту требуется меньше времени, чем на подготовку компонентов крови), более точно дозировать количество вводимых факторов свертывания и т. д. [327]. В связи с этим при проведении целенаправленной гемостатической терапии все чаще предпочтение отдается именно концентратам факторов свертывания [346]. В настоящее время для коррекции гемостатического потенциала крови при травматической коагулопатии рекомендовано использование концентрата фибриногена, концентрата протромбинового комплекса (КПК) и концентрата FXIII.

Множество исследований показали, что повышение концентрации фибриногена в плазме способствует формированию более плотной фибриновой сети, состоящей из тонких, более разветвленных и переплетенных нитей фибрина, что приводит к увеличению плотности кровяного сгустка. Несмотря на это данные о клинической эффективности концентрата фибриногена у пациентов с острой массивной кровопотерей противоречивы. Так, в одних исследованиях показано, что применение концентрата фибриногена у кардиохирургических пациентов и пациентов с тяжелыми травмами достоверно снижает объем послеоперационной кровопотери, потребность в гемотрансфузии и частоту полиорганной недостаточности [132, 175, 345]. При этом в других исследованиях показано, что применение концентрата фибриногена не снижает объем кровопотери или потребности в компонентах донорской крови при проведении кардиохирур-

гических [68, 226], урологических операций [343], операций по трансплантации печени [319], операций у пациентов с тяжелыми травмами [269] и не оказывает влияния на объем послеродового кровотечения [388].

Причины недостаточной клинической эффективности концентрата фибриногена до конца не исследованы. Возможно, это обусловлено использованием невысоких доз этого препарата (с целью минимизировать риск тромботических осложнений) и неопределенностью целевого уровня фибриногена в плазме [67, 226]. Действительно, рекомендованные дозы концентрата фибриногена составляют 25–50 мг/кг или 3–4 г [212, 346], что позволяет поддерживать концентрацию фибриногена в плазме на уровне 1,5–2,0 г/л [142]. Использование таких невысоких доз препарата, очевидно, обусловлено соображениями безопасности — желанием минимизировать риск тромботических событий, характерных для гиперфибриногенемии. Нельзя исключить, что в ряде случаев невысокая эффективность концентрата фибриногена могла быть обусловлена пониженной генерацией тромбина вследствие дефицита других факторов свертывания. Исходя из этого можно предположить, что использование концентрата фибриногена в сочетании с другими концентратами факторов свертывания может обеспечить лучший гемостатический эффект, однако влияние таких комбинаций на гемостатический потенциал крови изучено недостаточно.

Все чаще для экстренной коррекции гемостатического потенциала крови у пациентов с тяжелой травмой применяются КПК [11, 42, 346]. В зависимости от состава они могут быть трехфакторными [содержат протромбин (FII), FIX и FX] и четырехфакторными (содержат также FVII). Активированный КПК (АКПК) содержит FII, FIX и FX преимущественно в неактивированном виде и FVII преимущественно в активированном виде (FVIIa). Механизм действия этих препаратов сводится главным образом к увеличению протромбиназной активности на мембране тромбоцитов и, как следствие, к усилению генерации тромбина. При этом основными действующими компонентами препарата являются FII и FX, образующие фермент-субстратный комплекс и действующие синергетически. Введенный FX активируется, фиксируется на мембране активированных

тромбоцитов и при участии FVa активирует введенный FII, вызывая тромбиновый «взрыв» [168, 371].

Как правило, КПК назначается пациентам, у которых кровотечение развивается на фоне приема антагонистов витамина К или других оральных антикоагулянтов. В последнее время появляются работы, в которых описывается опыт применения КПК и у пациентов, не получающих оральных антикоагулянты [179]. Применение КПК у данной категории пациентов требует особой осторожности, поскольку этот препарат вызывает стойкое увеличение эндогенного тромбинового потенциала, продолжающееся в течение 3–4 дней [148], притом что у большинства пациентов с травмой генерация тромбина не снижается, а в некоторых случаях оказывается даже повышенной [117]. Назначение КПК этим пациентам может привести к повышенному риску тромботических осложнений. В связи с этим применение КПК у пациентов с травмой рекомендуется только при наличии признаков недостаточной генерации тромбина, что отмечается только при значительном дефиците факторов свертывания (менее 35 % от нормы) [328]. Только в этом случае введение КПК при травматической коагулопатией можно считать оправданным.

По данным ретроспективных исследований, по сравнению с плазмой, применение КПК у пациентов с травмой, не получающих оральных антикоагулянтов, позволяет быстрее достигать коррекции МНО и в большей степени снижает потребность в трансфузии эритроцитов [179]. В единственном на сегодняшний день проспективном исследовании, в котором проводилось сравнение эффективности концентратов факторов свертывания и свежезамороженной плазмы, КПК был использован лишь у 16 % пациентов, что не позволило сделать однозначный вывод об эффективности и безопасности данного препарата [148]. Примечательно, что во всех указанных выше исследованиях применялись неактивированные КПК. Влияние АКПК на гемостатический потенциал у пациентов с травмами остается практически не исследованным.

Дефицит FXIII (концентрация менее 60 %) отмечается у части пациентов с тяжелыми травмами, у кардио- и нейрохирургических пациентов, у пациенток с

послеродовым кровотечением [219]. Снижение уровня FXIII ассоциировано с повышением объема кровопотери в послеоперационном периоде [143]. Исходя из этого введение концентрата FXIII с целью коррекции гемостатического потенциала крови представляется целесообразным. Механизм действия FXIII заключается в том, что после активации тромбином FXIII (FXIIIa) катализирует образование изопептидных связей («сшивок») между остатками глутамина и лизина соседних молекул фибрина. «Сшивание» молекул фибрина друг с другом приводит к увеличению плотности и механической жесткости как отдельных нитей фибрина, так и всей фибриновой сети в целом. По мере увеличения активности FXIII уменьшается диаметр нитей фибрина, увеличивается степень их переплетения и разветвленности, уменьшается пористость фибринового сгустка [78]. FXIIIa обеспечивает также инкорпорирование в состав сгустка α_2 -антиплазмин и других антифибринолитиков, путем их связывания с остатками лизина на поверхности фибриновых нитей. Угнетение фибринолиза при этом достигается как за счет реализации специфических эффектов указанных молекул, так и за счет уменьшения количества свободных остатков лизина на фибриновых нитях, служащих сайтами для связывания tPA, плазминогена и пламина. Связывание естественных антифибринолитиков с фибрином является основным механизмом антифибринолитического действия FXIII [130]. Кроме того, FXIIIa обеспечивает ковалентное связывание нитей фибрина с интегринами $\alpha IIb\beta 3$ и другими рецепторами, входящими в состав богатых сфингомиелином липидных рафтов на мембране тромбоцитов, что является обязательным условием для ретракции тромба (кровяного сгустка) [189].

В настоящее время проведено небольшое количество исследований о влиянии концентрата FXIII на объем периоперационной кровопотери, и в целом они свидетельствуют о невысокой эффективности этого препарата. Так, показано, что введение концентрата FXIII кардиохирургическим пациентам по окончании операции не оказывало влияния на потребность в гемотрансфузии [188]. В другом исследовании FXIII вводили пациентам с повышенным риском большого кровотечения во время операции по поводу рака желудочно-кишечного тракта. Несмотря

на то что введение этого препарата повышало плотность сгустка, это не влияло на объем кровопотери и потребность в гемотрансфузии [207]. До настоящего времени специальные рандомизированные контролируемые исследования концентрата FXIII у пациентов с тяжелыми травмами не проводились.

Возможно, что недостаточная клиническая эффективность концентрата FXIII была обусловлена тем, что его использовали у пациентов, у которых уровень FXIII не достигал критически низкого значения, т. е. имевшегося в их крови FXIII было достаточно для максимальной стабилизации фибриновой сети, а следовательно, в увеличении уровня FXIII не было смысла. Возможно также, что у некоторых пациентов уровень FXIII, наоборот, был настолько низким, что введение концентрата FXIII не позволяло увеличить уровень FXIII в плазме до минимально необходимого. В пользу этого предположения свидетельствует исследование, в котором было показано, что назначение этого препарата является эффективным только тогда, когда это позволяет повысить уровень FXIII в плазме до 70 % и более [143]. Европейские рекомендации по ведению пациентов с большим кровотечением и коагулопатией в результате травмы указывают на необходимость мониторинга и коррекции уровня FXIII в случае его дефицита у пациентов с тяжелыми травмами, хотя оптимальный уровень FXIII при травматической коагулопатии не определен [346]. Тем не менее два недавних исследования показали, что использование концентрата FXIII при снижении уровня FXIII в плазме ниже 60 % (в сочетании с другими гемостатическими препаратами) обеспечило снижение потребности в гемотрансфузии и смертности пациентов [175, 351]. Вышеизложенное указывает на потенциальную эффективность концентрата FXIII при острой массивной кровопотере и на необходимость дальнейшего изучения его эффектов при тяжелых травмах, а также эффектов, вызываемых при его использовании в комбинации с другими гемостатическими препаратами.

Использование rFVIIa в качестве терапии первой линии при тяжелой травме не рекомендуется и может быть рассмотрено только тогда, когда надлежащее применение методов хирургического гемостаза, антифибринолитиков, компонентов крови, а также концентрата фибриногена (или криопреципитата) и других

факторов свертывания оказалось недостаточным для купирования кровотечения [346]. Было показано, что применение rFVIIa может быть рассмотрено в том случае, когда кровотечение продолжается, несмотря на гематокрит более 24 %, содержание тромбоцитов более $50 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ и уровень фибриногена в плазме более 1,5–2,0 г/л. Кроме того, важнейшим условием применения rFVIIa является коррекция гипотермии, ацидоза и гипокальциемии [286]. Возможно, что несоблюдение каких-либо из этих условий стало причиной того, что применения rFVIIa у пациентов с тяжелой травмой хотя и приводило к снижению количества трансфузий, не вызывало снижения смертности в ряде других исследований [159].

Таким образом, коррекция гемостатического потенциала крови у пациентов с острой массивной кровопотерей по-прежнему представляет собой большую проблему. Несмотря на разработку и внедрение новых алгоритмов гемостатической терапии, основанных на применении антифибринолитиков и концентратов факторов свертывания, их эффективность и безопасность требует дальнейшего изучения. Взаимодействие между различными концентратами факторов свертывания при их одновременном использовании, зависимость их эффектов от степени и механизмов нарушения гемостатического потенциала крови у пациента.

1.2. Первичная иммунная тромбоцитопения

Тромбоцитопения — это состояние, характеризующееся снижением содержания тромбоцитов в периферической крови ниже $150 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$. Следует отметить, что содержание тромбоцитов в интервале от 149×10^9 до $100 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ («пограничная» тромбоцитопения) при нормальном содержании других форменных элементов крови, продолжающееся более 6 месяцев, не всегда указывает на наличие какой-либо патологии [349]. В связи с этим в настоящее время обсуждается вопрос о снижении нижней границы нормы для содержания тромбоцитов в периферической крови до $100 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ [350].

Поскольку снижение содержания тромбоцитов приводит к увеличению склонности пациента к кровотечениям, тяжесть тромбоцитопении определяют с учетом выраженности геморрагического синдрома: 1) легкая тромбоцитопения

характеризуется содержанием тромбоцитов более $50 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ и отсутствием каких-либо симптомов кровоточивости; 2) умеренная тромбоцитопения характеризуется содержанием тромбоцитов в диапазоне от 20×10^9 до $50 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ и увеличением риска больших кровотечений при травмах и хирургических операциях, при этом спонтанные кровотечения, как правило, отсутствуют; 3) тяжелая тромбоцитопения характеризуется содержанием тромбоцитов менее $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ и увеличением риска больших спонтанных кровотечений, угрожающих жизни пациента [193, 359]. Снижение содержания тромбоцитов в крови ниже $10 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ требует оказания неотложной медицинской помощи пациенту. Если тромбоцитопения сочетается с нарушениями функций тромбоцитов (тромбоцитопатией), большие спонтанные кровотечения могут возникать и при более высоком содержании тромбоцитов [95].

В зависимости от изменений клеточного состава периферической крови различают: 1) тромбоцитопению, сопровождающуюся изменением содержания в крови других форменных элементов, и 2) тромбоцитопению, не сопровождающуюся изменением содержания в крови других форменных элементов (изолированная тромбоцитопения) [33].

Большая часть случаев изолированной тромбоцитопении приходится на первичную иммунную тромбоцитопению (ИТП, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, болезнь Верльгофа). Это приобретенное аутоиммунное заболевание, характеризующееся изолированным снижением содержания тромбоцитов в периферической крови ниже $100 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ при отсутствии признаков других заболеваний или состояний, сопровождающихся снижением содержания тромбоцитов [101, 309]. На долю первичной ИТП приходится около 80 % всех случаев ИТП. Распространенность первичной ИТП в мире составляет 4,5–20 случаев на 100 000 населения, заболеваемость — 1,6–3,9 случаев на 100 000 населения в год [358]. Заболеваемость первичной ИТП в одном регионе РФ (Тульская область) составляет 3,2–3,7 случая на 100 000 населения в год [35, 36].

По длительности течения заболевания различают следующие формы первичной ИТП: 1) впервые диагностированная — длительность заболевания менее 3 месяцев от момента диагностики; 2) персистирующая — длительность

заболевания от 3 до 12 месяцев от момента диагностики; 3) хроническая — длительность заболевания более 12 месяцев от момента диагностики [309].

Этиология первичной ИТП изучена недостаточно. В качестве триггера, дающего начало заболеванию, в 59 % случаев выступают различные вирусные инфекции, реже — беременность, хирургические операции, вакцинация [35, 50].

Снижение содержания тромбоцитов при первичной ИТП, прежде всего, связано с разрушением циркулирующих тромбоцитов. Около 60 % случаев это обусловлено образованием аутоантител к человеческим тромбоцитарным антигенам (НРА), локализованным на гликопротеиновых рецепторах тромбоцитов, прежде всего на интегринах $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (~70 %) и комплексе GPIb-IX-V (~25 %), а также на интегринах $\alpha 2\beta 1$ и рецепторе GPVI (~5 %) [88, 354]. Указанные антитела представляют собой преимущественно IgG и в меньшей степени IgA и IgM. Образовавшиеся аутоантитела связываются с соответствующими антигенами на мембране тромбоцитов и, действуя в качестве опсонинов, способствуют фагоцитозу тромбоцитов макрофагами красной пульпы селезенки. Макрофаги других органов тоже могут участвовать в элиминации опсонизированных тромбоцитов, но вклад их, как правило, является менее значимым. Кроме того, аутоантитела, связавшиеся с рецепторами тромбоцитов, могут вызывать активацию системы комплемента на их мембране. Образующиеся при этом фрагменты C3b, будучи опсонинами, способствуют фагоцитозу тромбоцитов, а формирующийся мембраноатакующий комплекс вызывает их непосредственный лизис. Недавно был продемонстрирован еще один механизм элиминации тромбоцитов с участием аутоантител. В частности, было показано, что связывание аутоантител с рецепторным комплексом GPIb-IX-V приводит к транслокации на поверхность тромбоцитов фермента нейраминидазы-1. Этот фермент вызывает десИАлирование поверхностных гликопротеинов тромбоцитов. При прохождении через синусоиды печени десИАлированные тромбоциты распознаются рецепторами Ашвелла–Морелла гепатоцитов (печеночными рецепторами асиалогликопротеинов) и фиксируются на их мембране. Затем фиксированные тромбоциты фагоцитируются как самими гепатоцитами, так и рядом расположенными клетками Купфера [220, 221].

Угнетение мегакариопоэза также играет значительную роль в патогенезе первичной ИТП. Несмотря на нормальное или даже повышенное количество мегакариоцитов в костном мозге при данной патологии, морфология этих клеток имеет специфические особенности [110]. В основе изменений, обнаруживаемых в мегакариоцитах при первичной ИТП, может лежать связывание аутоантител с интегринами $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и комплексом GPIb-IX-V на мембране мегакариоцитов. Показано, что это приводит к повреждению мегакариоцитов, нарушению образования ими протромбоцитарных псевдоподий и последующего отделения тромбоцитов [176]. У некоторых пациентов дисфункция мегакариоцитов связана с образованием аутоантител к рецепторам тромбопоэтина [215], являющегося важнейшим фактором роста для этих клеток. Снижение мегакариопоэза при ИТП может быть связано и со снижением уровня тромбопоэтина в плазме [304]. Основным стимулом, индуцирующим экспрессию гена этого фактора роста в гепатоцитах, является активация рецепторов Ашвелла–Морелла, способных фиксировать десалирированные (старые) тромбоциты. При первичной ИТП в результате снижения содержания тромбоцитов, в т. ч. десалирированных тромбоцитов, стимуляция этих рецепторов уменьшается, и продукция тромбопоэтина снижается [220, 221].

Существенный вклад в патогенез первичной ИТП могут вносить и аутореактивные цитотоксические Т-лимфоциты, способные распознавать антигены на мембране тромбоцитов и/или мегакариоцитов. Показано, что их роль особенно велика у пациентов, у которых не удается обнаружить антипротромбоцитарные аутоантитела [65]. Определенное значение имеет снижение содержания регуляторных Т- и В-лимфоцитов и плазмоцитоидных дендритных клеток, увеличение соотношения между лимфоцитами Th1 и Th2, увеличение соотношения между лимфоцитами Tc1 и Tc2, увеличение содержания лимфоцитов Th17 и другие изменения в системе иммунитета.

Наследственная предрасположенность также играет роль в развитии первичной ИТП [233, 392]. Так, показано, что полиморфизмы генов, кодирующих различные цитокины (TNF- β , TNF- α , IL-4, IL-10 и др.), каннабиноидные рецепторы

клеток иммунной системы и различные другие молекулы, ассоциированы с большим риском развития первичной ИТП, определенным возрастом начала и характером течения этого заболевания.

У большинства пациентов с первичной ИТП содержание тромбоцитов в крови составляет более $30\text{--}50 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, что достаточно для обеспечения нормального гемостаза (спонтанная кровоточивость отсутствует) и не снижает качества жизни [35]. Однако при снижении содержания тромбоцитов ниже $30 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ риск спонтанных кровотечений существенно возрастает. Геморрагический синдром проявляется в виде петехий и экхимозов на коже и слизистых, носовых и десневых кровотечений, мено- и метроррагии, реже — в виде желудочно-кишечных кровотечений и гематурии [31]. Тяжелые кровотечения (не включая черепно-мозговые кровоизлияния), требующие незамедлительного оказания медицинской помощи, регистрируются у 20,2 % пациентов детского и 9,6 % пациентов взрослого возраста [276]. Особенно тяжело протекают черепно-мозговые кровоизлияния, представляющие наибольшую опасность для жизни пациента, встречаются у 0,4 % пациентов детского и 1,4 % пациентов взрослого возраста, из них каждый четвертый случай заканчивается летальным исходом [276, 357].

Важной задачей является выявление пациентов с высоким риском развития тяжелых кровотечений. Одним из предикторов тяжелых кровотечений является снижение содержания тромбоцитов в периферической крови ниже $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ [313] или ниже $10 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ [76]. Тем не менее тяжесть кровотечений у пациентов с первичной ИТП не всегда коррелирует с тяжестью тромбоцитопении, особенно при низких значениях содержания тромбоцитов. Если в одном исследовании была выявлена умеренная корреляционная связь между тяжестью кровотечения и содержанием тромбоцитов в диапазоне менее $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ [199], то в другом исследовании не было обнаружено связи между тяжестью кровотечения и содержанием тромбоцитов в диапазоне менее $30 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ [282]. Еще в одном исследовании корреляция между тяжестью кровотечения и содержанием тромбоцитов обнаруживалась не в каждой группе пациентов и не во всех точках исследования [284]. Кроме того, описан случай возникновения черепно-мозгового кровоизлияния

у пациента с ИТП при содержании тромбоцитов $120 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ [335], что нетипично для данной патологии.

Одним из возможных объяснений отсутствия четкой связи между тяжестью кровотечений и содержанием тромбоцитов у пациентов с первичной ИТП является наличие у некоторых из них сопутствующей тромбоцитопатии, которая может выражаться как в усилении, так и угнетении функций тромбоцитов [249]. Оценка функции тромбоцитов в условиях тромбоцитопении представляет собой большую проблему, поскольку содержание тромбоцитов оказывает прямое влияние на показатели большинства методов исследования тромбоцитарного звена системы гемостаза [40, 41]. Например, световая трансмиссионная агрегометрия, являющаяся методом «золотого стандарта», не может дать объективную оценку агрегационной способности тромбоцитов при их содержании в обогащенной тромбоцитами плазме менее $150 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ [122]. Такое же ограничение накладывается и на методы глобальной оценки системы гемостаза, учитывающих одновременно вклад всех клеточных и плазменных компонентов системы гемостаза в их взаимосвязи в формирование гемостатического потенциала крови [283]. Например, поскольку активированные тромбоциты предоставляют отрицательно заряженную фосфолипидную поверхность для сборки теназного и протромбиназного комплексов, снижение их содержания в крови приводит к снижению генерации тромбина и, как следствие, показателей теста генерации тромбина. Поскольку другой важнейшей функцией тромбоцитов является генерация контрактильной силы и ее трансмиссия на нити фибрина, что необходимо для уплотнения кровяного сгустка, тромбоцитопения существенно влияет на вязкоэластические свойства кровяного сгустка и, следовательно, на показатели таких тестов, как ротационная тромбоэластометрия (ROTEM) и тромбоэластография.

Эти обстоятельства указывают на необходимость поиска дополнительных возможностей для оценки функций тромбоцитов в условиях тромбоцитопении. Поскольку оценка функциональной активности тромбоцитов в условиях тромбоцитопении затруднена, назначение профилактической терапии при первичной ИТП при необходимости провести хирургическое вмешательство базируется на реко-

мендациях экспертов, в которых учитывается только содержание тромбоцитов и функция тромбоцитов не принимается во внимание. Пациенты получили бы выгоду, если бы назначение терапии основывалось не только на тяжести тромбоцитопении, но и учитывало бы наличие/отсутствие сопутствующей дисфункции тромбоцитов.

Принципы экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при первичной иммунной тромбоцитопении

Основная цель терапии при первичной ИТП — это достижение безопасного уровня тромбоцитов в периферической крови, предупреждающего или купирующего геморрагический синдром, а не коррекция содержания тромбоцитов до нормальных показателей. Безопасным считается количество тромбоцитов не менее $50 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, что обеспечивает нормальное существование пациента без спонтанной кровоточивости и не снижает качества его жизни [34, 35].

При снижении содержания тромбоцитов ниже $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, а также при наличии геморрагического синдрома (вне зависимости от содержания тромбоцитов) пациентам с первичной ИТП показано незамедлительное введение высоких доз глюкокортикоидов и/или внутривенного иммуноглобулина (терапия «скорой помощи»), однако гемостатический эффект при использовании этих препаратов наступает только на 1–2-й день после начала лечения [34, 35]. В связи с этим пациентам с первичной ИТП нередко проводят переливание тромбоцитарного концентрата [320]. Это позволяет добиться немедленного увеличения содержания тромбоцитов в крови пациента. Несмотря на то что этот эффект продолжается всего в течение нескольких минут или часов, этого времени бывает достаточно, чтобы дожидаться начала действия внутривенного иммуноглобулина и глюкокортикоидов [275]. Существенным недостатком переливания донорских тромбоцитов является высокий риск аллоиммунизации пациента, т. е. образования аллоантител против человеческих лейкоцитарных (HLA) и тромбоцитарных (HPA) антигенов, представленных на мембране тромбоцитов. Антитромбоцитарные аллоантитела образуются у 20–60 % пациентов, получавших трансфузии тромбоцитарного

концентрата, и являются причиной рефрактерности пациентов к последующим трансфузиям тромбоцитов [55, 255]. Кроме того, использование этого препарата крови связано с риском аллергических реакций, передачи инфекции и других осложнений [4, 20]. В связи существует потребность в дополнительных методах экстренной коррекции гемостатического потенциала крови в условиях тяжелой тромбоцитопении.

Существуют различные гемостатические препараты, которые могли бы быть использованы в качестве альтернативы трансфузии тромбоцитарного концентрата для экстренной коррекции гемостаза при первичной ИТП, однако в настоящее время ни один из них не одобрен для применения при этой патологии [112]. При этом имеются данные об использовании концентрата rFVIIa вне инструкции для остановки тяжелого кровотечения у пациентов с ИТП. В большинстве случаев введение этого препарата позволяло достичь остановки кровотечения, хотя случаи неэффективного применения, закончившиеся смертью пациента от кровопотери, также известны [151]. Рандомизированные контролируемые исследования эффективности применения rFVIIa для купирования тяжелых кровотечений в условиях тромбоцитопении до настоящего времени не проводились. При тщательном анализе литературы нам не удалось обнаружить сведений о применении концентрата фибриногена, концентрата FXIII или каких-либо иных концентратов факторов свертывания для коррекции гемостатического потенциала крови у пациентов тяжелой тромбоцитопенией. Имеются единичные публикации об использовании десмопрессина для купирования кровотечений в условиях тромбоцитопении [87]. Антифибринолитики редко используются для купирования кровотечений у пациентов с иммунной и другими формами тромбоцитопенией, и их эффективность в условиях тромбоцитопении вызывает сомнения [120].

Таким образом, снижение содержания тромбоцитов в периферической крови ниже $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ при первичной ИТП ассоциировано с риском развития тяжелых, трудноконтролируемых кровотечений, представляющих угрозы жизни пациентов. Прогнозирование кровотечения затруднено из-за отсутствия общепринятых методов оценки функции тромбоцитов в условиях тромбоцитопении. При этом

возможности незамедлительной коррекции гемостатического потенциала при этой патологии сводятся к трансфузии тромбоцитарного концентрата, применение которого связано с риском различных осложнений. Работы последних лет указывают на возможность использования концентрата rFVIIa в качестве альтернативы трансфузии тромбоцитарного концентрата. Сведения о применении других гемостатических препаратов для купирования кровотечений у пациентов с первичной ИТП практически отсутствуют. Кроме того, отсутствуют методы для быстрой предварительной оценки потенциальной эффективности от назначения того или иного гемостатика конкретному пациенту.

1.3. Тромбастения Гланцмана

Тромбастения Гланцмана (ТГ) — это наследственное геморрагическое заболевание, характеризующееся снижением количества и/или нарушением функции интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов. Название этой патологии связано с именем швейцарского педиатра Эдварда Гланцмана, который в 1918 г. впервые описал ее и назвал «врожденной геморрагической тромбоастенией». ТГ относится к категории редких заболеваний и в то же время является одной из наиболее известных и часто встречающихся наследственных тромбоцитопатий [19, 49]. Ее распространенность в мире составляет около 1 случая на 1 000 000 населения, однако в регионах с высокой частотой близкородственных браков распространенность может достигать 1 случая на 200 000 населения. Вероятно, распространенность ТГ недооценивается вследствие гиподиагностики [146].

В основе ТГ лежат мутации в генах *ITGA2B* и/или *ITGB3*, расположенных на длинном плече 17-й хромосомы (12q21) и кодирующих соответствующие полипептидные цепи интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [296, 344]. Как правило, эти мутации обуславливают преждевременную терминацию синтеза или изменение первичной структуры белковой части субъединиц интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, что приводит к нарушению их процессинга в комплексе Гольджи мегакариоцитов и быстрой протеасомной деградации. В результате количество интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов снижается. В некоторых случаях мутации не вызывают сущест-

венного снижения количества интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов, но приводят к значительному нарушению их функции, в т. ч. к нарушению конформационной активации и утрате способности связываться с лигандами. Необходимо отметить, что дисфункция интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ может быть обусловлена не только мутациями в генах *ITGA2B* и *ITGB3*, но и мутациями в генах, кодирующих белки различных сигнальных путей, ведущих к активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, — например, мутацией в гене *FERMT3*, кодирующем белок киндлин-3 [263]. В этом случае развивается патология, фенотипически не отличимая от ТГ.

Поскольку подавляющее большинство мутаций, лежащих в основе ТГ, рецессивны, симптомы кровоточивости обнаруживаются у гомозигот или сложных гетерозигот. У простых гетерозигот на мембране тромбоцитов присутствует достаточное количество функционально полноценных интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, и поэтому они являются здоровыми носителями дефектного гена [265]. Доминантные мутации являются исключением для ТГ [190].

Интегрины $\alpha\text{IIb}\beta 3$ — это самые многочисленные рецепторы тромбоцитов. В норме на мембране каждого тромбоцита насчитывается около 100 000 этих рецепторов. В зависимости от степени снижения количества интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов различают три типа ТГ: 1) тип 1 — встречается в ~75 % случаев и характеризуется крайне низким количеством интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, составляющим менее 5 % от нормы; 2) тип 2 — встречается в ~15 % случаев и характеризуется снижением количества интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ до 5–20 % от нормы; 3) вариантный тип — встречается в ~10 % случаев, количество интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ при этом составляет более 20 % (нередко 60–100 %) от нормы, но функция их значительно нарушена [296].

Помимо врожденных форм ТГ, обусловленных мутациями в генах, кодирующих первичную структуру белковой части субъединиц интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, существует и приобретенная форма ТГ, обусловленная образованием аутоантител или парапротеинов, способных связываться с интегринными $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и тем самым нарушать их функцию [58]. Возникновение приобретенной ТГ описано у пациентов

с лимфомой Ходжкина, миеломной болезнью, иммунной тромбоцитопенией и другими заболеваниями.

Хотя морфология и содержание тромбоцитов в периферической крови при ТГ в подавляющем большинстве случаев остается в пределах нормальных значений, дефицит и/или дисфункция интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ приводит к тяжелому нарушению первичного гемостаза. Так, при ТГ нарушается способность тромбоцитов распластываться на поверхности внеклеточного матрикса и образовывать фокальные адгезионные контакты, что делает их адгезию неустойчивой [153]. Классическим признаком ТГ является также отсутствие агрегации тромбоцитов при их стимуляции с помощью тромбина, АДФ, адреналина, арахидоновой кислоты и других агонистов, поскольку вызываемая ими агрегация требует обязательного участия интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и их лиганда — фибриногена. Дефицит и/или дисфункция интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ обуславливает нарушение способности тромбоцитов генерировать контрактильную силу и передавать ее во внеклеточное пространство — на соседние тромбоциты и нити фибрина, что приводит к значительному замедлению или отсутствию ретракции тромба или кровяного сгустка [295]. Другим проявлением дисфункции тромбоцитов при ТГ является снижение экспрессии фосфатидилсерина и шеддинга содержащих фосфатидилсерин тромбоцитарных микрочастиц, что обуславливает сокращение суммарной площади прокоагулянтной поверхности и приводит к снижению генерации тромбина [246]. Недостаточная генерация тромбина и неспособность тромбоцитов реализовать свою контрактильную функцию приводят к формированию более пористой и рыхлой фибриновой сети, отличающейся повышенной чувствительностью к фибринолизу [162].

Вышеуказанные нарушения функций тромбоцитов обуславливают склонность пациентов с ТГ к кровоточивости. По данным международного регистра пациентов с ТГ у 53 % первые геморрагические проявления обнаруживались в течение первого года жизни и у 85 % — до достижения 14-летнего возраста [295]. Носовые и десневые кровотечения, меноррагии, петехиальные кровоизлияния в кожу и слизистые, подкожные гематомы, кровотечения из желудочно-кишечного

тракта — типичные проявления кровоточивости при данной патологии. Особую опасность ввиду высокого риска большой кровопотери представляют кровотечения при травмах, хирургических операциях и родах. У 84 % пациентов с ТГ хотя бы один раз в жизни кровотечение требовало трансфузии эритроцитарной массы [72, 136]. Хотя частота кровотечений с летальным исходом при ТГ невелика, в целом данная патология считается тяжелым геморрагическим заболеванием.

Тяжесть спонтанных кровотечений при ТГ непредсказуема и варьирует от единичных петехий до тяжелых кровопотерь, угрожающих жизни пациента. Примечательно отсутствие зависимости между количеством интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ на мембране тромбоцитов или типом мутации, лежащей в основе ТГ, и тяжестью кровотечения [106, 136]. Даже среди пациентов с идентичными мутациями тяжесть геморрагического синдрома существенно отличается, что указывает на вовлеченность других генетических и/или негенетических факторов в формирование кровоточивости у конкретного пациента и затрудняет оценку риска кровотечений. Ситуация усложняется отсутствием надежных предикторов риска кровотечений у конкретного пациента, которые могли бы быть использованы в клинической практике.

Принципы экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при тромбастении Гланцмана

Для купирования небольших кровотечений у пациентов с ТГ рекомендовано использование различных местных кровоостанавливающих средств, включая компрессию салфеткой, пропитанной антифибринолитиками, нанесение фибринового клея, наложение коллагеновой гемостатической губки, смоченной раствором тромбина и другие. При кровотечениях средней тяжести, а также для профилактики кровотечений при проведении небольших хирургических операций (например, экстракции зуба) прибегают к системному введению антифибринолитиков. Эти препараты с успехом применяются для остановки умеренных носовых, десневых, маточных и других кровотечений у пациентов с ТГ. Использование десмопрессина в большинстве таких случаев оказывается неэффективным [344].

Более сложную задачу представляет собой купирование больших кровотечений у пациентов с ТГ. Стандартным подходом в этих ситуациях является переливание тромбоцитарного концентрата [30, 294]. С одной стороны, это позволяет достичь быстрой коррекции гемостатического потенциала крови, а с другой — подвергает пациента риску развития анафилаксии, ассоциированного с трансфузией острого повреждения легких, передачи бактериальных и вирусных инфекций и других осложнений. Кроме того, существенным недостатком этого метода является высокая частота развития рефрактерности к последующим трансфузиям тромбоцитов [3]. В основе этого феномена, как правило, лежит образование антитромбоцитарных аллоантител вследствие контакта иммунной системы пациента с находящимися на мембране донорских тромбоцитов аллоантигенами, относящимися к системам человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA) класса I и/или человеческих тромбоцитарных антигенов (HPA) [16, 296]. Даже однократной трансфузии тромбоцитарного концентрата бывает достаточно для образования указанных антител и развития рефрактерности к последующим трансфузиям. Показано также, что у некоторых пациентов с ТГ, никогда не получавших трансфузию тромбоцитов или иных компонентов крови, могут образовываться естественные антитромбоцитарные аллоантитела (подобно образованию анти-В-агглютининов у людей с группой крови А системы АВ0) [138]. Анти-тромбоцитарные аллоантитела обнаруживаются у 20–30 % пациентов с ТГ [123].

При трансфузии тромбоцитарного концентрата указанные антитела связываются с соответствующими аллоантигенами на мембране донорских тромбоцитов и, действуя в качестве опсонинов, способствуют их фагоцитозу макрофагами селезенки [321]. В результате содержание донорских тромбоцитов в крови быстро снижается, а следовательно, трансфузия тромбоцитарного концентрата становится неэффективной. Особую проблему представляет образование антитромбоцитарных аллоантител у женщин детородного возраста, поскольку во время беременности указанные антитела могут перейти через плаценту и вызвать развитие аллоиммунной тромбоцитопении у плода и новорожденного [218], ассоциированной с повышенным риском перинатальной смерти.

Снизить риск аллоиммунизации пациента можно путем переливания тромбоцитарного концентрата, полученного из крови HLA-совместимого донора, или лейкоредуцированного аферезного концентрата, однако эти препараты крови редко бывают доступны для немедленного использования. Дополнительными ограничениями в использовании тромбоцитарного концентрата является необходимость соблюдения специальных условий его хранения, небольшой срок годности и другие. Эти обстоятельства указывают на необходимость поиска альтернативных методов экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при ТГ.

В качестве альтернативы трансфузии тромбоцитарного концентрата для купирования тяжелых спонтанных и хирургических кровотечений при ТГ применяется концентрат rFVIIa. Согласно инструкции к препарату в России и странах Евросоюза он разрешен для применения у пациентов с ТГ при наличии у них антитромбоцитарных антител и рефрактерности (в настоящем или прошлом) к трансфузии тромбоцитарного концентрата. В то же время согласно информации, представленной в международном регистре пациентов с ТГ, все чаще rFVIIa используется как терапия первой линии для купирования спонтанных и хирургических кровотечений вне зависимости от наличия у пациента рефрактерности к трансфузии тромбоцитов и/или антитромбоцитарных аллоантител, т. е. вне инструкции [250, 294]. Это позволяет избежать риска аллоиммунизации и, следовательно, дает возможность сохранить чувствительность к трансфузии тромбоцитов в будущем.

Важнейшим преимуществом rFVIIa является его низкая иммуногенность. По состоянию на 2018 г. ни одного случая образования антител к rFVIIa у пациентов с ТГ не зарегистрировано [274]. Кроме того, по сравнению с тромбоцитарным концентратом rFVIIa более прост в хранении и использовании. Несмотря на растущую популярность этого препарата при ТГ, его применение имеет определенные сложности. Прежде всего, это проблема выбора оптимальной дозы препарата, которая была бы и эффективна, и безопасна для пациента. По причине небольшой распространенности ТГ рандомизированные контролируемые испытания rFVIIa при этой патологии еще не проводились. По данным международного

регистра пациентов с ТГ медианная доза этого препарата составляет 90 мкг/кг [250]. Эта же доза указана и в рекомендациях по использованию rFVIIa при ТГ. Несмотря на это, в действительности дозы препарата варьируют от 3,6 до 450 мкг/кг, причем выбор дозы является эмпирическим, т. е. основывается на общих представлениях врача о склонности конкретного пациента к кровоточивости, об объеме предстоящего вмешательства, о чувствительности пациента к этому препарату (если он уже применялся ранее) [250, 294]. Какие-либо объективные критерии выбора оптимальной дозы rFVIIa в настоящее время отсутствуют.

Опыт применения rFVIIa у пациентов с ТГ свидетельствует о том, что его эффективность при купировании спонтанных кровотечений варьирует от 50 до 94 % и при купировании хирургических кровотечений от 89 до 100 % [250]. С одной стороны, это свидетельствует о довольно высокой эффективности препарата, а с другой — указывает на то, что как минимум у каждого десятого пациента его применение не позволило достичь остановки кровотечения. Возможно, что в этих случаях была использована недостаточная доза rFVIIa или пациент отличался низкой чувствительностью к препарату. Более того, описан случай, когда пациент с ТГ, ранее чувствительный к rFVIIa, становился нечувствительным к нему в дальнейшем [398]. Иными словами, эффективность указанного препарата характеризуется не только межсубъектной, но и внутрисубъектной изменчивостью.

Несмотря на то что rFVIIa в целом считается достаточно безопасным препаратом, периодически регистрируются случаи тромботических осложнений, связанных с его применением у пациентов с ТГ. При введении rFVIIa пациентам с ТГ зарегистрировано 15 тромботических событий (9 венозных, 1 артериальное и 5 смешанных), из которых 2 привели к смерти пациента [294], что указывает на возможное завышение дозы этого препарата в этих случаях.

В целом вышеизложенное свидетельствует о необходимости разработки метода, который даст ответ на вопрос, возможна ли коррекция гемостатического потенциала с помощью rFVIIa у конкретного пациента в принципе, и, если да, поможет выбрать оптимальную (минимальную эффективную) для этого пациента

дозу препарата. Это повысит эффективность его применения при ТГ и снизит риск нежелательных побочных эффектов.

Другие концентраты факторов свертывания в настоящее время не являются рекомендованными для профилактики и купирования кровотечений у пациентов с ТГ и используются при данной патологии крайне редко. Имеются лишь единичные публикации, в которых описан опыт применения концентрата VWF/FVIII после безуспешных трансфузий тромбоцитов и введения rFVIIa у пациентки с тяжелым носовым кровотечением [398], а также опыт применения концентратов фибриногена и FXIII в комплексе с трансфузией тромбоцитарного концентрата, введением rFVIIa и транексамовой кислоты для профилактики кровотечения в послеоперационном периоде [223]. В целом влияние других концентратов факторов свертывания на формирование гемостатического потенциала при ТГ на сегодняшний день практически не исследовано.

Обращает внимание тот факт, что все существующие на данный момент способы экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при ТГ направлены либо на усиление коагуляционного звена системы гемостаза (концентраты факторов свертывания), либо на угнетение фибринолиза (антифибринолитики). Тромбоцитоориентированные методы коррекции гемостаза при этой патологии крайне ограничены и сводятся, главным образом, к трансфузии тромбоцитарного концентрата. Поскольку при ТГ содержание собственных тромбоцитов в крови пациента остается в пределах нормальных значений, перспективной представляется идея разработки методов повышения гемостатического потенциала крови, заключающихся в стимуляции прокоагулянтной активности тромбоцитов пациента. Анализ данных литературы показал, что изучению этого вопроса до настоящего времени внимания не уделялось.

Одним из факторов, затрудняющих исследование эффектов различных гемостатических средств при ТГ, является невысокая распространенность данной патологии. Частично преодолеть это ограничение можно путем создания доступных и простых в исполнении экспериментальных моделей ТГ, например моделей *in vitro*, обнаружить которые при анализе литературных данных нам не

удалось. Наличие таких моделей позволило бы существенно ускорить поиск оптимальных терапевтических стратегий для экстренной коррекции гемостатического потенциала при этой патологии.

Таким образом, ТГ — это тяжелое геморрагическое заболевание, требующее постоянного мониторинга и коррекции гемостатического потенциала крови. Стандартным методом купирования больших кровотечений при данной патологии является трансфузия тромбоцитарного концентрата, что ассоциировано с риском аллоиммунизации пациента и развития рефрактерности к последующим трансфузиям тромбоцитов. На сегодняшний день единственной альтернативой в этой ситуации является введение rFVIIa. Разработка метода индивидуального подбора дозы этого препарата позволит повысить эффективность и безопасность его применения при ТГ. Кроме того, знания об эффектах других концентратов факторов свертывания, а также разработка альтернативных методов, направленных, например, на стимуляцию прокоагулянтной функции собственных тромбоцитов пациента, расширило бы арсенал средств для экстренной коррекции гемостаза при данной патологии.

1.4. Дисфункция тромбоцитов при антитромбоцитарной терапии

Угнетение функциональной активности тромбоцитов является одним из ключевых направлений патогенетической терапии при артериальных тромбозах. С целью снижения риска развития повторных сердечно-сосудистых событий в настоящее время рекомендуется назначение двойной антитромбоцитарной терапии (ДАТТ), включающей ацетилсалициловую кислоту (АСК) и антагонист рецептора P2Y₁₂ тромбоцитов (клопидогрел, прасугрел или тикагрелор). Как правило, ДАТТ назначается сроком на 6–12 месяцев, а в случае высокого сердечно-сосудистого риска и на более длительный период [27, 44, 45]. Различные клинические исследования показали, что ДАТТ имеет преимущество по сравнению с монотерапией АСК, выражающееся в дополнительном снижении риска сердечно-сосудистой смерти, инфаркта миокарда и инсульта. Вместе с тем обнаружено, что

ДАТТ ассоциирована с повышением риска развития геморрагических событий (в т. ч. больших кровотечений), частота которых составляет около 5 % [6, 7, 140].

Возникновение кровотечений на фоне ДАТТ связано с избыточным подавлением функций тромбоцитов у части пациентов. При этом известно, что гемостатическая функция тромбоцитов во многом связана с процессом реорганизации их цитоскелета. Показано, что активация тромбоцитов сопровождается сначала расщеплением существующих актиновых филаментов на короткие фрагменты, что обуславливает превращение тромбоцитов из дисковидных элементов в сферические. Сразу после этого начинается стремительная полимеризация актина, в ходе которой к «оперенным» (быстрорастущим) концам образовавшихся коротких фрагментов актиновых нитей присоединяются мономеры β -актина. В результате формируется множество новых актиновых филаментов, которые организуются в виде сети и пучков, что обеспечивает образование тромбоцитами псевдо- и ламеллиподий, необходимых для их адгезии и агрегации, а также для ретракции тромба (или кровяного сгустка) [46, 47]. Одним из факторов, определяющих эффективность выполнения тромбоцитами указанных функций, является их способность генерировать контрактильную силу и передавать ее на структуры внеклеточного матрикса, форменные элементы крови и другие клетки, с которыми тромбоциты взаимодействуют. Важнейшим условием для реализации контрактильной функции тромбоцитов, является установление физической связи между (1) структурами их актинового цитоскелета, отвечающими за генерацию контрактильной силы, (2) интегринами $\alpha\text{IIb}\beta 3$, обеспечивающими трансмиссию контрактильной силы во внеклеточное пространство, и (3) лигандами этих интегринов (фибриногеном, фибрином, VWF и др.), служащими объектами приложения контрактильной силы. В результате соединения этих трех элементов образуется комплекс «лиганд–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет». Показано, что использование ингибиторов функций тромбоцитов, вызывающих нарушение генерации контрактильной силы или препятствующих связыванию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ со своими лигандами, т. е. оказывающих влияние на формирование указанного комплекса, приводит к отрыву тромбоцитарных агрегатов от поверхности эндотелия,

уменьшает ретракцию тромба (или кровяного сгустка), что в итоге обуславливает снижение гемостатического потенциала крови. На основании вышеизложенного можно предположить, что нарушение формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» является вероятным механизмом угнетения гемостатического потенциала крови у пациентов, получающих ДАТТ, однако до настоящего времени этот вопрос не был предметом специального исследования.

Высокая частота геморрагических событий, связанных с приемом препаратов для ДАТТ, обуславливает необходимость поиска новых, более безопасных способов управляемого снижения функциональной активности тромбоцитов. В качестве альтернативы антагонистам рецептора P2Y_{12} рассматриваются высоко-селективные антагонисты рецептора P2Y_1 . В условиях *in vitro* их применение вызывает отчетливое угнетение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, а в экспериментах *in vivo* было показано, что дефицит рецепторов P2Y_1 не приводит к развитию больших кровотечений, что позволяет предполагать их большую безопасность по сравнению с антагонистами рецептора P2Y_{12} . Тем не менее влияние антагонистов рецепторов P2Y_1 на тромбоциты, в т. ч. на формирование комплекса «лиганд–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет», а также системные эффекты этих препаратов изучены недостаточно полно, и в клинической практике они пока не применяются.

Не менее актуальной является проблема раннего выявления пациентов с повышенным риском развития кровотечений на фоне ДАТТ. В ряде исследований показано, что повышенный риск развития кровотечений у этих пациентов ассоциирован с низким уровнем остаточной реактивности тромбоцитов, т. е. значительным подавлением функций тромбоцитов после приема антитромбоцитарных препаратов [15, 18, 232]. Однако на сегодняшний день отсутствует стандартизованный и общепринятый метод оценки остаточной реактивности тромбоцитов. Одним из способов оценки эффективности проводимой ДАТТ является определение остаточной реактивности тромбоцитов, т. е. степени угнетения их функциональной активности спустя определенное время после назначения соответствующих препаратов. Для изучения остаточной реактивности тромбоцитов в

различных исследованиях были использованы разнообразные методы определения функциональной активности тромбоцитов, в т. ч. агрегометрия [53], определение уровня TXA_2 [397], VerifyNow [89], PFA-100 [60], тромбоэластография (тест Platelet Mapping) [167], ImpactR [336], проточная цитометрия (определение экспрессии интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и Р-селектинов на мембране тромбоцитов, анализ стимулируемого вазодилататором фосфорилирования фосфобелка (VASP)) [128] и другие методы. К сожалению, на сегодняшний день ни одно рандомизированное клиническое исследование не обнаружило какую-либо выгоду для пациентов от модификации ДАТТ на основе данных мониторинга функциональной активности тромбоцитов указанными методами. По этой причине в настоящее время оценка остаточной реактивности тромбоцитов при назначении ДАТТ в широкой клинической практике не проводится, и пациенты продолжают получать стандартные дозы препаратов [375]. Тем не менее идея индивидуального подбора вида и дозы антитромбоцитарных препаратов по-прежнему остается актуальной, а разработка надежного метода оценки адекватности антитромбоцитарной терапии и выявления оптимального «терапевтического окна» между ишемическими событиями и кровотечениями является важным направлением научного поиска. Исходя из того, что формирование комплекса «лиганд–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» является необходимым условием для эффективной реализации основных функций тромбоцитов, мы полагаем, что знания о формировании указанного комплекса и влиянии на этот процесс антитромбоцитарных препаратов могут стать основой для разработки нового метода оценки остаточной реактивности тромбоцитов.

Глава 2

Материалы и методы исследования

2.1. Материал исследования

Материалом исследования явилась кровь, полученная от здоровых добровольцев, пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией и пациентов с тромбастенией Гланцмана. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также локальным этическим комитетом Медицинского центра им. Х. Шибы (Тель-ха-Шомер, Израиль), на базе которого была выполнена экспериментальная часть работы. Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации 1975 г. и ее пересмотром 2008 г. Перед включением в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

Здоровые добровольцы

В исследовании приняли участие 256 здоровых добровольцев (145 мужчин и 111 женщин) в возрасте от 20 до 60 лет, явившихся для донации цельной крови.

Критерии включения: здоровые добровольцы обоего пола в возрасте от 18 до 70 лет; наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии невключения: беременность, кормление грудью; прием каких-либо лекарственных препаратов в течение предыдущих 14 дней.

Критерии исключения: отказ здорового добровольца от участия в исследовании после подписания информированного согласия; выявление каких-либо отклонений от нормы в общем анализе крови, в показателях коагулограммы (концентрация фибриногена в плазме, протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время) и/или показателях световой трансмиссионной агрегометрии.

Пациенты с тромбастенией Гланцмана (ТГ)

В исследовании приняли участие 24 пациента (11 мужчин и 13 женщин) с ТГ типа 1 в возрасте от 21 до 50 лет, находившихся под наблюдением в отделении гематологии Медицинского центра имени Х. Шиба (Тель-ха-Шомер, Израиль).

Критерии включения: пациенты с установленным диагнозом ТГ типа 1 обоего пола в возрасте от 18 до 70 лет; наличие письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании. Диагноз был установлен врачами-гематологами отделения, в котором наблюдались пациенты, в соответствии с международными рекомендациями по диагностике наследственных нарушений функций тромбоцитов, разработанными рабочей группой подкомитета по физиологии тромбоцитов Международного общества по тромбозу и гемостазу (2015 г.) [146]. Диагноз был подтвержден путем оценки уровня экспрессии интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов и идентификации мутации в генах *ITGA2B* и/или *ITGB3*, кодирующих соответствующие полипептидные цепи интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Мутации, обнаруженные у пациентов, включенных в исследование, представлены в главе 5 (Таблица 5.1). На момент включения в исследование геморрагический синдром у пациентов отсутствовал.

Критерии невключения: беременность, кормление грудью; прием каких-либо лекарственных препаратов в течение предыдущих 14 дней; наличие какого-либо сопутствующего заболевания; установленный диагноз ТГ типа 2, ТГ вариантного типа или приобретенной ТГ.

Критерии исключения: отказ пациента от участия в исследовании после подписания информированного согласия; выявление каких-либо отклонений от нормы в общем анализе крови, в показателях скрининговой коагулограммы.

Пациенты с первичной иммунной тромбоцитопенией (ИТП)

В исследовании приняли участие 12 пациентов (4 мужчин и 8 женщин) с первичной хронической ИТП в возрасте от 21 до 52 лет, находившихся под наблюдением в отделении гематологии Медицинского центра имени Х. Шиба (Тель-ха-Шомер, Израиль).

Критерии включения: пациенты с установленным диагнозом первичной хронической ИТП обоего пола в возрасте от 18 до 70 лет; наличие письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании. Диагноз был установлен врачами-гематологами отделения, в котором наблюдались пациенты, в соответствии с критериями, принятыми Международным консенсусом по диагностике и лечению первичной ИТП (2010 г.) [299]. Содержание тромбоцитов у пациентов, включенных в исследование, варьировало от 2×10^9 до $74 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$. Геморрагический синдром (единичные петехии на коже и слизистых) отмечался у 2/12 пациентов с наименьшим содержанием тромбоцитов (2×10^9 и $9 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$). На момент включения в исследование ни один из пациентов не получал какого-либо лечения по поводу первичной ИТП.

Критерии невключения: беременность, кормление грудью; прием каких-либо лекарственных препаратов в течение предыдущих 14 дней; назначение специфической терапии по поводу первичной ИТП; наличие какого-либо сопутствующего заболевания.

Критерии исключения: отказ пациента от участия в исследовании после подписания информированного согласия; выявление каких-либо отклонений от нормы в общем анализе крови кроме изолированной тромбоцитопении, в показателях скрининговой коагулограммы.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Приготовление обогащенной и бедной тромбоцитами плазмы, бестромбоцитарной плазмы, плазмы без клеточных микрочастиц и эритроцитарной массы

Взятие крови осуществляли натошак в утренние часы пункцией срединной локтевой вены с использованием иглы размером 21G и вакуумных пробирок Vacuette (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), содержащих 3,2 % раствор трехзамещенного цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Соотношение объемов антикоагулянта и крови составляло 1:9. Жгут снимали сразу после попадания иглы в вену. Первую пробирку с кровью удаляли в связи с возможной

активацией свертывания крови при проколе вены. После взятия крови образцы выдерживались в течение 30 мин при комнатной температуре (24–26 °С) и затем подвергали необходимым манипуляциям. Все дальнейшие манипуляции с кровью и ее компонентами выполнялись также при комнатной температуре.

Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП), бедную тромбоцитами плазму (БТП) и плазму без клеточных микрочастиц получали из цитратной крови методом дифференциального центрифугирования:

1. Для получения ОТП образец крови центрифугировали при 134 g в течение 12 мин, после чего две верхние трети объема супернатанта переносили в отдельную полипропиленовую пробирку в качестве ОТП. Содержание тромбоцитов в ОТП доводили до $250 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ путем добавления в нее необходимого количества аутологичной БТП, которую получали путем центрифугирования остатка того же образца крови при 2288 g в течение 15 мин.

2. Для получения бестромбоцитарной плазмы кровь центрифугировали при 134 g в течение 12 мин и после удаления супернатанта (ОТП) центрифугировали при 1200 g в течение 12 мин. Полученный в результате второго центрифугирования супернатант переносили в отдельную пробирку и центрифугировали при 10 000 g в течение 3 мин. Полученный в результате третьего центрифугирования супернатант переносили в отдельную пробирку в качестве бестромбоцитарной плазмы, а нижнюю треть осадка — в качестве эритроцитарной массы.

3. Для получения плазмы без клеточных микрочастиц кровь центрифугировали при 134 g в течение 12 мин. Полученную при этом ОТП переносили в отдельную пробирку и центрифугировали при 1600 g в течение 15 мин. Полученный в результате второго центрифугирования супернатант переносили в отдельную пробирку и центрифугировали при 40 000 g в течение 60 мин. Полученный в результате третьего центрифугирования супернатант переносили в отдельную пробирку в качестве плазмы без клеточных микрочастиц.

2.2.2. Ротационная тромбоэластометрия

Формирование и лизис сгустка изучали в цитратной крови с помощью ротационного тромбоэластометра ROTEM (Pentapharm GmbH, Мюнхен, Германия). В ряде экспериментов вместо цитратной крови использовали ОТП или плазму без клеточных микрочастиц. Для теста NATEM в кювету тромбоэластометра помещали 20 мкл реагента star-tem (0,2 моль/л CaCl_2) и 20 мкл натрий-фосфатного буфера (PBS; 2,7 ммоль/л KCl , 1,8 ммоль/л KH_2PO_4 , 137 ммоль/л NaCl , 8,1 ммоль/л Na_2HPO_4 , pH 7,4), для теста EXTEM — 20 мкл реагента star-tem и 20 мкл разведенного 1 : 100 реагента ex-tem (содержит рекомбинантный тканевой фактор и фосфолипиды), для теста INTEM — 20 мкл реагента star-tem и 20 мкл реагента in-tem (содержит фосфолипиды частичного тромбопластина из головного мозга кролика и эллаговую кислоту). Далее в кювету помещали 300 мкл крови или плазмы, тщательно перемешивали с реагентами путем пипетирования. Формирование и лизис кровяного сгустка регистрировали при температуре 37 °C (если не указана иная температура) в течение 60 мин в виде кривой — тэмограммы. В зависимости от вопроса исследования анализировали различные показатели тэмограммы: 1) время свертывания (clotting time, CT) — время от начала регистрации тэмограммы до достижения амплитуды 2 мм (в с); угол α (alpha angle, A α) — угол наклона касательной, проведенной к тэмограмме через точку, в которой ее амплитуда достигала 2 мм (в градусах); 3) время формирования сгустка (clot formation time, CFT) — время от CT до достижения амплитуды 20 мм (в с); 4) амплитуда на 10-й минуте (A10) — амплитуда тэмограммы на 10-й минуте после CT (в мм); 5) максимальная плотность сгустка (maximal clot firmness, MCF) — максимальная амплитуда тэмограммы (в мм); 6) время начала лизиса (lysis onset time, LOT) — время от CT до снижения амплитуды тэмограммы на 15% от MCF (в мин); 7) индекс лизиса на 30-й минуте (lysis index at 30 min, LI30) — амплитуда тэмограммы через 30 мин после CT (в % от MCF); 8) площадь под кривой (area under the curve, AUC) — площадь под кривой первой производной от начала регистрации тэмограммы до времени достижения MCF (в мм $\times$ 100).

2.2.3. Тест генерации тромбина

Генерацию тромбина изучали в ОТП, полученную из цитратной крови, методом калиброванной автоматизированной тромбографии по методу Hemker et al. [163]. Для выполнения теста 20 мкл рабочего буфера (20 ммоль/л 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновая кислота, 140 ммоль/л NaCl, pH 7,3), содержащего 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, помещали в лунки круглодонного 96-луночного планшета. Затем в лунки планшета добавляли 80 мкл ОТП, при необходимости содержащую гемостатический препарат в определенной концентрации. Генерацию тромбина инициировали добавлением в лунки планшета 20 мкл рабочего буфера, содержащего 100 ммоль/л CaCl_2 и 5 ммоль/л флуорогенного субстрата тромбина Z-GGR-AMC (Bachem AG, Бубендорф, Швейцария) при температуре 37 °C. Флуоресцентный сигнал регистрировали с помощью флуориметра Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific GmbH, Шверте, Германия) при длине волны экстинкции 390 нм и длине волны эмиссии 460 нм в течение 45 мин при температуре 37 °C. Единицы флуоресценции переводили в единицы концентрации тромбина с помощью специальной программы (Thrombinoscope, version 3.0.0.29), сопряженной с флуориметром. На основе полученных данных строили кривую генерации тромбина (тромбограмму), по которой рассчитывали следующие показатели: 1) время инициации — время от начала регистрации тромбограммы до момента достижения 1/6 значения пиковой концентрации тромбина (в мин); 2) пиковая концентрация тромбина (ПКТ) — максимальная концентрация тромбина (в ммоль/л); 3) эндогенный тромбоиновый потенциал (ЭТП) — площадь под кривой тромбограммы (в ммоль/л × мин).

2.2.4. Исследование адгезии и агрегации тромбоцитов

при высокой скорости сдвига

Адгезию и агрегацию тромбоцитов при высокой скорости сдвига изучали с помощью анализатора Impact-R (DiaMed GmbH, Кресье, Швейцария). Образцы цитратной крови в объеме 130 мкл помещали на дно специальных полистиреновых ячеек (Nunc, Роскилле, Дания) и подвергали воздействию напряжения сдвига в

течение 2 мин при комнатной температуре. Скорость сдвига при этом составляла $1\,800\text{ с}^{-1}$. Затем ячейку отмывали от крови с помощью PBS и адгезированные объекты (тромбоциты и их агрегаты) окрашивали красителем May-Grünwald в течение 2 мин. После удаления избытка красителя препарат высушивали на воздухе и исследовали с помощью специальной программы для анализа изображений, сопряженной с анализатором Impact-R. Адгезию и агрегацию тромбоцитов оценивали по двум показателям: 1) площадь покрытия ячейки адгезированными объектами (surface coverage, SC; в % от общей площади ячейки) — показатель, характеризующий адгезию тромбоцитов; 2) средний размер адгезированных объектов (average size, AS; в $\mu\text{м}^2$) — показатель, характеризующий агрегацию тромбоцитов.

2.2.5. Световая трансмиссионная агрегометрия

Агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью четырехканального агрегометра AggRAM (Helena Laboratories, Бомонт, США). Для этого 225 мкл ОТП помещали в кюветы агрегометра, инкубировали в течение 1 мин при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего в ОТП добавляли 25 мкл индуктора агрегации тромбоцитов. Запись агрегатограммы осуществляли в течение 5–15 мин при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и непрерывном перемешивании ОТП магнитной мешалкой со скоростью 600 об/мин (если иное не указано). Агрегацию оценивали по изменению светопропускания ОТП после добавления в нее индуктора агрегации. Для каждого нового образца калибровку агрегометра осуществляли отдельно. Светопропускание ОТП перед добавлением в нее индуктора агрегации тромбоцитов принимали за 0 %, а светопропускание БТП принимали за 100 %.

Агрегацию тромбоцитов исследовали с использованием следующих ингибиторов и активаторов тромбоцитов (указаны конечные концентрации в ОТП):

- пептид, активирующий рецептор тромбина (TRAP; пептид SFLLRNPNDK-YEPF), 25 мкмоль/л (Sigma-Aldrich);
- АДФ, 10 мкмоль/л (DiaMed);
- арахидоновая кислота, 1,5 ммоль/л (DiaMed);

- моноклональные антитела против LIBS6, разведение 1:200 (предоставлены профессором Гинсбергом, Калифорнийский университет, Сан-Диего, США);
- ристоцетин, 1,5 мг/мл (DiaMed).
- MRS2500, 10 мкмоль/л (Tocris Bioscience), антагонист рецептора P2Y₁;
- AR-C66096, 10 мкмоль/л (Tocris Bioscience); антагонист рецептора P2Y₁₂;
- ацетилсалициловая кислота (АСК), 0,5 ммоль/л (Sigma-Aldrich);
- цитохалазин D, 10 мкмоль/л (Sigma-Aldrich).

2.2.6. Исследование стабильности связи между интегринами $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном в динамике агрегации тромбоцитов

Для оценки стабильности связи между интегринами $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном в динамике агрегации тромбоцитов спустя 1, 3 или 5 мин после индукции агрегации в ОТП добавляли 4,5 мкмоль/л эптифибатид (препарат Integrilin; Schering-Plough, США). Последний представляет собой высокоселективный антагонист интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, который конкурирует с фибриногеном за связывание с указанными рецепторами. Добавление эптифибатид приводит к вытеснению фибриногена из связи с интегринами $\alpha\text{IIb}\beta 3$, что и вызывает дезагрегацию тромбоцитов. О стабильности тромбоцитарных агрегатов судили по скорости эптифибатидиндуцированной дезагрегации, которую рассчитывали как снижение светопропускания за первые 15 с после добавления эптифибатид и выражали в %/мин. Чем меньше стабильность связи между интегринами $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном, тем меньше стабильность тромбоцитарных агрегатов и тем больше скорость эптифибатидиндуцированной дезагрегации тромбоцитов

2.2.7. Фракционирование тромбоцитов

Фракционирование тромбоцитов проводили по методу Fox [125] с изменениями. В кюветы агрегометра, содержащие ОТП, добавляли равный объем двукратного лизирующего буфера с Тритоном X-100 [2 % об. Тритон X-100; 5 ммоль/л этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетраацетат, pH 7,8; 5 ммоль/л этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат (ЭДТА), pH 7,8; 100 мМ Трис, pH 7,35;

4 ммоль/л натрия ортованадат; 4 % об. коктейль ингибиторов протеаз (P8340, Sigma-Aldrich); 60 мкмоль/л кальпептин; 2 ммоль/л фенилметансульфонилфторид (ФМСФ)], охлажденного до 0 °С, после чего кюветы сразу же погружали в лед на 30 мин. Полученный лизат переносили в пробирки и центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин при 4 °С. Затем супернатант удаляли, а осадок, содержащий не растворимую в Тритоне X-100 (цитоскелетную) фракцию, отмывали от остатков супернатанта, содержащего растворимую в Тритоне X-100 фракцию. Для этого к осадку добавляли однократный лизирующий буфер с Тритоном X-100, объем которого был равен исходному объему лизата, и снова центрифугировали при тех же условиях. После этого супернатант удаляли, а к отмытому осадку добавляли двукратный буфер для образцов [40 мг/мл додецилсульфата натрия (ДСН); 20 ммоль/л ЭДТА, pH 7,8; 20 % об. глицерин; 125 ммоль/л Трис, pH 6,8; 4 ммоль/л натрия ортованадат; 4 % об. коктейль ингибиторов протеаз; 60 мкмоль/л кальпептин; 2 ммоль/л ФМСФ], объем которого был равен объему изначально взятой ОТП, и 5 % об. β-меркаптоэтанола. Затем содержимое пробирок перемешивали на вортексе в течение 2–3 с и помещали в термоблок, нагретый до 100 °С. Образцы выдерживали в термоблоке с периодическим интенсивным перемешиванием на вортексе до полного растворения осадка. Подготовленные образцы хранили при –20 °С.

2.2.8. Электрофорез в полиакриламидном геле

Разделение белков не растворимой в Тритоне X-100 (цитоскелетной) фракции тромбоцитов осуществляли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии ДСН. Для этого образцы, содержащие белки не растворимой в Тритоне X-100 фракции тромбоцитов, размораживали, добавляли в них 0,025 % об. бромфенолового синего в качестве лидирующего красителя и подвергали электрофорезу. Электрофорез проводили с помощью системы Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США) с использованием 4 % концентрирующего и 7,5 % разделяющего геля в электродном буфере [25 ммоль/л Трис, 192 ммоль/л глицин, 1 мг/мл ДСН, pH 8,3] при постоянном токе 20 мА и

продолжали до достижения красителем нижнего края геля. Идентификацию и количественную оценку разделенных белков проводили с помощью вестерн-блоттинга. Поскольку агрегация тромбоцитов сопровождается значительным изменением количества микротрубочек и микрофиламентов, образующие их белки (тубулин и актин соответственно), равно как и иные белки, способные ассоциироваться с белками цитоскелета, не могли быть использованы в качестве контрольных белков для подтверждения одинаковой загрузки белка, содержащегося в образцах цитоскелетных фракций, в лунки полиакриламидного геля. Ввиду наличия данных ограничений особое внимание было уделено загрузке равных объемов образцов.

2.2.9. Вестерн-блоттинг

После разделения в ПААГ белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-ECL, Amersham Biosciences, Бакингемшир, Великобритания) с использованием буфера для переноса [25 ммоль/л Трис, 192 ммоль/л глицин, pH 8,3; 20 % об. метанол]. Перенос проводили при постоянном токе 300 мА в течение 60 мин. После переноса белков мембрану промывали в Трис-солевом буфере (20 ммоль/л Трис, 150 ммоль/л NaCl, pH 7,5) с добавлением 0,1 % об. Твина 20 (TBS-T) и инкубировали в блокирующем растворе № 1 (50 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в TBS-T) в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе № 2 (30 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в TBS-T), в течение 8 ч при 4 °С. Несвязавшиеся первичные антитела удаляли путем трехкратного промывания мембраны в TBS-T. Далее мембрану инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, разведенными в блокирующем растворе № 2, в течение 60 мин при комнатной температуре. Несвязавшиеся вторичные антитела удаляли путем трехкратного промывания мембраны в TBS-T. Визуализацию связавшихся вторичных антител осуществляли с помощью реакции усиленной хемилюминесценции. Для этого мембрану инкубировали в растворе субстрата пероксидазы хрена (100 ммоль/л Трис, pH 8,5;

1,25 ммоль/л люминол; 0,2 ммоль/л пара-кумаровая кислота; 0,01 % об. H_2O_2) в течение 1 мин при комнатной температуре и хемилюминесцентный сигнал регистрировали с помощью рентгеновской пленки. Интенсивность сигнала оценивали по оптической плотности полос на рентгеновской пленке методом денситометрии.

В работе были использованы следующие антитела:

- 1) моноклональные мышиные антитела IgG₁ против αIIb , клон SZ22 (Beckman Coulter);
- 2) моноклональные мышиные антитела IgG₁ против GPIb (против CD42b), клон SZ2 (Santa Cruz Biotechnology);
- 3) моноклональные мышиные антитела IgG₁ против β -актина, клон AC-15 (Sigma-Aldrich);
- 4) поликлональные кроличьи антитела против мышиных антител IgG, конъюгированные с пероксидазой (Sigma-Aldrich).

2.3. Экспериментальные модели геморрагических состояний

2.3.1. Модель травматической коагулопатии *in vitro*

Модель травматической коагулопатии *in vitro* включала гемодилюцию, гиперфибринолиз, гипотермию и/или ацидоз.

Гемодилюцию моделировали добавлением в образцы крови Трис-буферизованного 0,9 % раствора хлорида натрия (25 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 7,4). Степень гемодилюции составляла 30, 40 или 60 %, что соответствует состоянию после коррекции волемии с помощью указанного раствора у взрослого пациента, потерявшего около 1,5, 2 или 3 л крови соответственно.

Гиперфибринолиз индуцировали добавлением в цельную или разведенную кровь препарата Actilyse (Boehringer Ingelheim, Германия), содержащего человеческий рекомбинантный тканевой активатор плазминогена в одноцепочечной форме (альтеплаза), или препарата Actosolv (Eumedica Pharmaceuticals, Бельгия), содержащего выделенный из мочи человека урокиназный активатор плазминогена в высокомолекулярной двухцепочечной (активной) форме. Значения конечных концентраций активаторов плазминогена приведены в описании результатов

собственных исследований. Во избежание преждевременной генерации плазмина и фибриногенолиза активатора плазминогена добавляли в кровь непосредственно перед индукцией свертывания. О наличии гиперфибринолиза свидетельствовало снижение MCF на 15 % и более за время регистрации тэмограммы (60 мин).

Ацидоз (pH 7,0–7,1) моделировали добавлением в кровь молочной кислоты (L1750; Sigma Aldrich, Реховот, Израиль). Конечная концентрация молочной кислоты в плазме крови составляла 1,2 мг/мл (13,3 ммоль/л). Для контроля степени ацидификации крови для каждого образца крови определяли pH с помощью анализатора ABL-705 (Radiometer, Копенгаген, Дания).

Гипотермию (31°C) моделировали путем задания соответствующей температуры термостата тромбоэластометра во время выполнения теста.

2.3.2. Модель изолированной тромбоцитопении *in vitro*

Изолированную тромбоцитопению создавали путем разделения цельной крови на эритроцитарную массу, ОТП и 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 .

Например, необходимо создать модель изолированной тромбоцитопении в цельной крови с содержанием тромбоцитов $20 \times 10^9 л^{-1}$. При этом в образце донорской крови гематокрит составил 0,40, гематокрит полученной эритроцитарной массы — 0,80, содержание тромбоцитов в ОТП — $400 \times 10^9 л^{-1}$. Вычислим соотношение между x , y и z :

$$\begin{aligned} x:y:z &= \frac{0,40}{0,80} : \frac{20 \times 10^9}{400 \times 10^9} : \left(1 - \frac{0,40}{0,80} - \frac{20 \times 10^9}{400 \times 10^9}\right) = \\ &= \frac{1}{2} : \frac{1}{20} : \left(1 - \frac{1}{2} - \frac{1}{20}\right) = \frac{1}{2} : \frac{1}{20} : \frac{9}{20} = 10:1:9. \end{aligned}$$

Следовательно, для создания модели изолированной тромбоцитопении с содержанием тромбоцитов $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ эритроцитарную массу, ОТП и бестромбоцитарную плазму, приготовленные из крови данного донора, необходимо смешать в объемном соотношении 10 : 1 : 9 соответственно.

2.3.3. Модель тромбастении Гланцмана *in vitro*

Для создания модели тромбастении Гланцмана образцы цитратной крови, полученной от здоровых добровольцев, инкубировали с эптифибатидом (препарат Integrilin, Schering-Plough, Кенилворт, США) в конечной концентрации 25 мкг на 1 мл плазмы в течение 20 мин при комнатной температуре. Экспериментальная верификация этой модели представлена в разделе 5.2.

2.4. Гемостатические препараты

Для исследования возможностей коррекции гемостатического потенциала крови были использованы следующие гемостатические препараты:

- транексамовая кислота (ТКК; препарат Cyklokapron; Pfizer, Пуурс, Бельгия);
- концентрат фибриногена (препарат Haemocomplettan P; CSL Behring GmbH, Марбург, Германия);
- концентрат фактора фон Виллебранда (препарат Haemate P; CSL Behring GmbH, Марбург, Германия);
- концентрат фактора XIII (препарат Fibrogammin P; CSL Behring GmbH, Марбург, Германия);
- концентрат рекомбинантного активированного фактора VII (препарат Novo-Seven; Novo Nordisk, Копенгаген, Дания);
- активированный концентрат протромбинового комплекса (препарат FEIBA; Baxter AG, Вена, Австрия).

В качестве средств для коррекции гемостатического потенциала крови были также использованы:

- раствор фибриногена (F4883; Sigma-Aldrich, Реховот, Израиль);

- активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (P0059; Sigma-Aldrich, Реховот, Израиль).

Конкретные препараты, их комбинации и конечные концентрации в плазме приведены в описании соответствующих экспериментов в главах 3–6 (результаты собственных исследований).

2.5. Статистический анализ

Статистический анализ результатов выполнен с помощью программы IBM SPSS Statistics for Windows, version 23.0 (IBM Corp., Армонк, США). Количественные данные представлены в виде среднего (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD).

Для оценки влияния гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза на показатели формирования кровяного сгустка в условиях гемодилюции использовали трехфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями. При этом сначала оценивали статистическую значимость эффекта трехфакторного взаимодействия (гиперфибринолиз $\times$ гипотермия $\times$ ацидоз), затем — статистическую значимость эффектов двухфакторного взаимодействия (гиперфибринолиз $\times$ гипотермия, гиперфибринолиз $\times$ ацидоз, гипотермия $\times$ ацидоз). Во избежание эффекта множественных сравнений значения P для эффектов двухфакторного взаимодействия были откорректированы по методу Шидака. Если эффект двухфакторного взаимодействия был статистически значимым, переходили к оценке простых эффектов одного из факторов на разных уровнях другого фактора. Если эффект двухфакторного взаимодействия не был статистически значимым, переходили к оценке главных эффектов соответствующих факторов. Сравнения с контролем (интактной кровью) проводили с помощью анализа контрастов.

Для оценки влияния гипотермии и ацидоза на показатели лизиса кровяного сгустка в условиях гемодилюции и гиперфибринолиза использовали двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями. Поскольку эффект двухфакторного взаимодействия (гипотермия $\times$ ацидоз) не были статистически значимыми ни для одного из исследованных показателей лизиса, оценивали только главные эффекты указанных факторов.

Для исследования зависимости показателей формирования и лизиса кровяного сгустка от дозы гемостатического препарата использовали однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями. При этом сравнения с контролем (образцами, не содержащими гемостатических препаратов) проводили с помощью апостериорного критерия Даннетта.

Для оценки статистической значимости эффектов гемостатических препаратов при гемодилюции, гиперфибринолизе, гипотермии и/или ацидозе, а также для сравнения их эффектов между собой проводили однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями с применением апостериорного критерия Шидака.

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC50) активаторов плазминогена исследовали зависимость показателей формирования кровяного сгустка от дозы активаторов плазминогена. При этом значения показателей при отсутствии активаторов плазминогена принимали за 100 %, а значения, зарегистрированные в присутствии их максимальной концентрации, — за 0 %. Нормированные данные методом нелинейного регрессионного анализа аппроксимировали к нисходящей сигмоидальной кривой «доза–эффект», по которым определяли соответствующее значение EC50.

С целью определения 95 % предсказательного интервала значений для показателей адгезии и агрегации тромбоцитов и показателей формирования кровяного сгустка, исследовали зависимость указанных показателей от содержания тромбоцитов в образце крови и полученные данные методом нелинейного регрессионного анализа аппроксимировали к сигмоидальной кривой «доза–эффект» с расчетом 95 % предсказательного интервала.

Для оценки силы связи между содержанием тромбоцитов в крови и значениями показателей адгезии и агрегации тромбоцитов и формирования кровяного сгустка рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона r . При $r < 0,3$ корреляцию считали очень слабой; при $0,3 < r < 0,5$ — слабой; при $0,5 < r < 0,7$ — умеренной; и при $r > 0,7$ — сильной.

Для оценки статистической значимости влияния гемостатических препаратов на адгезию и агрегацию тромбоцитов и формирование кровяного сгустка в зависимости от содержания тромбоцитов в крови проводили двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями. Если эффект двухфакторного взаимодействия (вид гемостатика $\times$ содержание тромбоцитов) был статистически значимым, переходили к оценке эффектов гемостатика при различном содержании тромбоцитов. Если эффект двухфакторного взаимодействия не был статистически значимым, переходили к оценке главных эффектов гемостатических препаратов. Апостериорные сравнения средних проводили с помощью критерия Шидака.

Для оценки статистической значимости эффектов гемостатических препаратов в условиях тяжелой тромбоцитопении проводили однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим применением апостериорного критерия Шидака.

Для сравнения значений показателей генерации тромбина у пациентов с ТГ и здоровых добровольцев использовали двусторонний t -критерий Стьюдента для независимых выборок. Для оценки влияния rFVIIa на генерацию тромбина использовали однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями и апостериорный критерий Даннетта. Для оценки влияния типа мутации на степень коррекции генерации тромбина при ТГ с помощью rFVIIa изучали методом двухфакторного смешанного дисперсионного анализа, в котором тип мутации рассматривали как межгрупповой фактор, а концентрацию rFVIIa — как внутригрупповой фактор. Поскольку эффект взаимодействия между указанными факторами (вид мутации $\times$ концентрация rFVIIa) не был статистически значимым, исследовали главные эффекты этих факторов.

Для оценки статистической значимости влияния гемостатических препаратов, а также растворимых тромбоцитарных агонистов на формирование кровяного сгустка в модели ТГ проводили однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим применением апостериорного критерия Шидака.

Ассоциацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и β -актина с цитоскелетом тромбоцитов в покое и после стимуляции тромбоцитов агонистами выражали в процентах от ассоциации этих белков с цитоскелетом в тромбоцитах, подвергнутых максимальной стимуляции, в которых ассоциацию считали 100 %. Сравнения со 100 % приводили с помощью одновыборочного двустороннего t -критерия Стьюдента.

Скорость эпифибатидиндуцированной дезагрегации тромбоцитов в образцах, проинкубированных с ингибиторами функций тромбоцитов, сравнивали с нулем (отсутствие дезагрегации) с помощью одновыборочного двустороннего t -критерия Стьюдента.

Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 3

Нарушения гемостатического потенциала крови и его коррекция при травматической коагулопатии

3.1. Вклад гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушение гемостатического потенциала крови

Настоящий раздел посвящен изучению относительного вклада гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза как ключевых патогенетических факторов травматической коагулопатии в нарушение формирования кровяного сгустка. Поскольку при тяжелых травмах гемодилюция в той или иной мере присутствует у каждого пациента, гиперфибринолиз, гипотермию и ацидоз моделировали в разведенной крови. Степень гемодилюции при этом составила 40 %. Гиперфибринолиз индуцировали добавлением в кровь 75 МЕ/мл tPA, ацидоз (рН 7,1–7,2) создавали добавлением в кровь 1,2 мг/мл молочной кислоты и гипотермию (31 °C) — путем задания соответствующей температуры термостата тромбоэластометра (тест EXTEM). Формирование кровяного сгустка оценивали по показателям времени свертывания (СТ, с), углу альфа (αA , градусы), амплитуде на 10-й минуте (A10, мм) и максимальной плотности сгустка (MCF, мм). Лизис кровяного сгустка оценивали по показателям времени начала лизиса (LOT, мин) и индексу лизиса на 30-й минуте (LI30, %).

СТ. В интактной крови СТ составило 227 ± 43 с. Гемодилюция не приводила к значимому изменению данного показателя. В условиях гемодилюции индукция фибринолиза, гипотермия и ацидоз не оказывали влияния на продолжительность СТ (Рисунок 3.1, А).

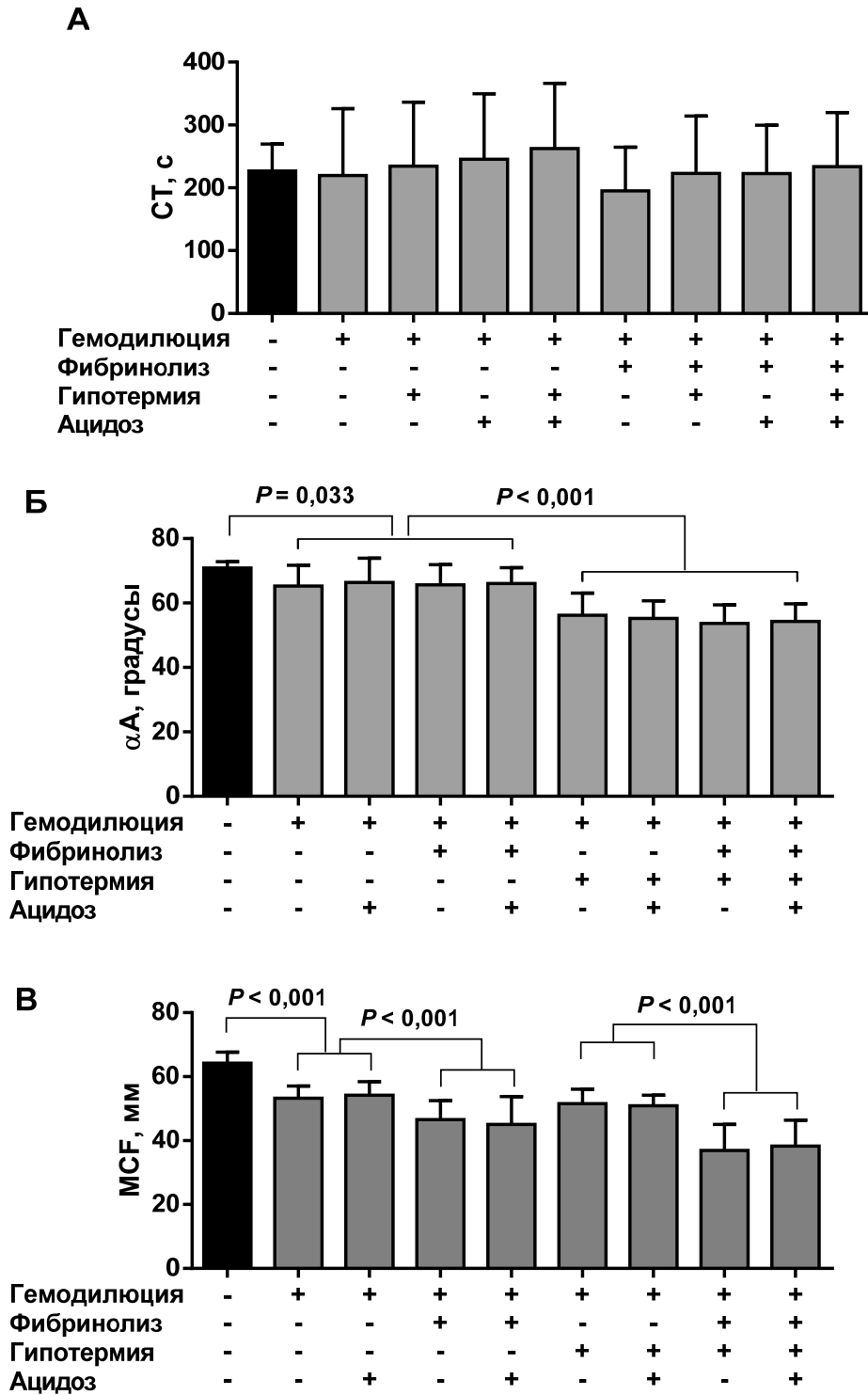
αA . В контроле αA составил $71,3 \pm 2,4^\circ$. Гемодилюция приводила к уменьшению данного показателя до $66,7 \pm 6,1^\circ$ ($P = 0,033$). В условиях гемодилюции снижение температуры крови приводило к дополнительному уменьшению αA , который составил $55,4 \pm 6,2^\circ$ ($P < 0,001$) (Рисунок 3.1, Б), и этот эффект не зависел

ни от уровня фибринолитической активности, ни от pH крови. При этом ни гиперфибринолиз, ни ацидоз сами по себе не оказывали влияния на αA в условиях гемодилюции ($P = 0,517$ и $P = 0,819$ соответственно).

МСФ. В контроле МСФ составила $64,3 \pm 3,4$ мм. Гемодилюция приводила к снижению этого показателя до $54,6 \pm 4,2$ мм ($P < 0,001$). Индукция фибринолиза в условиях гемодилюции оказывала различное влияние на величину МСФ в зависимости от температуры крови: при нормальной температуре разведенной крови индукция фибринолиза приводила к снижению МСФ с $54,6 \pm 4,2$ мм до $46,7 \pm 7,6$ мм ($P = 0,001$), а в условиях гипотермии — с $51,5 \pm 4,2$ мм до $38,8 \pm 8,6$ мм ($P < 0,001$). Иными словами, индукция фибринолиза в условиях гипотермии вызывала более выраженное снижение МСФ, чем при нормальной температуре разведенной крови, причем различие в степени снижения МСФ было статистически значимым ($P = 0,035$) (Рисунок 3.1, В). Было также установлено, что снижение температуры разведенной крови в отсутствие фибринолиза не оказывало статистически значимого влияния на величину МСФ ($P = 0,675$), однако при индукции фибринолиза приводило к ее снижению с $46,7 \pm 7,6$ мм до $38,8 \pm 8,6$ мм ($P = 0,001$). Следовательно, в условиях гемодилюции гипотермия сама по себе не оказывала заметного влияния на МСФ, но потенцировала угнетающий эффект гиперфибринолиза. При этом ацидоз не оказывал модифицирующего влияния на величину МСФ вне зависимости от температуры и фибринолитической активности разведенной крови.

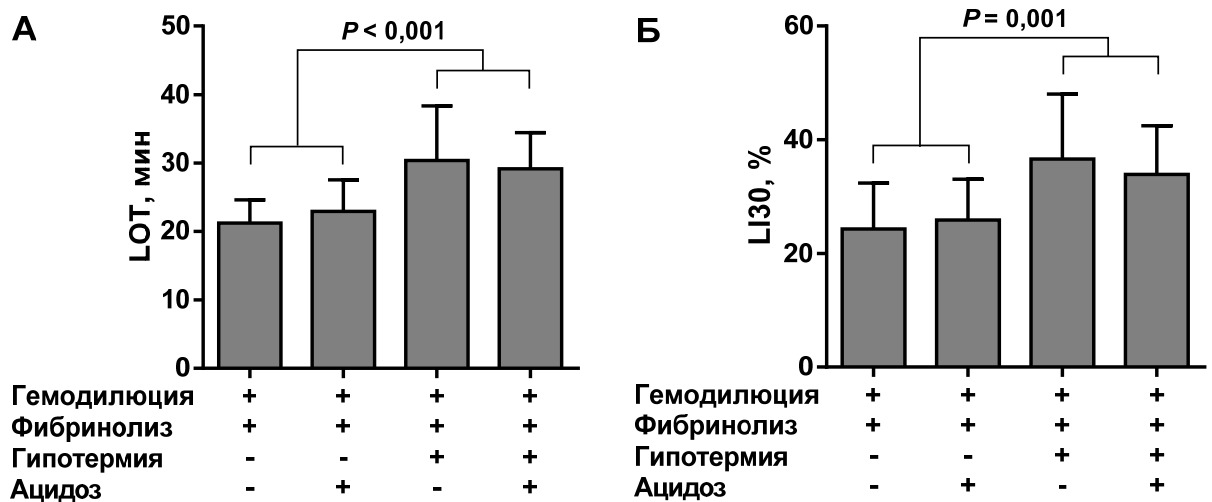
Спонтанный лизис сгустка в условиях гемодилюции не наблюдался. В связи с этим мы исследовали влияние гипотермии и ацидоза на показатели лизиса кровяного сгустка в условиях индуцированного фибринолиза и гемодилюции.

ЛОТ. Проведенные исследования показали, что в условиях гемодилюции гипотермия вызывала увеличение ЛОТ с $22,1 \pm 4,0$ мин до $29,8 \pm 6,6$ мин ($P < 0,001$), причем этот эффект зависел от pH разведенной крови (Рисунок 3.2, А). При этом ацидоз не оказывал влияния на продолжительность ЛОТ ни при нормальной, ни при пониженной температуре разведенной крови.



Гемодилюцию (40 %) создавали добавлением Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4), фибринолиз — 75 МЕ/мл tPA, ацидоз (pH 7,0–7,1) — 1,2 мг/мл молочной кислоты. Температура крови составила 31 °С. Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали время свертывания (А), угол альфа (Б) и максимальную плотность сгустка (В). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 10$). Сравнения средних проводили с помощью трехфакторного дисперсионного анализа с применением апостериорного критерия Шидака. Сравнения с контролем проводили с помощью анализа контрастов, при этом значения P были откорректированы по методу Шидака.

Рисунок 3.1 — Влияние гемодилюции, фибринолиза, гипотермии и ацидоза на формирование кровяного сгустка



Гемодилюцию (40 %) создавали добавлением Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4), фибринолиз — 75 МЕ/мл tPA, ацидоз (pH 7,0–7,1) — 1,2 мг/мл молочной кислоты. Температура крови составила 31 °С. Формирование и лизис кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали время начала лизиса (А) и индекс лизиса на 30-й минуте (Б). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 10$). Сравнения средних проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с применением апостериорного критерия Шидака.

Рисунок 3.2 — Влияние гемодилюции, фибринолиза, гипотермии и ацидоза на формирование кровяного сгустка

LI30. При исследовании LI30 было установлено, что снижение температуры разведенной крови приводило к увеличению LI30 с $25,1 \pm 7,5$ % до $35,1 \pm 9,8$ %, что наблюдалось вне зависимости от наличия ацидоза (Рисунок 3.2, Б). При этом ацидоз не оказывал влияния на величину LI30 ни при нормальной, ни при пониженной температуре разведенной крови.

Таким образом, проведенные исследования показали, что относительный вклад гемодилюции, гипотермии и ацидоза в нарушение формирования кровяного сгустка заключается в следующем:

1. Гемодилюция не оказывает влияния на время свертывания, но вызывает снижение скорости формирования кровяного сгустка и его максимальной плотности.
2. Гиперфибринолиз в условиях гемодилюции не влияет на время свертывания и скорость формирования сгустка, но потенцирует снижение плотности кровяного сгустка (особенно при гипотермии).
3. Гипотермия в условиях гемодилюции не влияет на время свертывания, замедляет формирование кровяного сгустка, но при этом не влияет на макси-

мальную плотность сгустка. В условиях гемодилюции, осложненной гиперфибринолизом, гипотермия потенцирует снижение максимальной плотности сгустка, но в то же время отдалает начало его лизиса.

4. Ацидоз в условиях гемодилюции не оказывает влияния ни на один из изученных показателей формирования и лизиса кровяного сгустка.

3.2. Коррекция гемостатического потенциала крови в условиях гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза

Существующие гемостатические препараты позволяют целенаправленно воздействовать на различные этапы формирования кровяного сгустка, однако эффективность их применения у пациентов с травматической коагулопатией невелика. Среди причин недостаточной эффективности обсуждается использование небольших доз этих препаратов [226], что объясняется стремлением минимизировать риск тромботических событий — чем меньше доза, тем меньше риск. Вероятно, повысить эффективность гемостатической терапии без увеличения риска нежелательных побочных эффектов, можно путем одновременного использования гемостатических препаратов с разным механизмом действия. Различие в механизмах действия предполагает возможность синергетического взаимодействия препаратов, а следовательно, достижения корригирующего эффекта даже при их использовании в небольших дозах, не вызывающих нежелательных реакций.

В связи с вышеизложенным в настоящем разделе нашей работы мы изучили возможность коррекции формирования и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка в условиях гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза (в модели травматической коагулопатии *in vitro*) с помощью комбинаций концентрата фибриногена, транексамовой кислоты (ТКК) и активированного концентрата протромбинового комплекса (АКПК) при их использовании в *субэффективных* концентрациях. При этом формирование и лизис кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM) и оценивали по максимальной плотности сгустка (MCF, мм) и времени начала лизиса (LOT, мин).

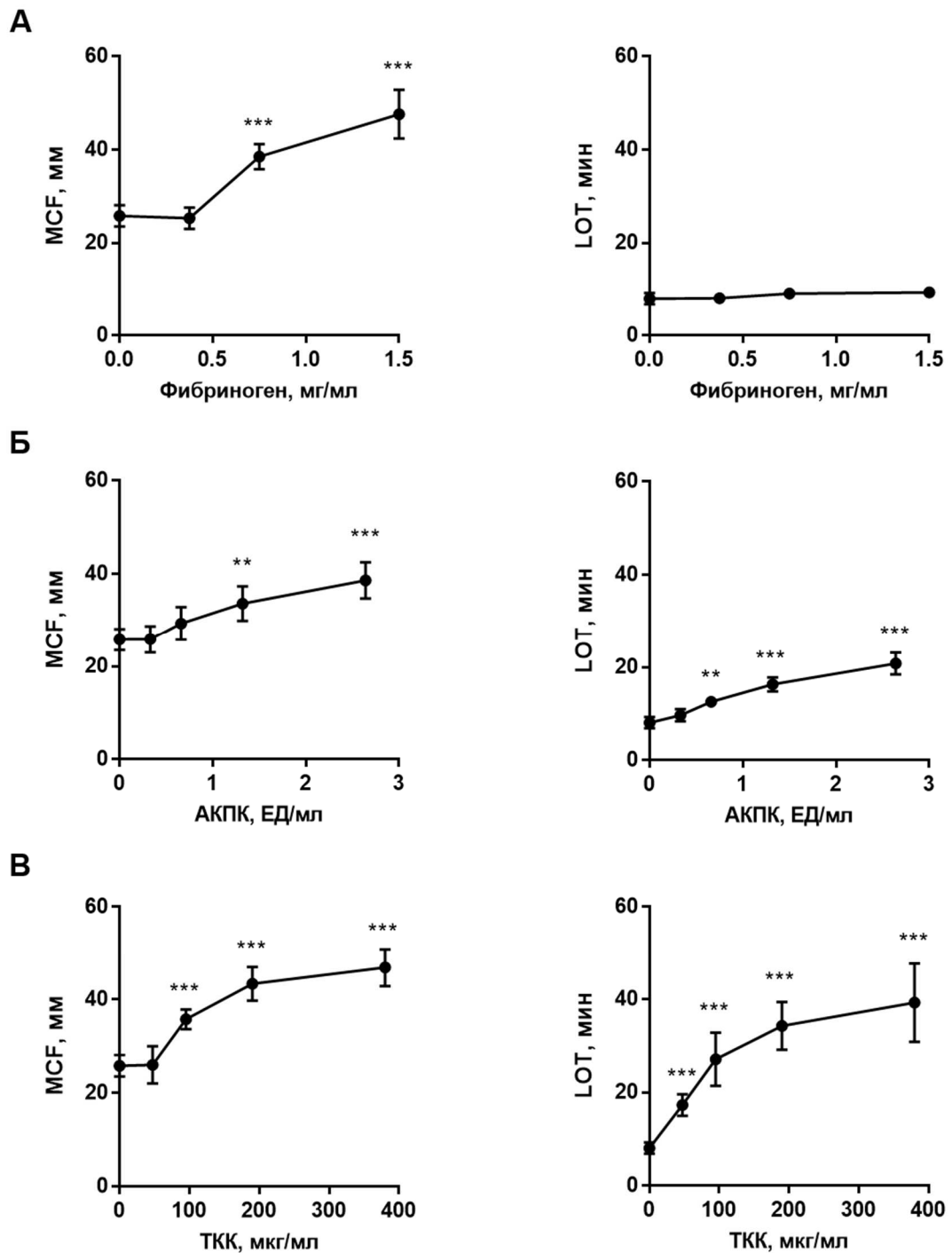
***Установление субэффективных концентраций
добавленного фибриногена, АКПК и ТКК***

В интактной крови MCF составила $62,0 \pm 3,7$ мм, спонтанный лизис сгустка отсутствовал. В модели травматической коагулопатии MCF составила $25,8 \pm 2,3$ мм ($P < 0,001$), при этом LOT составило $8,1 \pm 1,2$ мин.

Концентрат фибриногена добавляли в кровь так, чтобы конечная концентрация добавленного фибриногена в плазме составила 0,375, 0,75 и 1,5 мг/мл. Исследования показали, что повышение концентрации фибриногена на 0,375 мг/мл не оказывало влияния на MCF, а повышение на 0,75 и 1,5 мг/мл приводило к увеличению этого показателя до $38,5 \pm 2,7$ мм и $47,6 \pm 5,2$ мм соответственно ($P < 0,001$ для обоих сравнений) (Рисунок 3.3, А). Добавление в кровь фибриногена в указанном диапазоне концентраций не вызывало изменений LOT. Поскольку концентрация 0,375 мг/мл не оказывала заметного влияния ни на один из исследованных показателей, ее считали субэффективной.

АКПК добавляли в кровь так, чтобы его конечная концентрация в плазме составила 0,33, 0,66, 1,32 и 2,64 ЕД/мл. Исследования показали, что в концентрациях 0,33 и 0,66 ЕД/мл АКПК не оказывал влияния на MCF, но увеличивал ее при использовании в концентрациях 1,32 и 2,64 ЕД/мл, при которых она составила $33,6 \pm 3,7$ мм ($P = 0,006$) и $38,6 \pm 3,9$ мм ($P < 0,001$) соответственно (Рисунок 3.3, Б). Добавление АКПК в концентрации 0,33 ЕД/мл не оказывало влияния на LOT, а в концентрациях 0,66, 1,32 и 2,64 ЕД/мл вызывало последовательное увеличение этого показателя, который составил $12,6 \pm 1,2$ мин ($P = 0,001$), $16,3 \pm 1,5$ мин ($P < 0,001$) и $20,8 \pm 2,4$ мин ($P < 0,001$) соответственно. Поскольку концентрация АКПК 0,33 ЕД/мл не оказывала влияния ни на один из исследованных показателей, ее считали субэффективной.

ТКК добавляли в кровь так, чтобы ее конечная концентрация в плазме составила 47,5, 95, 190 и 380 мкг/мл. Исследования показали, что в концентрации 47,5 мкг/мл ТКК не оказывала влияния на MCF, но увеличивала этот показатель при использовании в концентрациях 95, 190 и 380 мкг/мл, при которых он составил $35,8 \pm 2,1$ мм, $43,4 \pm 3,6$ мм и $46,9 \pm 4,0$ мм соответственно ($P < 0,001$ для всех трех



Гемодилюцию (40 %) создавали добавлением Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4), фибринолиз — 150 МЕ/мл tPA, ацидоз (pH 7,0–7,1) — 1,2 мг/мл молочной кислоты. Температура крови составила 31 °C. В кровь добавляли фибриноген (А), АКПК (Б) и ТКК (В). Конечные концентрации в плазме указаны на рисунке. Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали максимальную плотность сгустка (MCF, мм) и 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 Даннетта. $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, сравнения с нулевой концентрацией.

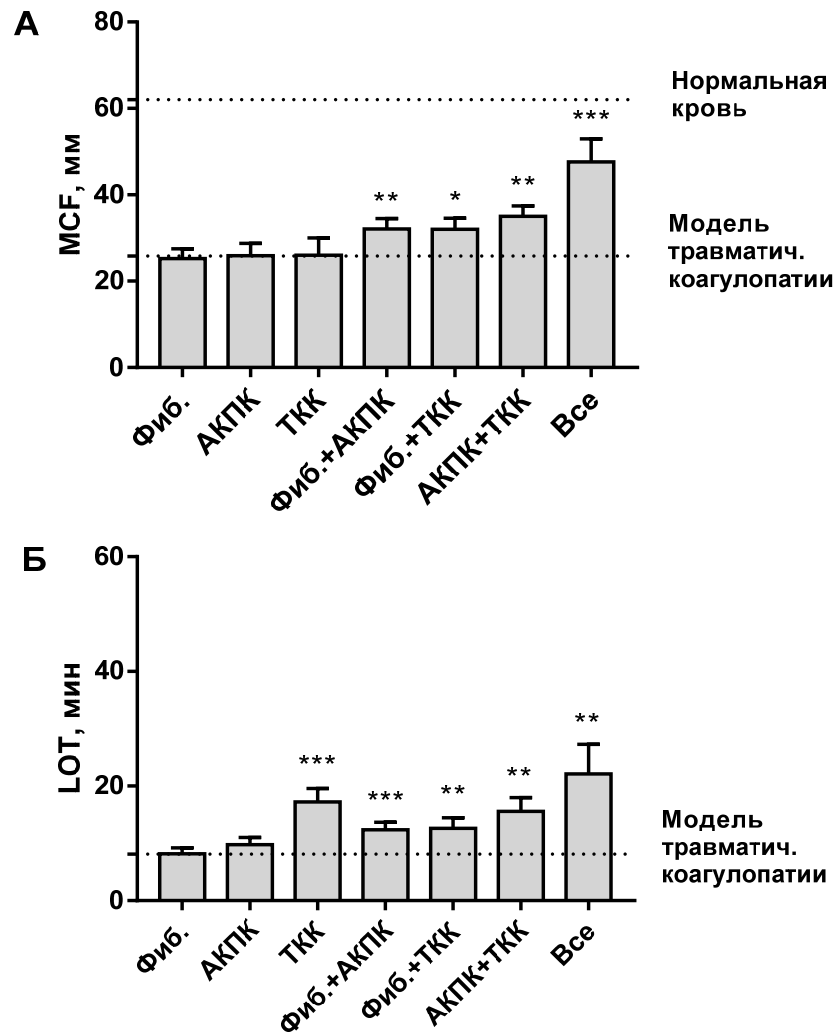
Рисунок 3.3 — Влияние возрастающих концентраций фибриногена, АКПК и ТКК на формирование и лизис сгустка в модели травматической коагулопатии *in vitro*

сравнений) (Рисунок 3.3, В). По мере увеличения концентрации ТКК отмечалось прогрессирующее угнетение фибринолиза, что выражалось в увеличении LOT с $8,1 \pm 1,2$ мин до $17,3 \pm 2,3$ мин, $27,1 \pm 5,7$ мин, $34,3 \pm 5,1$ мин и $39,3 \pm 8,4$ мин соответственно ($P < 0,001$ для всех четырех сравнений). Поскольку концентрация ТКК $47,5$ мкг/мл, хотя и увеличивала LOT, не вызывала изменений MCF, ее считали субэффективной.

***Влияние комбинаций концентрата фибриногена,
АКПК и ТКК в субэффективных концентрациях
на формирование и лизис кровяного сгустка***

При добавлении в кровь фибриногена, АКПК или ТКК в субэффективных конечных концентрациях MCF не претерпевала существенных изменений по сравнению с контролем (Рисунок 3.4). Добавление 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 в комбинации с ТКК повышало MCF до $35,0 \pm 2,4$ ($P = 0,002$), что свидетельствует о синергетическом взаимодействии этих препаратов. При одновременном добавлении всех трех препаратов MCF возрастала до $47,6 \pm 5,3$ 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 или АКПК не оказывало влияния на LOT, а добавление ТКК вызывало его увеличение с $8,1 \pm 1,2$ мин до $17,3 \pm 2,3$ мин ($P < 0,001$). Добавление концентрата фибриногена в комбинации с АКПК повышало LOT до $12,4 \pm 1,3$ мин ($P < 0,001$), что указывает на их синергетическое взаимодействие. Добавление концентрата фибриногена в комбинации с ТКК повышало LOT до $12,6 \pm 1,8$ мин ($P = 0,002$), что было статистически значимо меньше, чем при использовании ТКК отдельно ($P = 0,030$). Добавление АКПК в комбинации с ТКК повышало LOT до $15,5 \pm 2,4$ мин ($P = 0,003$), что не отличалось от его значения при использовании ТКК отдельно ($P = 0,985$). При одновременном использовании всех трех гемостатиков отмечалось наибольшее увеличение этого



Гемодилюцию (40%) создавали добавлением Трис-буферизированного 0,9% раствора NaCl (pH 7,4), фибринолиз — 150 МЕ/мл tPA, ацидоз (pH 7,0–7,1) — 1,2 мг/мл молочной кислоты. Температура крови составила 31 °C. Гемостатики добавляли в кровь, так что их концентрация в пересчете на 1 мл плазмы составила: 0,375 мг/мл фибриногена (Фиб.), 0,33 ЕД/мл АКПК и/или 47,5 мкг/мл ТКК. Формирование 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 $M \pm SD$ ($n = 8$). Оценку статистической значимости различий 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 3.4 — Влияние комбинаций фибриногена, АКПК и ТКК в субэффективных концентрациях на формирование и лизис кровяного сгустка в модели травматической коагулопатии *in vitro*

показателя, который составил $22,2 \pm 5,1$ мин, что было статистически значимо больше, чем при использовании гемостатиков в двойных комбинациях ($P < 0,05$ для всех трех сравнений).

Следовательно, применение любых двойных комбинаций концентрата фибриногена, АКПК и/или ТКК в *субэффективных* концентрациях вызывает коррекцию плотности сгустка, тогда как их применение по отдельности в тех же концентрациях не вызывает коррекции этого показателя, что свидетельствует о синергетическом взаимодействии указанных препаратов. Кроме того, одновременное применение концентрата фибриногена и АКПК вызывает отчетливый антифибринолитический эффект, что также указывает на их синергетическое взаимодействие. В то же время антифибринолитический эффект комбинации ТКК и АКПК не превышает таковой при использовании ТКК отдельно, а антифибринолитический эффект комбинации ТКК и концентрата фибриногена является менее выраженным, чем при использовании ТКК отдельно.

Влияние концентрата фибриногена на антифибринолитическую активность ТКК

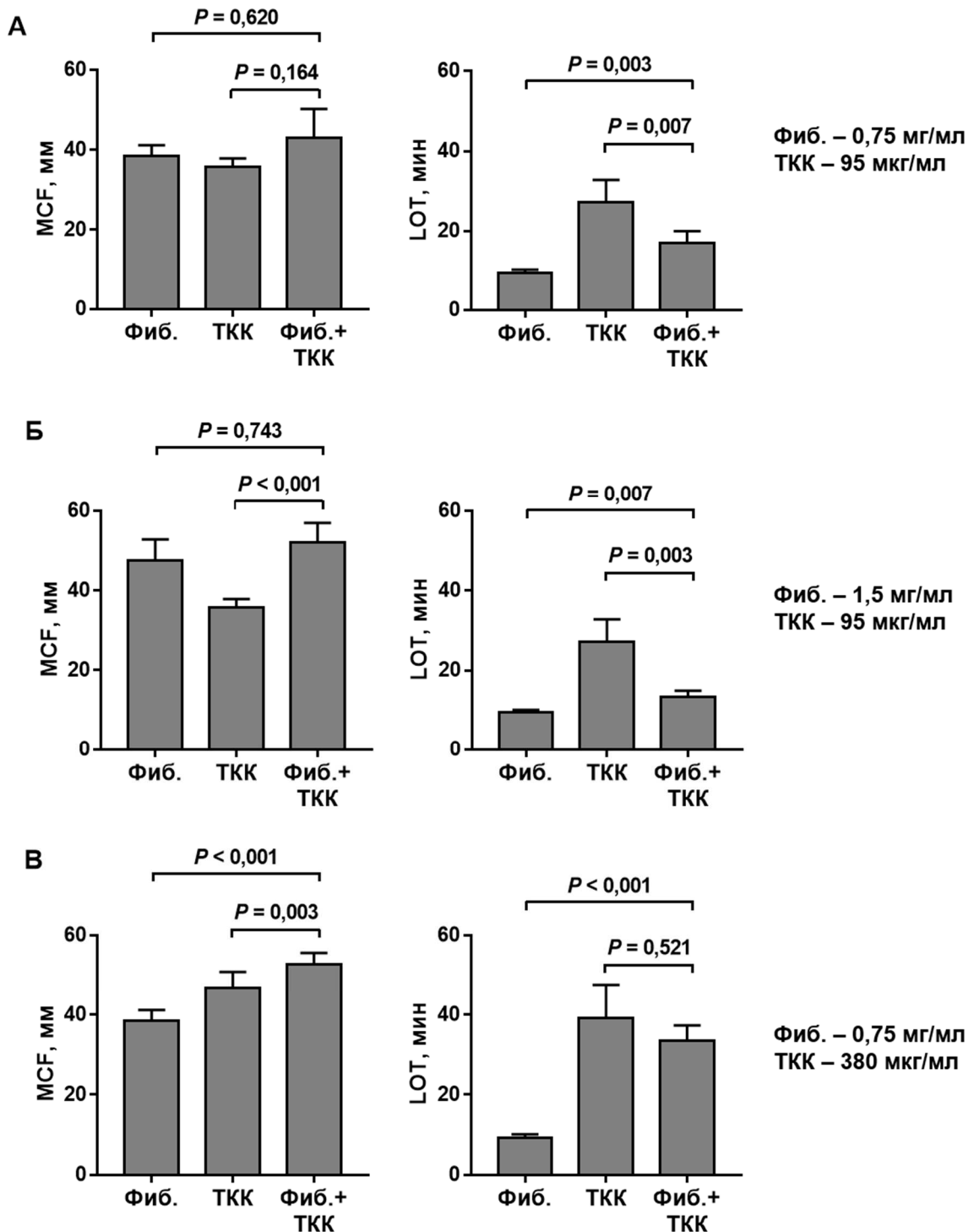
В предыдущей серии экспериментов (Рисунок 3.4) мы установили, что применение ТКК в комбинации с концентратом фибриногена вызывает большую коррекцию MCF, но меньшую коррекцию LOT по сравнению с таковой при использовании ТКК отдельно, что свидетельствует об определенном взаимодействии между указанными препаратами. Для более детального анализа этого взаимодействия мы изучили влияние ТКК и концентрата фибриногена в разных конечных концентрациях по отдельности и в комбинации на формирование и лизис кровяного сгустка в тех же условиях.

Эффект 95 мкг/мл ТКК и 0,75 мг/мл концентрата фибриногена. При использовании фибриногена и ТКК в данных концентрациях по отдельности MCF составила $38,5 \pm 2,7$ мм и $35,8 \pm 2,1$ мм соответственно, а при их одновременном применении — $43,0 \pm 7,0$ мм ($P = 0,620$ и $P = 0,164$ соответственно). При добавлении в кровь концентрата фибриногена и ТКК по отдельности LOT составило $9,2 \pm 0,9$ мин и $27,1 \pm 5,7$ мин соответственно, а при одновременном применении этих препаратов — $16,9 \pm 3,0$ мин, что было статистически значимо

меньше, чем при добавлении ТКК отдельно ($P = 0,007$) (Рисунок 3.5, А). Иными словами, фибриноген ослаблял антифибринолитическое действие ТКК.

Эффект 95 мкг/мл ТКК и 1,5 мг/мл концентрата фибриногена. Далее мы предположили, что если фибриноген ослабляет антифибринолитическое действие ТКК, то увеличение его концентрации должно привести к дальнейшему ослаблению эффекта ТКК. Для проверки этого предположения мы провели аналогичный эксперимент, в котором концентрацию ТКК сохранили на уровне 95 мкг/мл, а концентрацию добавленного фибриногена увеличили вдвое — до 1,5 мг/мл. Проведенные исследования показали, что при добавлении в кровь концентрата фибриногена и ТКК в этих концентрациях по отдельности MCF составила $47,6 \pm 5,2$ мм и $35,8 \pm 2,1$ мм соответственно, а при их одновременном добавлении — $52,0 \pm 5,0$ мм, однако этот дополнительный прирост не был статистически значимым ($P = 0,743$; сравнение с концентратом фибриногена). LOT при использовании концентрата фибриногена составило $9,4 \pm 0,6$ мин, а при использовании ТКК — $27,1 \pm 5,7$ мин, что указывает на более выраженное антифибринолитическое действие этого препарата. При одновременном добавлении в кровь этих препаратов в тех же концентрациях LOT увеличивалось лишь до $13,4 \pm 1,5$ мин, что было статистически значимо меньше, чем при использовании ТКК отдельно ($P = 0,003$) и в комбинации с фибриногеном в концентрации 0,75 мг/мл ($P = 0,188$) (Рисунок 3.5, Б). Эти результаты подтверждают, что увеличение концентрации фибриногена препятствует реализации антифибринолитического действия ТКК.

Эффект 380 мкг/мл ТКК и 0,75 мг/мл концентрата фибриногена. Далее мы изучили возможность преодоления эффекта фибриногена, заключающегося в угнетении антифибринолитической активности ТКК, путем увеличения концентрации последней. Для этого мы увеличили концентрацию ТКК до 380 мкг/мл, оставив концентрацию добавленного фибриногена на уровне 0,75 мг/мл. Исследования показали, что при использовании концентрата фибриногена и ТКК в указанных концентрациях по отдельности MCF составила соответственно $38,5 \pm 2,7$ мм и $46,9 \pm 4,0$ мм, а при их одновременном использовании — $52,8 \pm 2,9$ мм ($P < 0,001$ и $P = 0,027$ соответственно). При добавлении в кровь концентрата фибриногена LOT



Гемодилюцию (40%) создавали добавлением Трис-буферизированного 0,9% раствора NaCl (pH 7,4), фибринолиз — 150 МЕ/мл tPA, ацидоз (pH 7,0–7,1) — 1,2 мг/мл молочной кислоты. Температура крови составила 31 °С. Концентрат фибриногена и/или ТКК добавляли в кровь, так что их концентрации в пересчете на 1 мл плазмы составили соответственно 0,75 мг/мл и 95 мкг/мл (А), 1,5 мг/мл и 95 мкг/мл (Б) и 0,75 мг/мл и 380 мкг/мл (В). Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали максимальную плотность сгустка (MCF, мм) и 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.

Рисунок 3.5 — Взаимодействие между концентратом фибриногена и ТКК в модели травматической коагулопатии

не отличалось от контроля, а при добавлении ТКК — возрастало до $39,3 \pm 8,4$ мин. При одновременном применении этих препаратов LOT составило $33,5 \pm 3,7$ мин, что статистически значимо не отличалось от его значения при использовании ТКК отдельно ($P = 0,521$) (Рисунок 3.5, В).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение концентрации фибриногена в плазме действительно приводит к ослаблению антифибринолитического действия ТКК и что данный эффект фибриногена может быть преодолен путем увеличения конечной концентрации ТКК в крови.

* * *

Таким образом, исследование возможности коррекции гемостатического потенциала крови в модели травматической коагулопатии *in vitro*, включающей гемодилюции, гиперфибринолиз, гипотермию и ацидоз, подтвердило наше предположение о том, что заметная коррекция плотности кровяного сгустка может быть достигнута при комбинированном применении концентрата фибриногена, АКПК и ТКК в *субэффективных* концентрациях, т. е. в концентрациях в которых по отдельности эти препараты не оказывают влияния на данный показатель.

Комбинированное использование концентрата фибриногена и АКПК в *субэффективных* концентрациях вызывает также отчетливый антифибринолитический эффект. В то же время антифибринолитический эффект комбинации ТКК и АКПК не превышает таковой при использовании ТКК отдельно, а при использовании ТКК в комбинации с фибриногеном отмечается ослабление антифибринолитического действия ТКК, что, однако, может быть преодолено путем увеличения концентрации последней.

3.3. Коррекция гемостатического потенциала крови в условиях гемодилюции в зависимости от уровня фибринолитической активности плазмы

Эффективность антифибринолитиков и концентратов факторов свертывания при кровотечениях в результате тяжелых травм и обширных хирургических операций показана не во всех исследованиях. Возможной причиной их недостаточной эффективности в ряде случаев является недооценка уровня фибрино-

литической активности плазмы у пациента. Для проверки этого предположения мы исследовали влияние концентрата фибриногена, концентрата FXIII и TAFI (как потенциального антифибринолитика) на гемостатический потенциал крови в условиях гемодилюции, осложненной и не осложненной гиперфибринолизом.

Нарушения гемостатического потенциала крови и возможности его коррекции при гемодилюции, не осложненной гиперфибринолизом

Гемостатический потенциал крови оценивали по показателям коагулограммы, теста генерации тромбина и ротационной тромбоэластометрии. Степень гемодилюции в данной серии экспериментов составила 30 и 60 %. Гемостатические препараты добавляли в кровь так, чтобы их конечная концентрация в пересчете на 1 мл плазмы составила: 3 мг/мл концентрата фибриногена, 2 МЕ/мл концентрата FXIII и 0,25 ЕД/мл TAFI.

1. Влияние гемодилюции на показатели коагулограммы и возможности их коррекции с помощью концентратов фибриногена и FXIII

Прежде всего мы изучили влияние гемодилюции на гематокрит, содержание тромбоцитов и показатели скрининговых тестов для оценки коагуляционного звена системы гемостаза — концентрацию фибриногена, протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и тромбиновое время (ТВ). Из Таблицы 3.1 видно, что разведение крови на 30 % приводило к снижению гематокрита в 1,43 раза ($P < 0,001$), содержания тромбоцитов — в 1,63 раза ($P < 0,001$). При этом концентрация фибриногена снижалась в 1,41 раза ($P = 0,012$), продолжительность ТВ увеличивалась в 1,29 раза ($P < 0,001$), а продолжительность ПВ и АЧТВ существенно не изменялась. Разведение крови на 60 % приводило к более выраженным изменениям этих показателей. По сравнению с неразведенной кровью гематокрит снижался в 2,49 раза, содержание тромбоцитов — в 2,54 раза, концентрация фибриногена — в 2,28 раза, при этом ПВ увеличивалось в 1,74 раза, АЧТВ — в 2,00 раза и ТВ — в 1,74 раза ($P < 0,001$ для всех сравнений).

Таблица 3.1 — Гематокрит, содержание тромбоцитов и показатели скрининговой коагулограммы при гемодилюции

Показатель	M ± SD	Значение P*
Гематокрит, %:		
Гемодилюция 0 %	41,9 ± 2,0	—
Гемодилюция 30 %	29,3 ± 1,7	< 0,001
Гемодилюция 60 %	16,8 ± 0,9	< 0,001
Концентрация тромбоцитов, × 10⁹ л⁻¹:		
Гемодилюция 0 %	292 ± 29	—
Гемодилюция 30 %	179 ± 35	< 0,001
Гемодилюция 60 %	115 ± 14	< 0,001
Концентрация фибриногена, г/л:		
Гемодилюция 0 %	3,17 ± 0,50	—
Гемодилюция 30 %	2,25 ± 0,31	0,012
Гемодилюция 60 %	1,39 ± 0,24	< 0,001
ПВ, с:		
Гемодилюция 0 %	13,6 ± 2,3	—
Гемодилюция 30 %	16,1 ± 2,6	0,197
Гемодилюция 60 %	23,7 ± 4,3	< 0,001
АЧТВ, с:		
Гемодилюция 0 %	25,7 ± 1,5	—
Гемодилюция 30 %	30,7 ± 2,4	0,928
Гемодилюция 60 %	51,5 ± 9,4	< 0,001
ТВ, с:		
Гемодилюция 0 %	13,7 ± 0,5	—
Гемодилюция 30 %	17,7 ± 0,7	< 0,001
Гемодилюция 60 %	23,9 ± 2,9	< 0,001

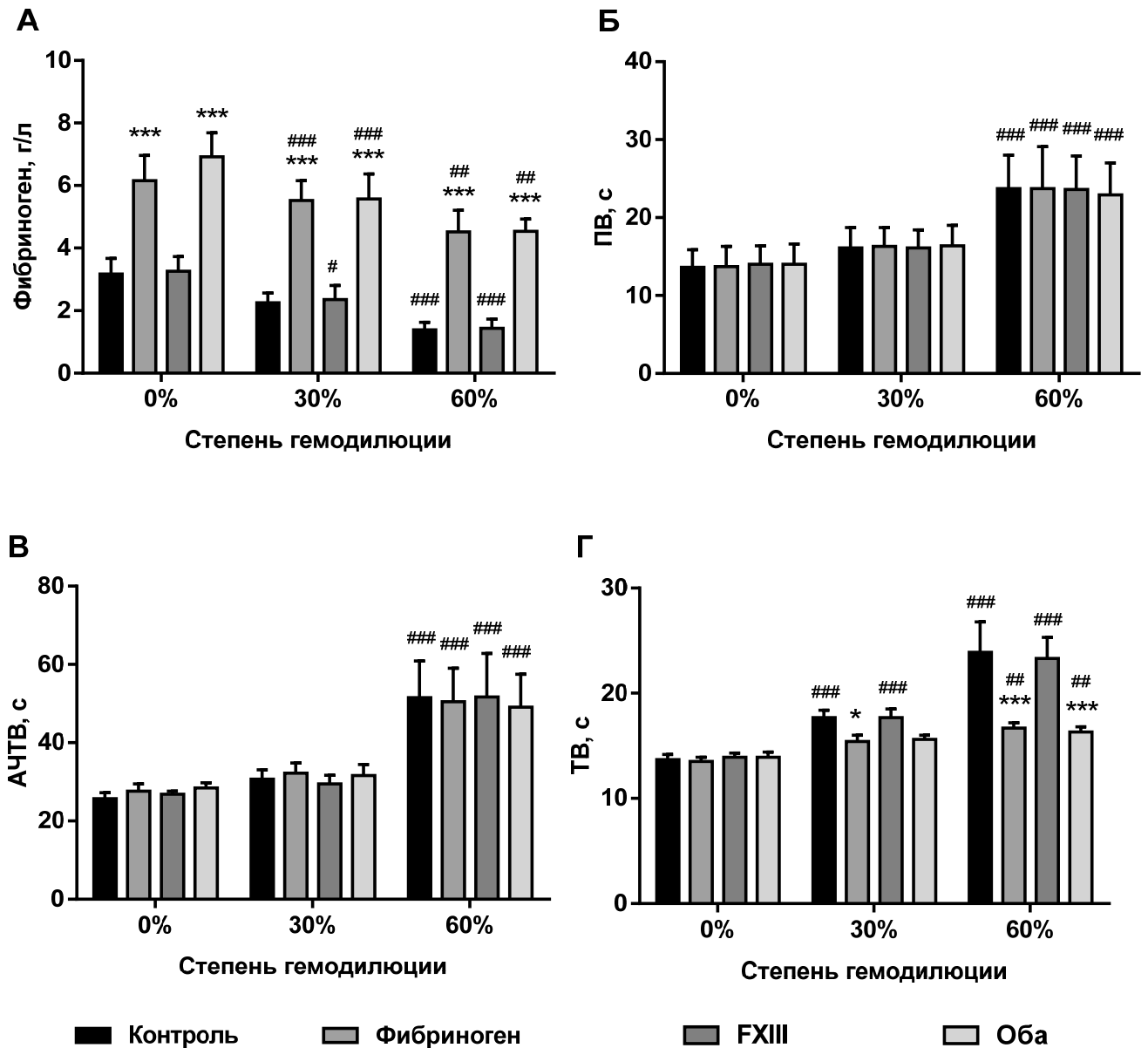
Примечание: Гемодилюцию создавали добавлением в кровь необходимого количества Трис-буферизированного 0,9% раствора NaCl (pH 7,4). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Шидака. *Сравнения с гемодилюцией 0 % (неразведенной кровью).

Добавление в кровь концентрата фибриногена ожидаемо приводило к увеличению его концентрации в исследуемых образцах. Увеличение концентрации фибриногена в цельной крови не отражалось на продолжительности ПВ, АЧТВ и ТВ; в условиях 30 % гемодилюции — приводило к укорочению ТВ с $17,7 \pm 0,7$ с до $15,4 \pm 0,6$ с ($P = 0,036$), что статистически значимо не отличалось от значения в контроле для цельной крови ($P = 0,302$); в условиях 60 % гемодилюции — приводило к сокращению ТВ с $23,9 \pm 2,9$ с до $16,7 \pm 0,5$ с ($P < 0,001$), что, однако, было статистически значимо больше, чем значение ТВ в контроле для цельной крови ($P = 0,001$) (Рисунок 3.6). Добавление концентрата фибриногена не оказывало значимого влияния на продолжительность АЧТВ и ПВ ни при 30 %, ни при 60 % гемодилюции. Добавление в кровь концентрата FXIII не вызывало изменений одного из исследованных показателей коагулограммы вне зависимости от степени гемодилюции. Одновременное добавление в кровь концентратов фибриногена и FXIII вызывало изменения, схожие с теми, которые были отмечены при добавлении концентрата фибриногена отдельно.

Таким образом, анализ хронометрических показателей коагулограммы показал, что продолжительность ПВ и АЧТВ не претерпевает значимых изменений в условиях 30 % гемодилюции, но увеличивается в условиях 60 % гемодилюции. Добавление в разведенную кровь концентратов фибриногена и/или FXIII не оказывает влияния на эти показатели коагулограммы независимо от степени гемодилюции. В отличие от этого продолжительность ТВ увеличивается уже при 30 % гемодилюции и становится еще больше при 60 % гемодилюции, а добавление в разведенную кровь концентрата фибриногена вызывает его полную коррекцию при 30 % гемодилюции и частичную — при 60 % гемодилюции. Добавление в разведенную кровь концентрата FXIII не оказывает влияния на ТВ.

2. Влияние гемодилюции на генерацию тромбина и возможности ее коррекции с помощью концентрата фибриногена, FXIII и TAFI

Генерацию тромбина изучали в ОТП, которую получали центрифугированием разведенной крови. Гемостатические препараты добавляли в кровь перед



Гемодилюцию создавали добавлением Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (рН 7,4). Гемостатики добавляли в кровь, так что конечная концентрация в пересчете на 1 мл плазмы составила: 3 мг/мл концентрата фибриногена, 2 МЕ/мл FXIII. В контрольные образцы добавляли такой же объем PBS (рН 7,4). Исследовали концентрацию фибриногена (А), протромбиновое время (Б), активированное частичное тромбопластиновое время (В) и тромбиновое время (Г). Результаты представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 6$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ — сравнение с соответствующим контролем; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ — сравнение с контролем для цельной крови (гемодилюция 0%).

Рисунок 3.6 — Влияние концентратов фибриногена и FXIII на показатели скрининговой коагулограммы в условиях гемодилюции

центрифугированием. Генерацию тромбина оценивали по продолжительности времени инициации (*мин*), пиковой концентрации тромбина (ПКТ, *нмоль/л*) и величине эндогенного тромбинового потенциала (ЭТП, *нмоль/л × мин*).

В неразведенной крови время инициации составило $4,11 \pm 0,19$ мин, ПКТ — 254 ± 8 нмоль/л, ЭТП — 195 ± 83 нмоль/л $\times$ мин. Разведение крови на 30 % не вызывало статистически значимых изменений указанных показателей тромбограммы. Разведение крови на 60 % приводило к снижению ПКТ до 201 ± 8 нмоль/л ($P < 0,001$), не оказывая при этом значимого влияния на время инициации и величину ЭТП (Рисунок 3.7). Обращает внимание более пологая нисходящая часть тромбограммы при гемодилюции, свидетельствующая о замедлении ингибирования генерации тромбина.

Добавление концентратов фибриногена, FXIII или TAFI как в цельную, так и в разведенную на 30 или 60 % кровь не вызывало существенных изменений ни одного из исследованных показателей тромбограммы (Рисунок 3.8).

3. Влияние гемодилюции на формирование кровяного сгустка и возможности его коррекции с помощью концентрата фибриногена, FXIII и TAFI

Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM) и оценивали по времени свертывания (СТ, с), углу альфа (αA , °) и максимальной плотности сгустка (MCF, мм). Репрезентативные тэмограммы, отражающие формирование кровяного сгустка при гемодилюции, представлены на Рисунке 3.9.

СТ. В неразведенной крови СТ составило 216 ± 31 с. Разведение крови на 30 и 60 % не приводило к существенному изменению данного показателя. Добавление в цельную или разведенную кровь концентратов фибриногена, FXIII и TAFI как по отдельности, так и в комбинации также не отражалось на продолжительности СТ (Рисунок 3.10, А).

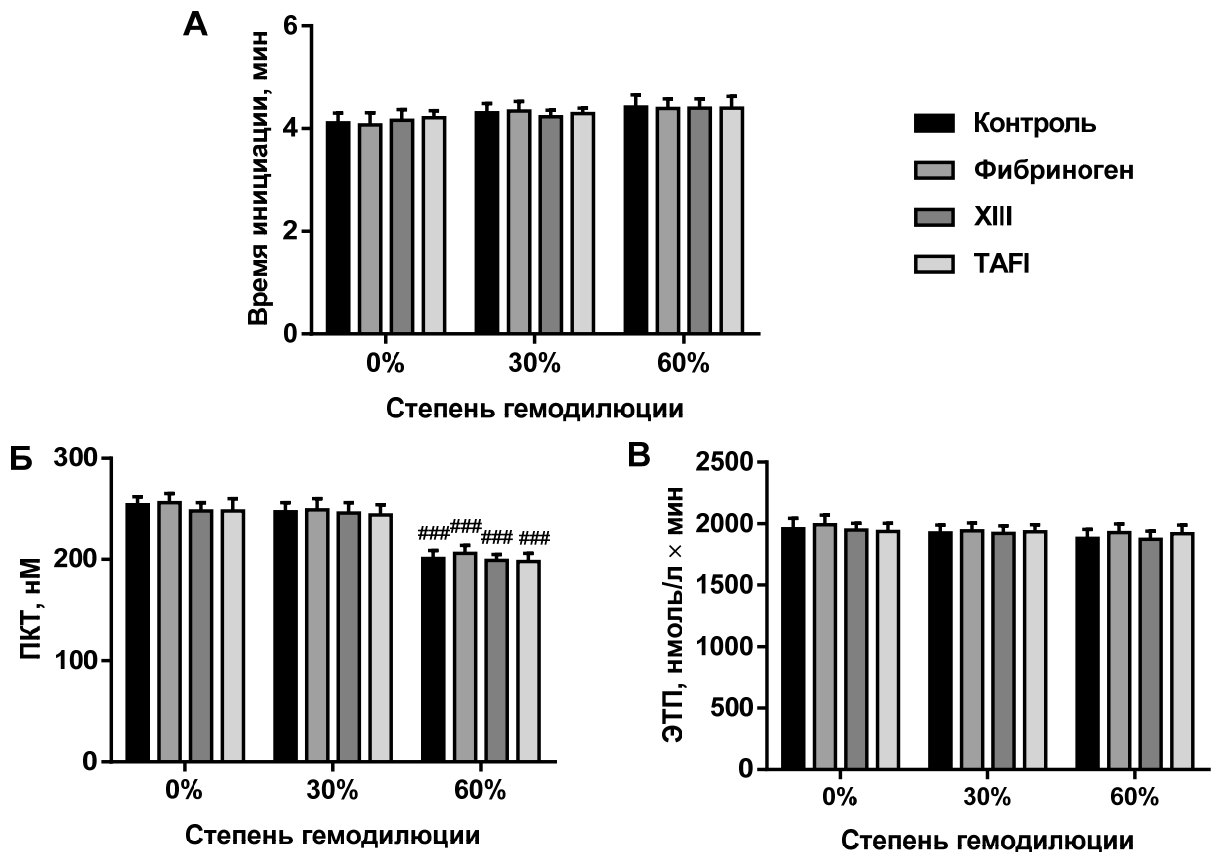
αA . В неразведенной крови αA составил $68,8 \pm 3,6^\circ$. Добавление в цельную кровь концентратов фибриногена, FXIII и TAFI по отдельности или в комбинации не отражалось на величине данного показателя (Рисунок 3.10, Б).

При разведении крови на 30 % αA снижался незначительно и составил $62,3 \pm 9,0^\circ$ ($P = 0,734$). Добавление в разведенную кровь концентрата фибриногена увеличивало αA до $75,8 \pm 4,3^\circ$ ($P = 0,001$), что не отличалось от его значения в цельной крови ($P = 0,367$). Добавление концентрата FXIII или TAFI не оказывало



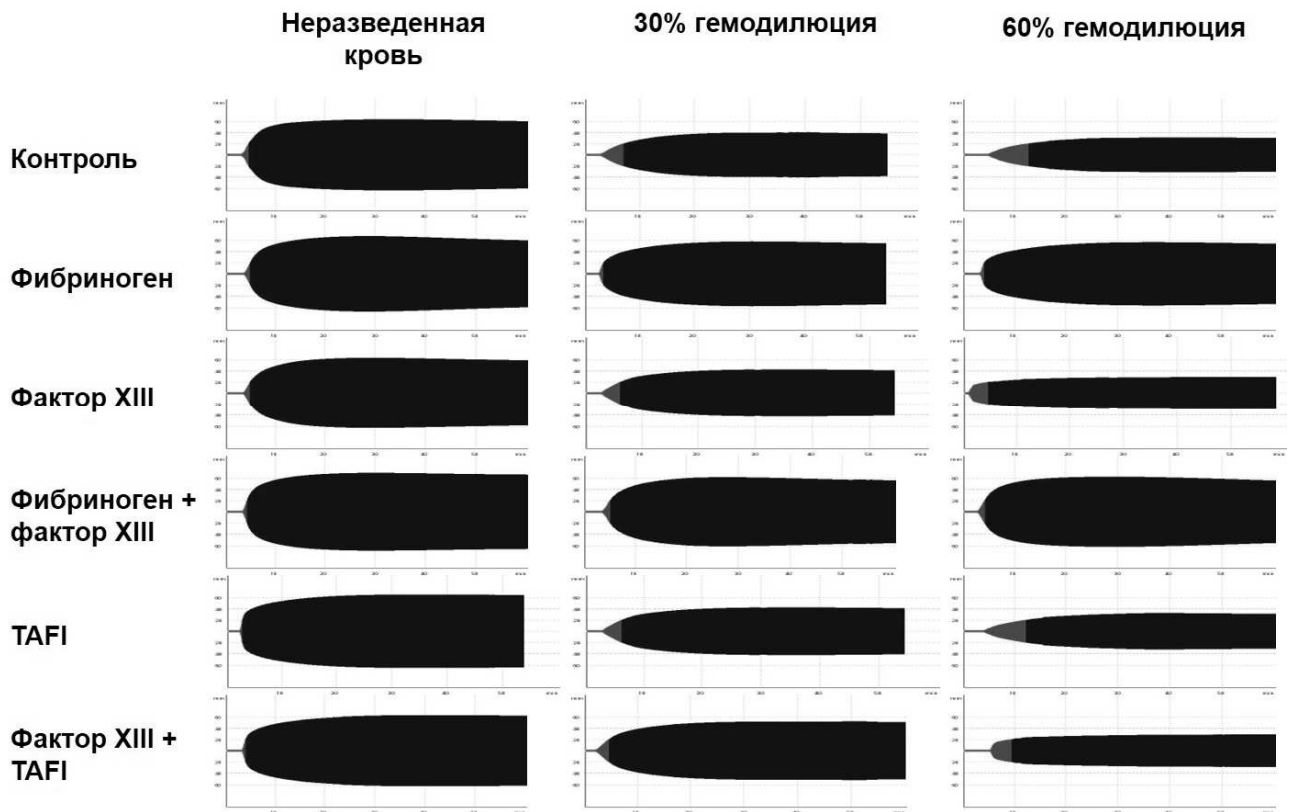
В цитратную кровь добавляли Трис-буферизированный 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4) и центрифугировали для получения ОТП. Генерацию тромбина индуцировали путем рекальцификации ОТП и добавления 0,2 пмоль/л тканевого фактора. Представлены репрезентативные тромбограммы одного из четырех независимых экспериментов.

Рисунок 3.7 — Генерация тромбина в цельной крови и при 60 % гемодилюции



Гемодилюцию создавали добавлением Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4). Гемостатики добавляли в кровь так, чтобы их конечная концентрация в пересчете на 1 мл плазмы составила: 3 мг/мл концентрата фибриногена, 2 МЕ/мл FXIII и/или 2 ЕД/мл TAFI. В контрольные образцы добавляли такой же объем PBS (pH 7,4). Генерацию тромбина индуцировали путем рекальцификации ОТП и добавления в нее 0,2 пмоль/л тканевого фактора. Анализировали время инициации (А), пиковую концентрацию тромбина (Б) и эндогенный тромбиновый потенциал (В). Результаты представлены в виде среднего $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака. $###P < 0,001$ — сравнение с контролем для неразведенной крови.

Рисунок 3.8 — Влияние концентрата фибриногена, концентрата FXIII и TAFI на показатели тромбограммы в цельной и разведенной крови

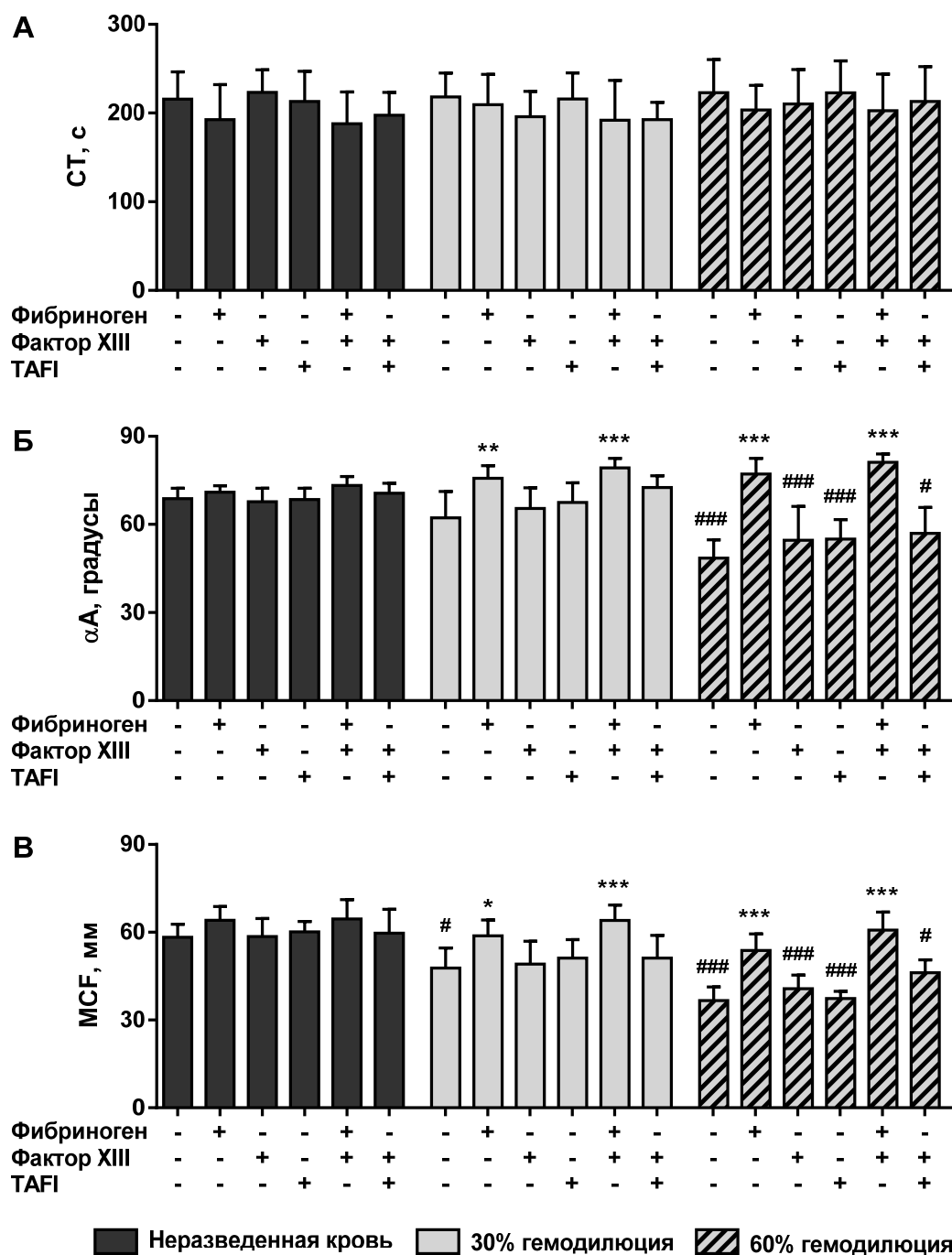


Цитратную кровь развели добавлением Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4). В кровь добавляли концентрат фибриногена (3 г/л), FXIII (2 МЕ/мл) и/или TAFI (2 ЕД/мл). В контрольные образцы вместо указанных препаратов добавляли такой же объем PBS (pH 7,4). Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Представлены репрезентативные тэмограммы одного из восьми независимых экспериментов.

Рисунок 3.9 — Влияние концентрата фибриногена, FXIII и TAFI на формирование кровяного сгустка в условиях гемодилюции

значимого влияния на величину данного показателя. Эффект от одновременного добавления концентратов фибриногена и FXIII не отличался от такового при добавлении фибриногена отдельно. Одновременное добавление концентрата FXIII и TAFI не вызывало статистически значимого увеличения αA .

Разведение крови на 60 % вызывало более существенное снижение αA — до $48,5 \pm 6,3^\circ$ ($P < 0,001$, сравнение с цельной кровью). Добавление концентрата фибриногена в этих условиях повышало αA до $77,1 \pm 5,3^\circ$ ($P < 0,001$), что не отличалось от его значения в цельной крови ($P = 0,289$). Эффект от одновременного добавления концентрата фибриногена и XIII фактора не отличался от такового при добавлении фибриногена отдельно. Добавление концентрата FXIII и TAFI как по отдельности, так и одновременно не оказывало значимого влияния на αA .



Цитратную кровь разводили добавлением Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4). В кровь добавляли концентрат фибриногена (3 г/л), FXIII (2 МЕ/мл) и/или TAFI (2 ЕД/мл). В контрольные образцы добавляли PBS (pH 7,4). Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Оценивали время свертывания (А), угол альфа (Б) и максимальную плотность сгустка (В). 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 цельной крови.

Рисунок 3.10 — Влияние концентрата фибриногена, концентрата FXIII и TAFI на показатели формирования кровяного сгустка при гемодилюции

МСФ. В неразведенной крови МСФ составила $58,3 \pm 4,5$ мм. Добавление в цельную кровь концентратов фибриногена, FXIII и TAFI по отдельности или в комбинации не отражалось на величине данного показателя (Рисунок 3.10, В).

При разведении крови на 30 % МСФ снижалась до $47,8 \pm 6,8$ мм ($P = 0,044$). Добавление в разведенную кровь концентрата фибриногена повышало значение данного показателя до $58,8 \pm 5,5$ мм ($P = 0,026$), что не отличалось от его значения в цельной крови ($P = 0,991$). Добавление концентрата FXIII и TAFI как по отдельности, так и одновременно не вызывало существенных изменений МСФ. При одновременном добавлении концентратов фибриногена и FXIII значение МСФ не отличалось от такового при добавлении фибриногена отдельно.

Разведение крови на 60 % вызывало дальнейшее снижение МСФ, которая составила $36,6 \pm 4,7$ мм ($P = 0,023$, сравнение с 30% разведением). Добавление фибриногена повышало значение данного показателя до $53,8 \pm 5,7$ мм ($P < 0,001$), что не отличалось от его значения в цельной крови ($P = 0,985$). Добавление концентрата FXIII и TAFI как по отдельности, так и одновременно не оказывало статистически значимого влияния на величину МСФ. Одновременное добавление концентратов фибриногена и FXIII вызывало такой же эффект, как и добавление концентрата фибриногена отдельно.

Как видно на Рисунке 3.9, спонтанный лизис кровяного сгустка в условиях 30 и 60 % гемодилюции отсутствовал.

Таким образом, исследования показали, что гемодилюция, не осложненная гиперфибринолизом, не приводит к изменению времени свертывания, но вызывает снижение скорости формирования и максимальной плотности кровяного сгустка, причем степень снижения этих показателей соответствует степени гемодилюции. Добавление в разведенную кровь концентрата фибриногена вызывает полную коррекцию и скорости формирования, и максимальной плотности сгустка, тогда как добавление концентрата FXIII или TAFI по отдельности или одновременно не вызывает заметного корригирующего эффекта. Использование концентрата фибриногена одновременно с концентратом FXIII не приводит к дополнительному увеличению скорости формирования и максимальной плотности сгустка.

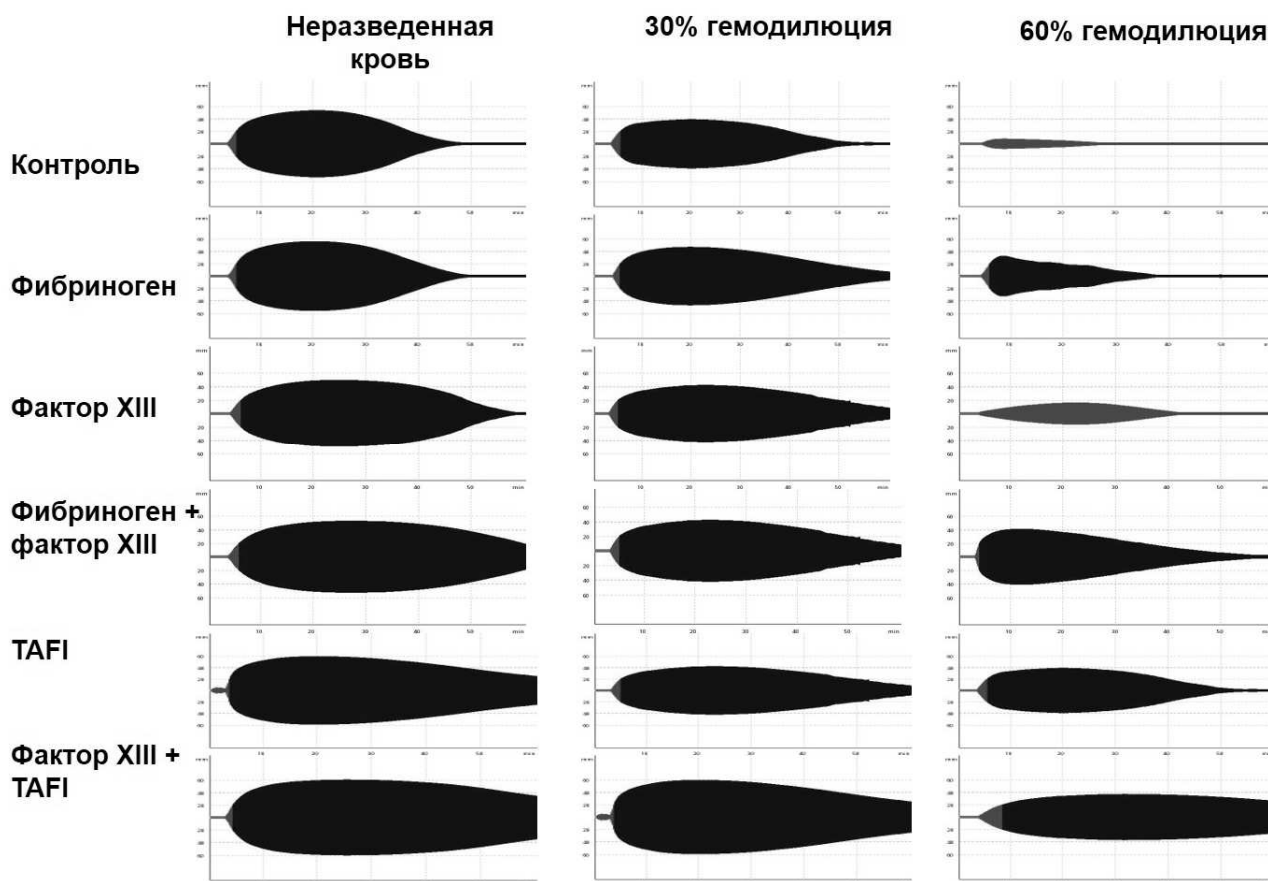
Нарушения гемостатического потенциала крови и возможности его коррекции при гемодилюции, осложненной гиперфибринолизом

Далее мы изучили гемостатический потенциал крови в условиях гемодилюции, осложненной гиперфибринолизом, который индуцировали добавлением в кровь 90 МЕ/мл tPA. Поскольку скрининговые тесты для оценки коагуляционного звена системы гемостаза и тест генерации тромбина не отличаются чувствительностью к повышению фибринолитической активности плазмы, в данной серии экспериментов они не использовались, и внимание было уделено формированию кровяного сгустка методом ROTEM (тест EXTEM). Формирование сгустка оценивали по времени свертывания (СТ, с), углу альфа (αA , °) и максимальной плотности сгустка (MCF, мм), а лизис сгустка — по времени начала лизиса (LOT, мин) и индексу лизиса на 30-й минуте (LI30, %). Репрезентативные тэмограммы, отражающие формирование и лизис кровяного сгустка в условиях гемодилюции и гиперфибринолиза, представлены на Рисунке 3.11.

СТ. В предыдущей серии экспериментов было установлено, что в цельной крови в отсутствие гиперфибринолиза СТ составляет 216 ± 31 с. При индукции фибринолиза этот показатель не претерпевал существенных изменений. Разведение крови на 30 и 60 % в условиях гиперфибринолиза, а также добавление в кровь концентратов фибриногена, FXIII и TAFI как по отдельности, так и в комбинациях не оказывало значимого влияния на продолжительность СТ (Рисунок 3.12, А).

αA . В неразведенной крови в отсутствие гиперфибринолиза αA составлял $68,8 \pm 3,6^\circ$ и при индукции гиперфибринолиза существенно не изменялся. Добавление в кровь концентратов фибриногена, FXIII и TAFI как по отдельности, так и в комбинациях также не вызывало значимого изменения αA (Рисунок 3.12, Б).

При индукции гиперфибринолиза в крови, разведенной на 30 %, αA снижался до $59,5 \pm 8,2^\circ$ ($P = 0,033$, сравнение с цельной кровью в отсутствие гиперфибринолиза). Добавление концентрата фибриногена увеличивало αA до $70,6 \pm 2,9^\circ$ ($P = 0,002$), так что значение данного показателя не отличалось от его значения в цельной крови в отсутствие гиперфибринолиза. Эффект от одновременного добавления концентратов фибриногена и FXIII не отличался от такового при добавлении

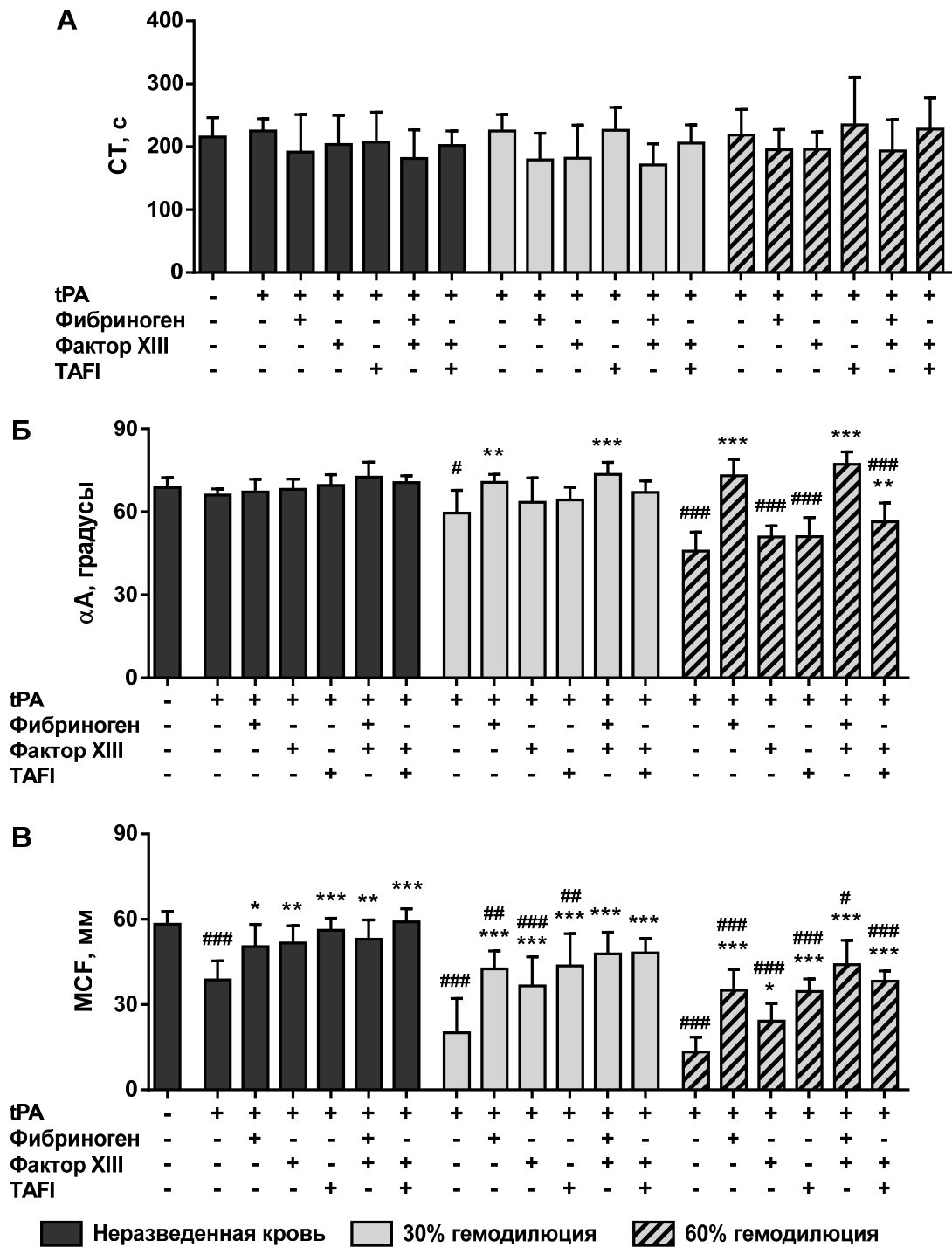


Цитратную кровь развели добавлением Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4). В кровь добавляли концентрат фибриногена (3 г/л), FXIII (2 МЕ/мл) и/или TAFI (2 ЕД/мл). В контрольные образцы вместо указанных препаратов добавляли такой же объем PBS (pH 7,4). Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA. Формирование и лизис кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Представлены репрезентативные тэмограммы одного из восьми независимых экспериментов.

Рисунок 3.11 — Влияние концентрата фибриногена, FXIII и TAFI на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях гемодилюции и гиперфибринолиза

фибриногена отдельно. Добавление концентрата FXIII и TAFI как по отдельности, так и одновременно не оказывало в этих условиях статистически значимого влияния на величину αA .

Разведение крови на 60 % и индукция гиперфибринолиза приводили к дальнейшему снижению αA , который составил $45,8 \pm 6,9^\circ$ ($P < 0,001$, сравнение с 30 % гемодилюцией и гиперфибринолизом). Добавление фибриногена в этих условиях вызывало полную коррекцию αA , которая выражалась в увеличении данного показателя до $73,0 \pm 6,0^\circ$ ($P < 0,001$), что не отличалось от значения в неразведенной крови в отсутствие гиперфибринолиза ($P = 0,980$). Добавление концентрата



Цитратную кровь разводили добавлением Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4). В кровь добавляли концентрат фибриногена (3 г/л), FXIII (2 МЕ/мл) и/или TAFI (2 ЕД/мл). В контрольные образцы добавляли PBS (pH 7,4). Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA. Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали время свертывания (А), угол альфа (Б) и максимальную плотность сгустка (В). 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 цельной кровью, не содержащей tPA.

Рисунок 3.12 — Влияние концентрата фибриногена, концентрата FXIII и TAFI на показатели формирования кровяного сгустка при гемодилюции и гиперфибринолизе

FXIII или TAFI не оказывало значимого влияния на величину αA . Одновременное добавление концентратов фибриногена и FXIII вызывало такой же эффект, как и добавление концентрата фибриногена отдельно. При одновременном добавлении концентрата FXIII и TAFI αA возрастал до $56,4 \pm 6,8^\circ$ ($P = 0,001$), оставаясь при этом существенно ниже по сравнению с цельной кровью ($P < 0,001$), т. е. имела место частичная коррекция данного показателя, что указывает на определенный синергетический эффект комбинации этих препаратов.

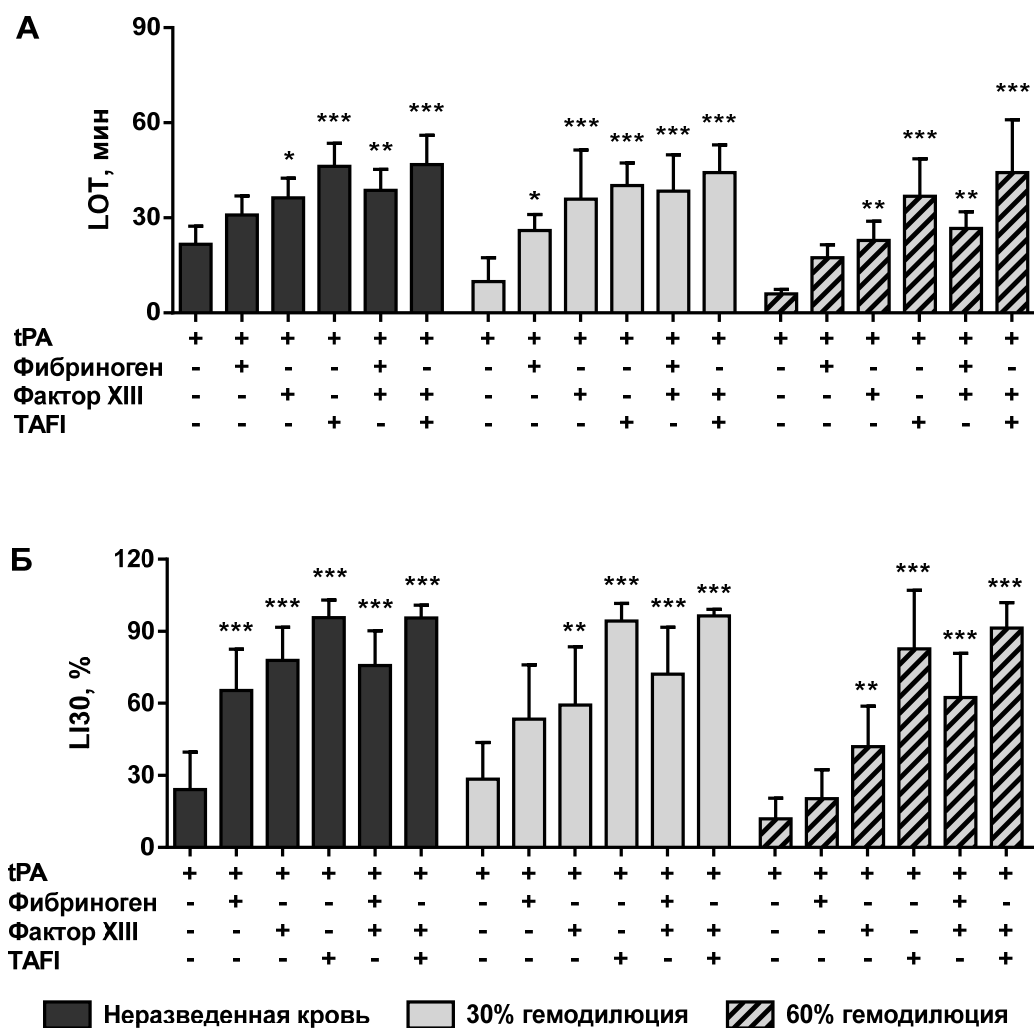
МСF. В неразведенной крови в отсутствие гиперфибринолиза МСF составила $58,3 \pm 4,5$ мм. В условиях гиперфибринолиза наблюдалось снижение данного показателя до $38,7 \pm 6,7$ мм ($P < 0,001$). При добавлении в кровь концентрата фибриногена, концентрата FXIII или TAFI значение МСF увеличивалось до $50,4 \pm 7,8$ мм ($P = 0,043$), $51,6 \pm 6,2$ мм ($P = 0,003$) и $56,2 \pm 4,2$ мм ($P < 0,001$) соответственно, что не отличалось от значения данного показателя в цельной крови в отсутствие гиперфибринолиза ($P = 0,777$, $P = 0,890$ и $P > 0,999$ соответственно). Эффект от добавления в кровь концентрата FXIII одновременно с концентратом фибриногена или TAFI не отличался от такого при добавлении каждого из этих гемостатиков по отдельности (Рисунок 3.12, В).

При индукции гиперфибринолиза в крови, разведенной на 30 %, наблюдалось дальнейшее снижение МСF, которая составила $20,1 \pm 12,0$ мм ($P < 0,001$, сравнение с гиперфибринолизом в неразведенной крови). В этих условиях добавление концентрата фибриногена, концентрата FXIII или TAFI вызывало статистически значимое увеличение МСF, которая составила $42,6 \pm 6,2$ мм, $36,5 \pm 10,3$ мм и $43,6 \pm 11,4$ мм соответственно ($P < 0,001$ для каждого сравнения), при этом все указанные значения МСF оставались ниже, чем в неразведенной крови при отсутствии гиперфибринолиза ($P = 0,003$, $P < 0,001$ и $P = 0,003$ соответственно), что свидетельствует о частичной коррекции показателя. Статистически значимых различий между значениями МСF при добавлении указанных препаратов выявлено не было. При добавлении концентрата FXIII одновременно с концентратом фибриногена или TAFI наблюдалась дополнительная коррекция МСF, которая выражалась в увеличении этого показателя до $47,9 \pm 7,6$ мм и $48,2 \pm 5,1$ мм соот-

ветственно, что не отличалось от его значений в контрольной цельной крови в отсутствие гиперфибринолиза ($P = 0,287$ и $P = 0,218$ соответственно). Следовательно, при использовании в комбинации эти препараты вызывали синергетический корректирующий эффект.

При индукции гиперфибринолиза в крови, разведенной на 60 %, MCF составила $13,4 \pm 5,1$ мм, что, однако, статистически значимо не отличалось от MCF при 30 % гемодилюции и гиперфибринолизе ($P = 0,775$). Добавление в разведенную кровь концентрата фибриногена, концентрата FXIII или TAFI вызывало увеличение данного показателя до $35,0 \pm 7,3$ мм ($P < 0,001$), $24,2 \pm 6,2$ мм ($P < 0,05$) и $34,6 \pm 4,4$ мм ($P < 0,001$) соответственно, хотя все эти значения MCF оставались ниже, чем в неразведенной крови при отсутствии гиперфибринолиза ($P < 0,001$ для каждого сравнения), что свидетельствует о частичной коррекции MCF. При этом статистически значимых различий между значениями MCF при добавлении в кровь указанных препаратов не было. При добавлении в разведенную кровь концентрата FXIII одновременно с концентратом фибриногена или TAFI значения MCF составили $44,0 \pm 8,6$ мм и $38,3 \pm 3,6$ мм соответственно, что статистически значимо не отличалось от значения этого показателя при добавлении концентрата фибриногена или TAFI отдельно ($P = 0,553$ и $P > 0,999$ соответственно) и было статистически значимо меньше по сравнению с контрольной цельной кровью в условиях гиперфибринолиза ($P = 0,013$ и $P < 0,001$ соответственно), т. е. имела место частичная коррекция MCF. Это также указывает на отсутствие синергизма при использовании указанных препаратов в этих условиях.

LOT. При индукции гиперфибринолиза в неразведенной крови LOT составило $21,6 \pm 5,7$ мин. При добавлении концентрата фибриногена в этих условиях LOT составил $30,9 \pm 6,0$ мин, однако это увеличение не было статистически значимым ($P = 0,674$). При добавлении в кровь концентрата FXIII или TAFI отмечалось увеличение LOT до $36,3 \pm 6,3$ мин ($P = 0,010$) и $46,2 \pm 7,3$ мин ($P < 0,001$) соответственно, однако сравнение этих эффектов между собой не выявило статистически значимого различия ($P = 0,442$) (Рисунок 3.13, А). Эффект от одновременного добавления в кровь концентратов фибриногена и FXIII не



Цитратную кровь разводили добавлением Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4). В кровь добавляли концентрат фибриногена (3 мг/мл), FXIII (2 МЕ/мл) и/или TAFI (2 ЕД/мл). В контрольные образцы добавляли PBS (pH 7,4). Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA. Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали время начала лизиса (А) и индекс лизиса на 30-й минуте (Б). 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 3.13 — Влияние концентрата фибриногена, концентрата FXIII и TAFI на показатели лизиса кровяного сгустка при гемодилюции и гиперфибринолизе

отличался от такового при добавлении каждого из них по отдельности ($P = 0,965$ и $P > 0,999$ соответственно). Одновременное добавление концентрата FXIII и TAFI вызывало такой же эффект, как и добавление каждого из них по отдельности ($P = 0,343$ и $P > 0,999$ соответственно).

Индукция фибринолиза в условиях 30 % гемодилюции приводила к уменьшению LOT до $9,9 \pm 7,5$ мин, однако это изменение не достигало уровня

статистической значимости по сравнению с цельной кровью ($P = 0,122$). Добавление в разведенную кровь концентратов фибриногена, FXIII или TAFI вызывало увеличение 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. Сравнение этих эффектов между собой показало, что эффект добавления фибриногена статистически значимо не отличался от такового при добавлении концентрата FXIII ($P = 0,619$), но при сравнении эффекта добавления фибриногена с эффектом добавления TAFI различия были близки к уровню статистической значимости ($P = 0,068$). При одновременном добавлении в кровь концентратов фибриногена и FXIII продолжительность LOT возрастала до $38,4 \pm 11,4$ мин, что существенно не отличалось от значений данного показателя при добавлении в кровь этих препаратов по отдельности ($P = 0,327$ и $P > 0,999$ соответственно). При одновременном добавлении в кровь концентрата FXIII и TAFI продолжительность LOT составила $44,3 \pm 8,7$ мин, что тоже было близко к значению данного показателя при использовании указанных препаратов по отдельности ($P = 0,734$ и $P > 0,999$ соответственно).

Индукция гиперфибринолиза в условиях 60 % гемодилюции приводила к еще более выраженному уменьшению LOT, которое составило $6,0 \pm 1,5$ мин ($P = 0,004$, сравнение с цельной кровью). При добавлении концентрата фибриногена в этих условиях LOT увеличивалось до $17,4 \pm 4,1$ мин, однако это изменение не было статистически значимым ($P = 0,349$). При добавлении в кровь концентрата FXIII или TAFI отмечалось более выраженное увеличение данного показателя — до $22,8 \pm 6,1$ мин ($P = 0,002$) и $36,8 \pm 11,7$ мин ($P < 0,001$) соответственно. Примечательно, что значение LOT при использовании TAFI статистически значимо превышало таковое при использовании концентратов фибриногена ($P < 0,001$) и FXIII ($P = 0,032$). Эффект от одновременного добавления в кровь концентратов фибриногена и FXIII не отличался от такового при добавлении каждого из них по отдельности ($P = 0,819$ и $P > 0,999$ соответственно). При одновременном добавлении концентрата FXIII и TAFI значение LOT составило $44,3 \pm 16,7$ мин, что статистически значимо не отличалось от его значения при добавлении TAFI отдельно ($P = 0,881$).

LI30. Показатель LI30 косвенно указывает на скорость лизиса кровяного сгустка. При индукции гиперфибринолиза в неразведенной крови он составил $24,1 \pm 15,6 \%$. Добавление концентратов фибриногена, FXIII или TAFI увеличивало LI30 до $65,4 \pm 17,2 \%$, $77,9 \pm 13,8 \%$ и $95,6 \pm 7,3 \%$ соответственно ($P < 0,001$ для каждого сравнения). Сравнение этих эффектов между собой показало, что эффект добавления фибриногена статистически значимо не отличался от такового при добавлении FXIII ($P = 0,950$) и был статистически значимо менее выраженным по сравнению с эффектом добавления TAFI ($P = 0,004$). При одновременном добавлении в кровь концентратов фибриногена и FXIII значение LI30 не отличалось от такового при их добавлении по отдельности ($P > 0,999$ для обоих сравнений). При одновременном добавлении концентрата FXIII и TAFI значение LI30 также не отличалось от значения LI30 при использовании этих препаратов по отдельности ($P = 0,386$ и $P > 0,999$ соответственно).

В условиях 30 % гемодилюции LI30 существенно не отличался от его значения в цельной крови и составил $28,4 \pm 15,4 \%$ ($P > 0,999$). При добавлении в разведенную кровь концентрата фибриногена, FXIII или TAFI данный показатель увеличивался до $53,4 \pm 22,6 \%$ ($P = 0,054$), $59,3 \pm 24,2 \%$ ($P < 0,001$) и $94,3 \pm 7,4 \%$ ($P < 0,001$) соответственно. При этом эффект фибриногена статистически значимо не отличался от эффекта FXIII ($P > 0,999$) и был статистически значимо менее выраженным по сравнению с эффектом TAFI ($P < 0,001$). При одновременном добавлении концентратов фибриногена и FXIII значение LI30 не отличалось от такового при добавлении указанных препаратов по отдельности ($P = 0,570$ и $P = 0,938$ соответственно). При добавлении концентрата FXIII одновременно с TAFI значение LI30 не отличалось от его значения при добавлении TAFI отдельно ($P > 0,999$), но превышало таковое при добавлении FXIII отдельно ($P < 0,001$).

При 60 % гемодилюции LI30 составил $11,9 \pm 8,7 \%$, что существенно не отличалось от значения в цельной крови ($P = 0,919$). При добавлении в кровь концентрата фибриногена данный показатель составил $20,3 \pm 12,2 \%$, что статистически значимо не отличалось от его исходного уровня ($P = 0,999$). Добавление концентрата FXIII или TAFI приводило к увеличению LI30 до $42,0 \pm 16,8 \%$ и

$82,6 \pm 24,4 \%$ соответственно ($P < 0,001$ для обоих сравнений), причем различия между указанными значениями были статистически значимыми ($P < 0,001$). При одновременном добавлении в кровь концентратов фибриногена и FXIII LI30 составил $62,4 \pm 18,5 \%$, что статистически значимо не отличалось от значения LI30 при добавлении концентрата FXIII отдельно ($P = 0,283$), но превышало таковое при добавлении концентрата фибриногена отдельно ($P < 0,001$). При одновременном добавлении концентрата FXIII и TAFI значение LI30 не отличалось от его значения при добавлении TAFI отдельно ($P = 0,997$), но превышало значение при добавлении FXIII отдельно ($P < 0,001$).

Таким образом, индукция фибринолиза в цельной крови не отражается на продолжительности времени свертывания и скорости формирования сгустка, но приводит к снижению его максимальной плотности. При этом добавление в кровь концентрата фибриногена вызывает полную коррекцию максимальной плотности сгустка и снижает скорость его лизиса, хотя и не оказывает значимого влияния на время начала лизиса. В отличие от этого концентрат FXIII и TAFI не только вызывают полную коррекцию максимальной плотности сгустка, но и отдалляют время начала его лизиса. Эффект от одновременного добавления в цельную кровь вышеуказанных гемостатиков не превышает больший из эффектов, вызываемых тем или иным препаратом, что свидетельствует об отсутствии синергетического взаимодействия между ними в данных условиях.

Индукция фибринолиза в условиях гемодилюции не оказывает влияния на продолжительность времени свертывания и скорость формирования сгустка, но потенцирует обусловленное гемодилюцией снижение его максимальной плотности и вызывает более раннее, по сравнению с неразведенной кровью, начало лизиса сгустка. Добавление в разведенную кровь концентрата фибриногена обеспечивает полную коррекцию скорости формирования сгустка, частичную коррекцию его максимальной плотности и способствует отдалению времени начала лизиса сгустка. Концентрат FXIII и TAFI в этих же условиях не оказывают значимого влияния на скорость формирования кровяного сгустка, также вызывают частичную коррекцию максимальной плотности сгустка и оказывают более выраженное, по

сравнению с концентратом фибриногена, антифибринолитическое действие. При использовании концентрата FXIII в комбинации с концентратом фибриногена или TAFI в условиях 30 % гемодилюции имеет место дополнительный прирост плотности сгустка, что указывает на синергетическое взаимодействие между этими препаратами, чего, однако, не наблюдается при 60 % гемодилюции.

* * *

Резюмируем результаты исследования нарушений гемостатического потенциала крови и возможностей его коррекции в условиях гемодилюции в зависимости от уровня фибринолитической активности плазмы. Показатели ПВ и АЧТВ увеличиваются только при 60 % гемодилюции и не претерпевают существенных изменений при добавлении в разведенную кровь концентрата фибриногена и/или FXIII. Показатели тромбограммы не изменяются в условиях гемодилюции, за исключением снижения показателя пиковой концентрации тромбина в условиях 60 % гемодилюции, и не претерпевают изменений при добавлении в разведенную кровь концентратов фибриногена, FXIII и/или TAFI. Следовательно, показатели скрининговой коагулограммы и тест генерации тромбина отражают только грубые изменения гемостатического потенциала крови в условиях гемодилюции и не могут служить для оценки эффективности применения указанных гемостатических препаратов.

Значительно большая чувствительность к гемодилюции была обнаружена при исследовании формирования кровяного сгустка. В частности, установлено, что гемодилюция вызывает снижение скорости его формирования и максимальной плотности, причем выраженность этих изменений увеличивается по мере нарастания степени гемодилюции. Активация фибринолиза в условиях гемодилюции потенцирует снижение плотности кровяного сгустка и вызывает его лизис. При исследовании возможности коррекции формирования кровяного сгустка при гемодилюции было установлено:

1. Концентрат фибриногена при отсутствии гиперфибринолиза вызывает полную коррекцию скорости формирования и максимальной плотности сгустка как в условиях 30 %, так и 60 % гемодилюции. При активации фибринолиза в условиях

30 % гемодилюции указанный препарат вызывает полную коррекцию скорости формирования сгустка и частичную коррекцию его максимальной плотности и оказывает небольшой антифибринолитический эффект. При гиперфибринолизе на фоне 60 % гемодилюции концентрат фибриногена также вызывает полную коррекцию скорости формирования сгустка и частичную коррекцию его максимальной плотности, однако не оказывает значимого антифибринолитического действия.

2. Концентрат FXIII при отсутствии гиперфибринолиза не оказывает корректирующего влияния ни на скорость формирования, ни на максимальную плотность сгустка ни при 30 %, ни при 60 % гемодилюции. При активации фибринолиза на фоне 30 и 60 % гемодилюции этот препарат не приводит к улучшению скорости формирования кровяного сгустка, но вызывает частичную коррекцию его максимальной плотности и оказывает более выраженный антифибринолитический эффект (по сравнению с концентратом фибриногена).

3. TAFI при отсутствии гиперфибринолиза, как и концентрат FXIII, не оказывает какого-либо эффекта на формирование и свойства сгустка ни при 30 %, ни при 60 % гемодилюции. При гиперфибринолизе на фоне 30 и 60 % гемодилюции TAFI, как и концентрат FXIII, не приводит к улучшению скорости формирования кровяного сгустка, но вызывает частичную коррекцию его максимальной плотности и оказывает наибольший (по сравнению с концентратами фибриногена и FXIII) антифибринолитический эффект.

4. Одновременное применение концентратов фибриногена и FXIII в условиях гемодилюции при отсутствии гиперфибринолиза вызывает такой же корректирующий эффект, как и применение концентрата фибриногена отдельно вне зависимости от степени гемодилюции. В условиях гемодилюции и гиперфибринолиза одновременное применение этих препаратов вызывает такую же коррекцию скорости формирования сгустка, что и концентрат фибриногена, и оказывает такой же антифибринолитический эффект, что и концентрат FXIII вне зависимости от степени гемодилюции. В условиях 30 % гемодилюции и гиперфибринолиза комбинация указанных препаратов вызывает более выраженную коррекцию максимальной плотности сгустка, чем каждый из них по отдельности, что указывает на их

синергетическое взаимодействие, однако при 60 % гемодилюции такого синергизма уже не отмечается, т. е. степень коррекции плотности сгустка при одновременном использовании концентратов фибриногена и FXIII не отличается от таковой при их использовании по отдельности.

5. Одновременное применение концентрата FXIII и TAFI в условиях гемодилюции при отсутствии гиперфибринолиза не оказывает какого-либо корректирующего эффекта на формирование кровяного сгустка вне зависимости от степени гемодилюции. В условиях гемодилюции и гиперфибринолиза одновременное применение этих препаратов также не влияет на скорость формирования сгустка, но оказывает значительный антифибринолитический эффект, выраженность которого, однако, не отличается от таковой при использовании TAFI отдельно вне зависимости от степени гемодилюции. В условиях 30 % гемодилюции и гиперфибринолиза комбинация указанных препаратов вызывает более выраженную коррекцию максимальной плотности сгустка, чем каждый из них по отдельности, что указывает на их синергетическое взаимодействие, однако при 60 % гемодилюции такого синергизма уже не отмечается, т. е. степень коррекции плотности сгустка при одновременном использовании концентрата FXIII и TAFI не отличается от таковой при их использовании по отдельности.

Таким образом, проведенные исследования показали, что возможность коррекции гемостатического потенциала крови в условиях гемодилюции с помощью концентрата фибриногена, концентрата FXIII и TAFI во многом зависит от уровня фибринолитической активности плазмы. При отсутствии гиперфибринолиза наиболее эффективным препаратом является концентрат фибриногена, применение которого вызывает максимальную коррекцию и скорости формирования, и максимальной плотности кровяного сгустка, тогда как концентрат FXIII и TAFI в этих же условиях не вызывают какого-либо корректирующего эффекта. При сочетании гемодилюции и гиперфибринолиза для одновременного достижения коррекции и скорости формирования, и максимальной плотности, и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка целесообразно использование комбинации концентратов фибриногена и FXIII, а при необходимости достичь наибольшего

антифибринолитического эффекта при той же степени коррекции плотности сгустка необходимо использовать комбинацию концентрата FXIII и TAFI.

3.4. Коррекция гемостатического потенциала крови в условиях гиперфибринолиза в зависимости от вида действующего активатора плазминогена

Ключевую роль в индукции гиперфибринолиза у пациентов с тяжелой травмой играет высвобождение в плазму значительного количества tPA из активированных эндотелиальных клеток [83, 91]. Однако недавно в модели травматического повреждения головного мозга было показано, что спустя три часа после травмы имеет место значительное увеличение экспрессии uPA, который вносит существенный вклад в нарушение гемостатического потенциала крови при этой патологии [166]. Несмотря на то что tPA и uPA выполняют одну и ту же основную каталитическую функцию (превращение плазминогена в плазмин), молекулярная структура и механизм действия этих активаторов существенно отличаются, что может оказывать влияние на эффективность применения гемостатических препаратов в условиях гиперфибринолиза. В связи мы провели сравнительный анализ возможности коррекции формирования и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка с помощью ТКК, концентрата FXIII и концентрата фибриногена в условиях гиперфибринолиза, индуцированного tPA или uPA,

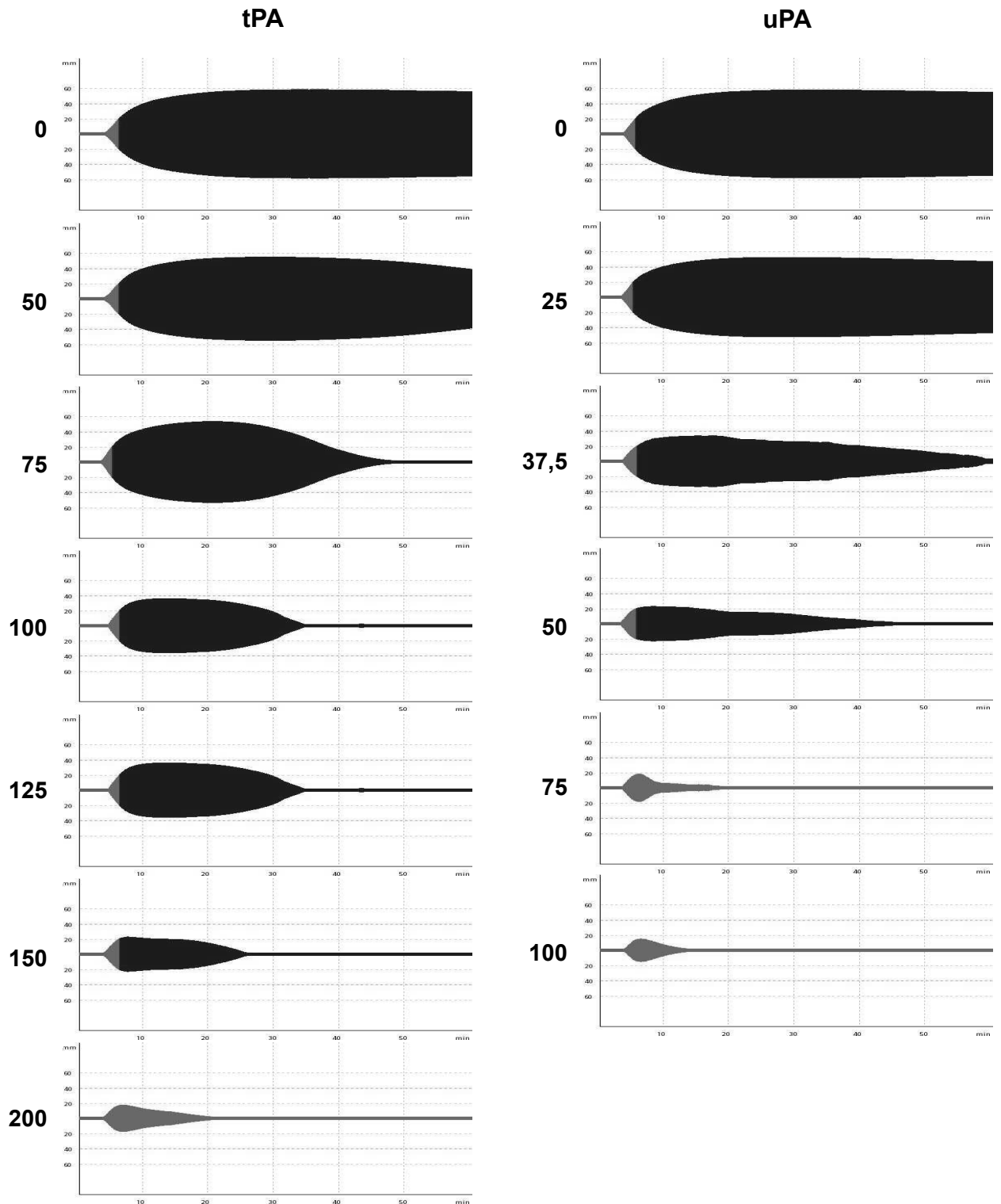
Определение полумаксимальной эффективной концентрации tPA и uPA

Поскольку ферментативная активность tPA и uPA определяется производителями по их амидолитической активности в искусственной среде, фибринолитический эффект одинаковых концентраций (выраженных в международных единицах активности, *МЕ/мл*) этих активаторов в крови, содержащей различные модуляторы их активности, может различаться. В то же время для проведения корректного сравнительного анализа эффектов от применения гемостатических препаратов в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза важно,

чтобы данные активаторы плазминогена были использованы в концентрациях, вызывающих одинаковый фибринолитический эффект. В связи с этим прежде всего мы изучили формирование и лизис кровяного сгустка в зависимости от добавленной концентрации tPA и uPA. Для этого мы использовали метод ROTEM (тест EXTEM), при этом оценивали максимальную плотность сгустка (MCF, мм), площадь под кривой (AUC, мм × 100) и время начала лизиса (LOT, мин). Затем на основе полученных данных для каждого активатора плазминогена определили соответствующую полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50), которую и использовали в дальнейшем при проведении сравнительного анализа эффектов гемостатических препаратов.

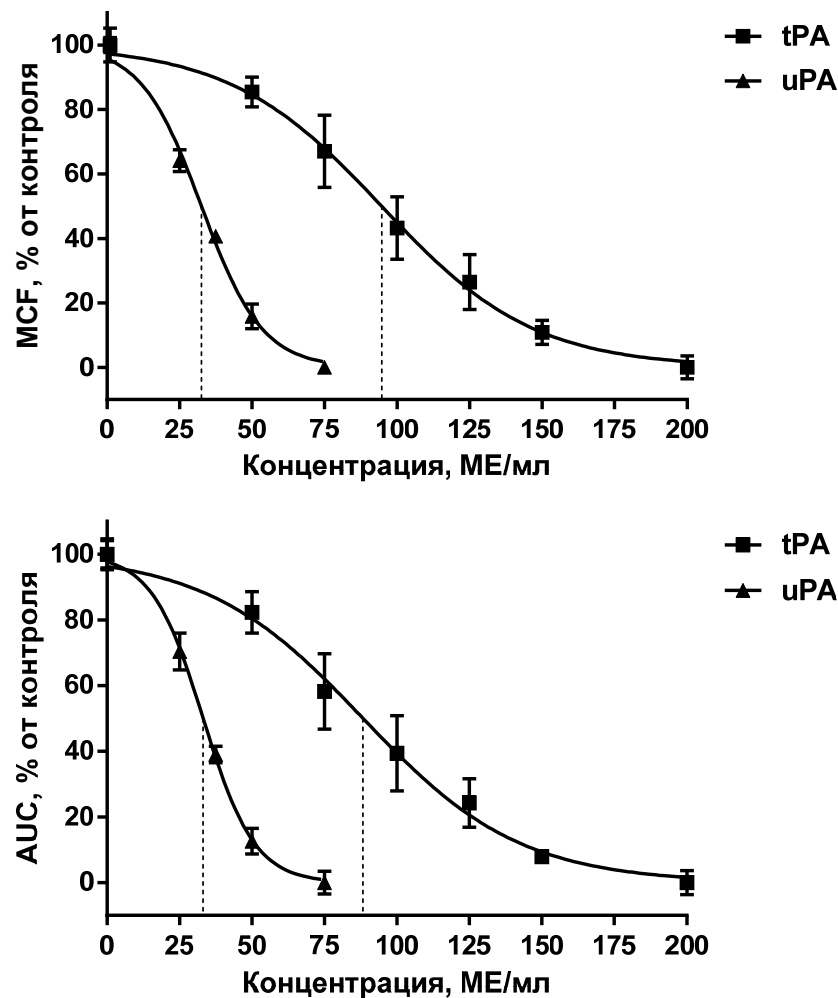
Определение EC50 для tPA. В образцы цитратной крови добавляли tPA в конечных концентрациях 50, 75, 100, 125, 150 или 200 МЕ/мл. Контролем служили образцы, в которые вместо tPA добавляли соответствующий объем PBS (pH 7,4). В контрольных образцах спонтанный лизис сгустка отсутствовал, MCF составляла $60,0 \pm 2,2$ мм, AUC — 6269 ± 461 мм × 100 (Рисунок 3.14). Добавление tPA в вышеуказанных концентрациях вызывало лизис сгустка, время начала которого (LOT) постепенно сокращалось с $37,0 \pm 8,7$ мин до $4,5 \pm 2,1$ мин по мере увеличения дозы tPA. Вместе с тем отмечалось снижение MCF с $53,3 \pm 4,3$ мм до $13,8 \pm 3,3$ мм ($P = 0,021$ и $P < 0,001$ соответственно, сравнения с интактной кровью) и уменьшение AUC с 5404 ± 621 мм × 100 до 1373 ± 353 мм × 100 ($P = 0,032$ и $P < 0,001$, сравнения с интактной кровью). На основе этих данных для показателей MCF и AUC были построены кривые «доза – эффект», по которым были установлены значения EC50 и соответствующие 95 % доверительные интервалы (95ДИ). Для показателя MCF значение EC50 составило 94,7 МЕ/мл (95ДИ 86,3–103,1 МЕ/мл), для показателя AUC — 88,3 МЕ/мл (95ДИ 79,0–97,6 МЕ/мл) (Рисунок 3.15). В связи с этим в последующих экспериментах tPA использовали в конечной концентрации 90 МЕ/мл.

Определение EC50 для uPA. В образцы цитратной крови добавляли uPA в конечных концентрациях 25, 37,5, 50, 75 или 100 МЕ/мл. Контролем служили образцы, в которые вместо uPA добавляли соответствующий объем PBS (pH 7,4).



В цельную кровь добавляли tPA или uPA в концентрациях, указанных на рисунке (МЕ/мл). Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Представлены репрезентативные тэмограммы одного из 10 независимых экспериментов.

Рисунок 3.14 — Формирование и лизис кровяного сгустка в присутствии возрастающих концентраций tPA и uPA



В цельную кровь добавляли tPA или uPA в концентрациях, указанных на рисунке. Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Значения MCF и AUC нормировали так, что значения, зарегистрированные в отсутствие tPA или uPA, были приняты за 100 %, а значения, зарегистрированные в присутствии максимальных добавленных концентраций tPA или uPA, — за 0 %. Нормированные данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 10$). На основе нормированных данных с помощью нелинейной регрессии для каждого показателя построены сигмоидальные кривые «доза – эффект» (с переменным наклоном) и определены полумаксимальные эффективные концентрации tPA и uPA (обозначены пунктирной линией).

Рисунок 3.15 — Зависимость показателей формирования кровяного сгустка от концентрации tPA и uPA

Как и в предыдущей серии экспериментов, в контрольных образцах спонтанный лизис сгустка отсутствовал. При этом MCF составляла $57,8 \pm 4,9$ мм, AUC была равна 5552 ± 387 мм $\times$ 100. Добавление uPA в конечных концентрациях 25–75 ME/мл вызывало лизис сгустка (Рисунок 3.14). LOT при этом постепенно сокращалось с $53,8 \pm 9,7$ мин до $3,6 \pm 0,7$ мин, MCF снижалась с $45,6 \pm 5,0$ мм до $16,0 \pm 1,4$ мм ($P < 0,001$ для обоих сравнений с интактной кровью) и AUC уменьшалась с 4388 ± 584 мм $\times$ 100 до 1441 ± 340 мм $\times$ 100 ($P < 0,001$ для обоих

сравнений с интактной кровью). На основе полученных данных для показателей MCF и AUC строили кривые «доза – эффект», по которым были установлены соответствующие значения EC50 и 95ДИ. Для MCF значение EC50 составило 32,6 МЕ/мл (95ДИ 30,4–34,7 МЕ/мл), для AUC — 33,2 МЕ/мл (95ДИ 31,0–35,3 МЕ/мл) (Рисунок 3.15). В связи с этим в последующих сериях экспериментов uPA использовали в конечной концентрации 33 МЕ/мл.

Сравнительный анализ возможности коррекции формирования кровяного сгустка с помощью ТКК, концентрата FXIII и концентрата фибриногена в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза

Гемостатические препараты добавляли в кровь в следующих конечных концентрациях (в пересчете на 1 мл плазмы): ТКК — 10 мкг/мл, концентрат FXIII — 2 МЕ/мл, концентрат фибриногена — 3 мг/мл. Контролем служили образцы, в которые вместо гемостатических препаратов добавляли соответствующий объем PBS (рН 7,4). Фибринолиза индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA или 33 МЕ/мл uPA. Формирование и лизис сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM) и оценивали по показателям максимальной плотности сгустка (MCF, мм), времени начала лизиса (LOT, мин) и индексу лизиса на 30-й минуте (LI30, %).

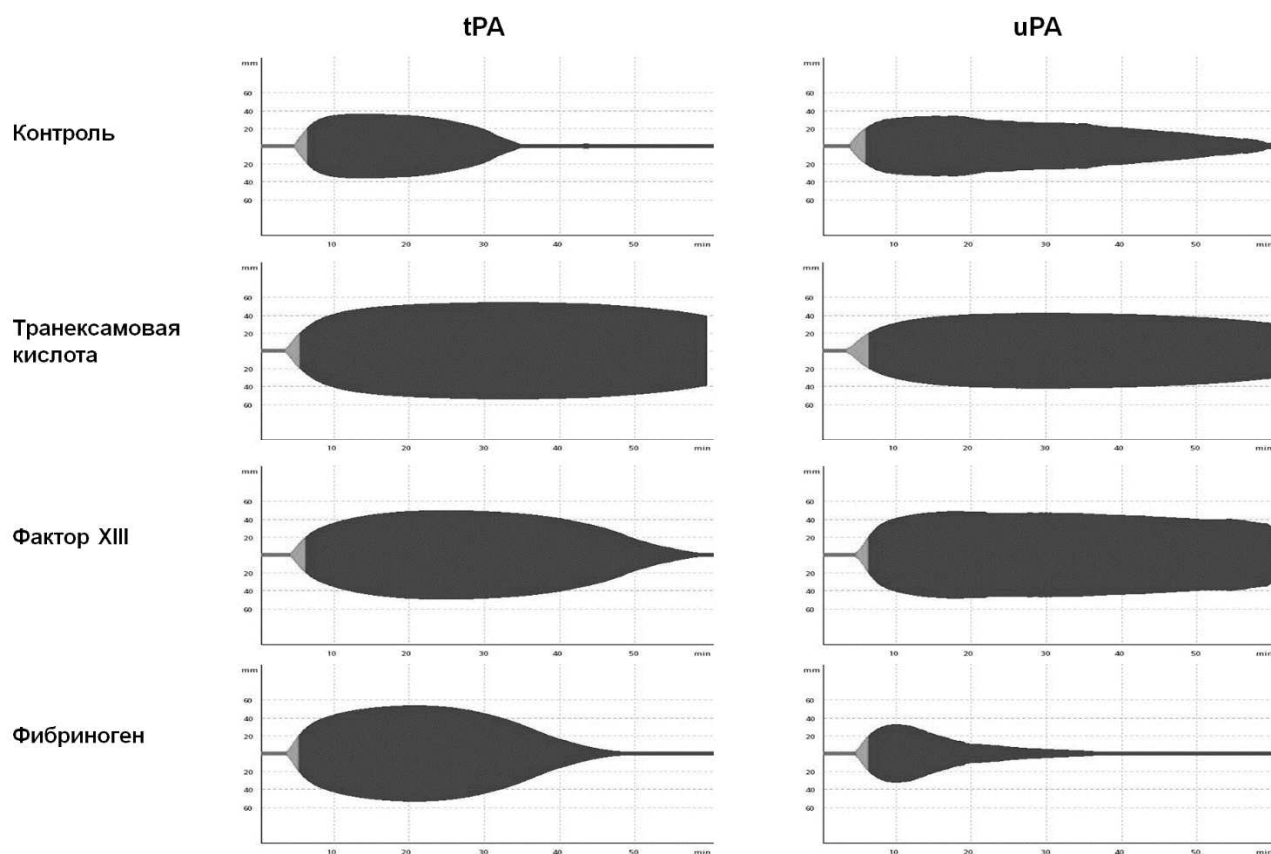
Результаты исследования представлены в Таблице 3.2. В интактной крови MCF составила $60,0 \pm 2,2$ мм, при этом спонтанный лизис кровяного сгустка не наблюдался. Добавление в кровь tPA приводило к снижению MCF до $42,2 \pm 5,9$ мм ($P < 0,001$) и индуцировало лизис сгустка, так что LOT составило $23,7 \pm 4,1$ мин, LI30 был равен $18,8 \pm 13,9$ %. При добавлении в кровь uPA значения MCF и LOT статистически не отличались от таковых в присутствии tPA ($P = 0,528$ и $P = 0,328$ соответственно), однако LI30 был существенно больше, чем в образцах с tPA, и составил $64,1 \pm 8,1$ % ($P < 0,001$). Иными словами, в использованных концентрациях tPA и uPA в одинаковой мере снижали максимальную плотность кровяного сгустка и через схожие промежутки времени индуцировали его лизис (гиперфибринолиз), однако динамика лизиса сгустка имела некоторые различия (Рисунок 3.16).

Таблица 3.2 — Влияние ТКК, FXIII и фибриногена на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза

Показатель	tPA		uPA		tPA vs. uPA
	M ± SD	P*	M ± SD	P*	P
МСF, мм:					
Контроль	42,2 ± 5,9	—	36,5 ± 6,8	—	0,528
ТКК	54,9 ± 6,2	0,002	45,1 ± 5,9	0,084	0,024
FXIII	53,3 ± 6,6	0,042	49,5 ± 5,5	0,002	0,906
Фибриноген	57,2 ± 4,7	0,001	34,1 ± 4,3	0,995	< 0,001
LOT, мин:					
Контроль	23,7 ± 4,1	—	18,5 ± 5,8	—	0,328
ТКК	50,5 ± 7,7	< 0,001	53,1 ± 6,5	< 0,001	0,999
FXIII	39,4 ± 5,2	< 0,001	43,5 ± 6,2	< 0,001	0,803
Фибриноген	29,4 ± 4,5	0,096	11,0 ± 2,5	0,017	< 0,001
LI30, %:					
Контроль	18,8 ± 13,9	—	64,1 ± 8,1	—	< 0,001
ТКК	100 ± 0	< 0,001	97,2 ± 3,7	< 0,001	0,287
FXIII	92,4 ± 5,7	< 0,001	96,3 ± 5,3	< 0,001	0,813
Фибриноген	65,2 ± 9,4	< 0,001	8,0 ± 5,5	< 0,001	< 0,001

Примечание: Объем каждой выборки – 10 наблюдений. Сравнения средних выполнены с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения *P* откорректированы по методу Шидака. *Значения *P* при сравнении с соответствующим контролем.

ТКК. В условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза добавление в кровь ТКК вызывало увеличение МСF до 54,9 ± 6,2 мм ($P = 0,002$), LOT до 50,5 ± 7,7 мин ($P < 0,001$) и LI30 до 100 % во всех исследованных образцах (Рисунок 3.16). В условиях uPA-индуцированного гиперфибринолиза добавление ТКК увеличивало МСF до 45,1 ± 5,9 мм (что было близко к уровню статистической значимости при сравнении с контролем, $P = 0,084$). LOT при этом увеличивалось до 53,1 ± 6,5 мин ($P < 0,001$), LI30 — до 97,2 ± 3,7% ($P < 0,001$), что существенно не отличалось от значений этих показателей в присутствии tPA. Следовательно, добавление в кровь ТКК способствовало увеличению плотности и фибринолитической устойчивости сгустка вне зависимости от вида активатора плазминогена.



В цельную кровь добавляли 10 мкг/мл ТКК, 2 МЕ/мл концентрата FXIII или 3 мг/мл концентрата фибриногена (Наемосomplettan P). В контрольные образцы добавляли соответствующее количество фосфатного буфера (pH 7,4). 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.

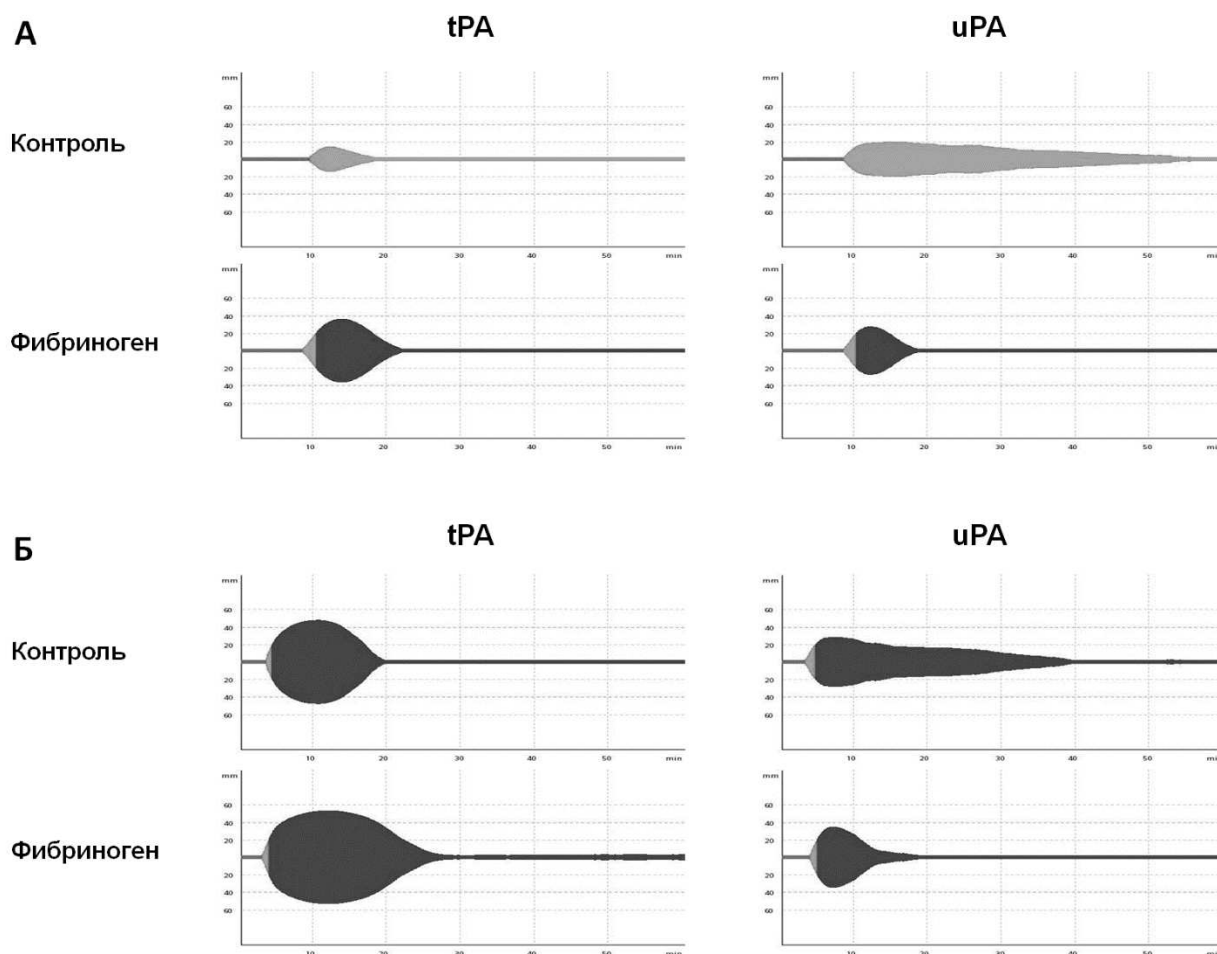
Рисунок 3.16 — Влияние ТКК, концентрата FXIII и концентрата фибриногена на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза

Концентрат FXIII. Добавление в кровь концентрата FXIII в условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза вызывало увеличение MCF до $53,3 \pm 6,6$ мм ($P = 0,042$), LOT — до $39,4 \pm 5,2$ мин ($P < 0,001$) и LI30 — до $92,4 \pm 5,7\%$ ($P < 0,001$) (Рисунок 3.16). Схожий эффект данный препарат вызывал и в присутствии uPA: MCF увеличивалась до $49,5 \pm 5,5$ мм ($P = 0,002$), LOT — до $43,5 \pm 6,2$ мин ($P < 0,001$) и LI30 — до $96,3 \pm 5,3\%$ ($P < 0,001$). Таким образом, в условиях как tPA-, так и uPA-индуцированного гиперфибринолиза добавление в кровь концентрата FXIII способствовало увеличению плотности кровяного сгустка и повышению его устойчивости к лизису.

Концентрат фибриногена. В условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза добавление в кровь концентрата фибриногена приводило к выраженному увеличению MCF до $57,2 \pm 4,7$ мм ($P < 0,001$), LOT — до $29,4 \pm 4,5$ мин (что не достигало статистической значимости при сравнении с контролем, $P = 0,096$) и LI30 — до $65,2 \pm 9,4$ % ($P < 0,001$), что в целом свидетельствовало о повышении плотности и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка. Принципиально иной эффект наблюдался при добавлении в кровь концентрата фибриногена в присутствии uPA, который выражался в отсутствии существенного изменения MCF ($P = 0,344$), сокращении LOT до $11,0 \pm 2,5$ мин ($P = 0,017$) и уменьшении LI30 до $8,0 \pm 5,5$ % ($P < 0,001$) (Рисунок 3.16). Иными словами, в присутствии uPA добавление концентрата фибриногена вызывало противоположный, профибринолитический эффект.

С целью верификации эффектов концентрата фибриногена в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза мы повторили эксперимент с добавлением в кровь того же концентрата фибриногена, однако вместо теста EXTEM использовали тесты NATEM и INTEM, отличающиеся по способу активации свертывания крови. При проведении теста NATEM было установлено, что добавление в кровь концентрата фибриногена в присутствии tPA приводило к увеличению MCF с $17,4 \pm 4,8$ мм до $37,4 \pm 5,2$ мм ($P < 0,001$) и удлинению LOT с $5,3 \pm 4,2$ мин до $10,3 \pm 3,8$ мин ($P = 0,012$), тогда как в присутствии uPA концентрат фибриногена не оказывал статистически значимого влияния на величину MCF, но значительно укорачивал LOT — с $15,2 \pm 9,1$ мин до $6,4 \pm 6,6$ мин ($P = 0,024$), т. е. оказывал выраженное профибринолитическое действие (Рисунок 3.17, А). Такая же закономерность в действии концентрата фибриногена была отмечена и при проведении теста INTEM (Рисунок 3.17, Б). Следовательно, эффекты концентрата фибриногена, обнаруженные нами в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза, не зависят от способа индукции свертывания крови.

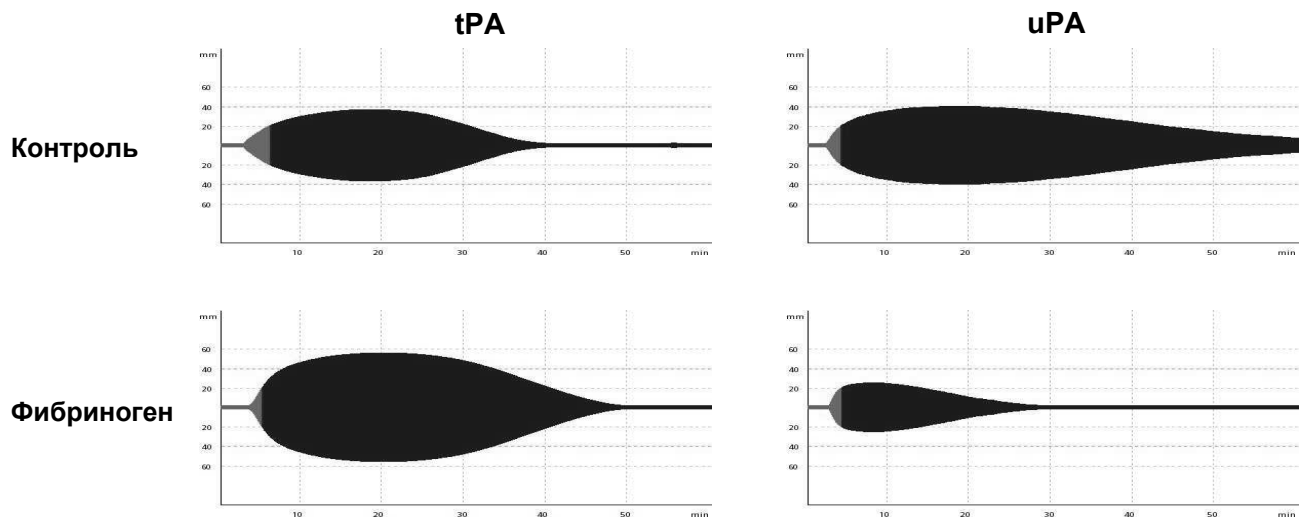
Чтобы убедиться, что вышеописанные эффекты концентрата фибриногена не являются уникальными для конкретного препарата (Наемосомплеттан Р), а являются общей закономерностью, мы изучили влияние приготовленного нами раствора



В цельную кровь добавляли 3 мг/мл фибриногена (Наемосомплеттан Р). В контрольные образцы добавляли соответствующее количество фосфатного буфера (рН 7,4). Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA или 33 МЕ/мл uPA. Формирование и лизис сгустка изучали методом ROTEM: (А) тест NATEM и (Б) тест INTEM. Представлены репрезентативные тэмограммы одного из пяти независимых экспериментов.

Рисунок 3.17 — Влияние концентрата фибриногена (Наемосомплеттан Р) на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза

фибриногена от другого производителя (F4883, Sigma-Aldrich Company Ltd., США) на формирование и лизис кровяного сгустка (тест EXTEM) в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза. При этом было установлено, что добавление в кровь раствора фибриногена в такой же концентрации (3 мг/мл) в условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза приводило к увеличению MCF с $39,5 \pm 5,8$ мм до $58,8 \pm 6,8$ мм ($P < 0,001$) и незначительному удлинению LOT — с $22,4 \pm 5,6$ мин до $26,7 \pm 7,8$ мин ($P = 0,174$) (Рисунок 3.18). В отличие от этого в условиях uPA-индуцированного гиперфибринолиза добавление в кровь раствора фибриногена

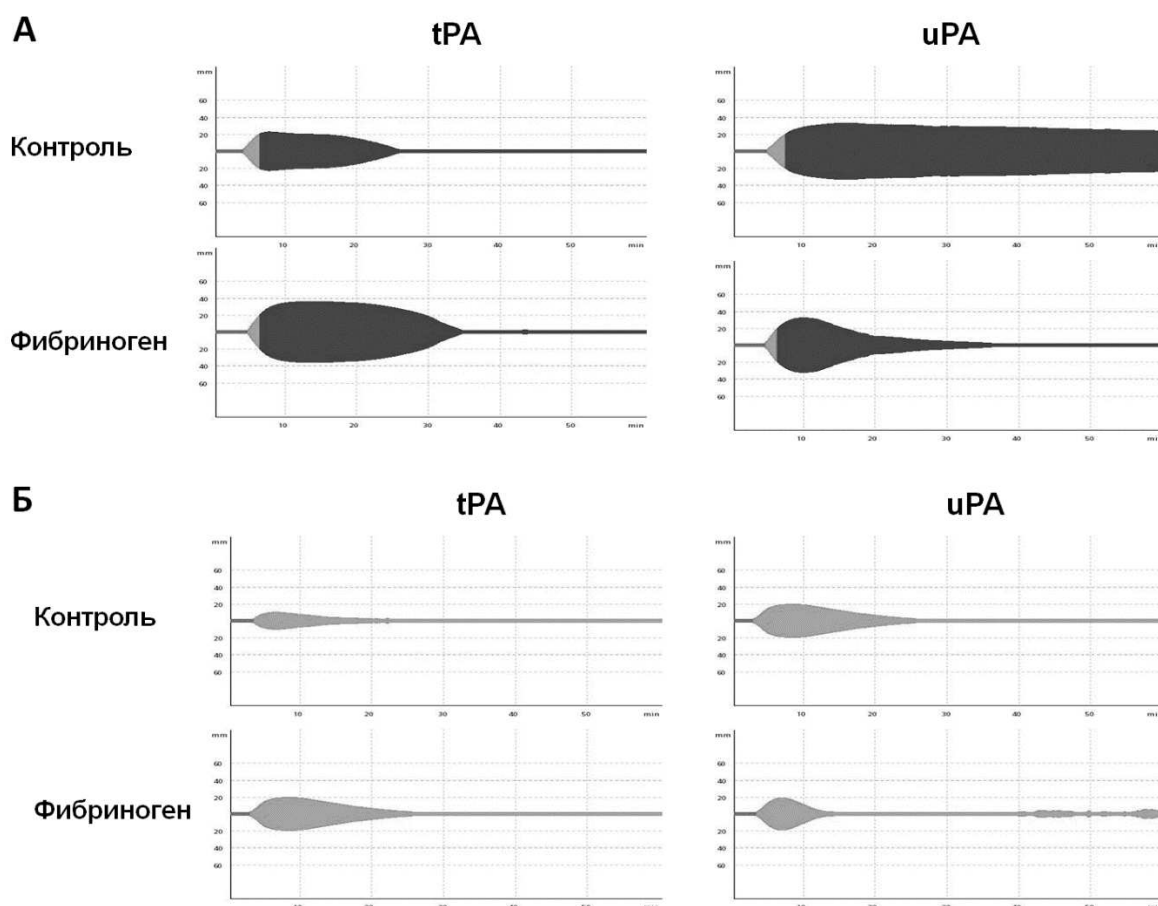


В цельную кровь добавляли 3 мг/мл фибриногена (F4883, Sigma-Aldrich). В контрольные образцы добавляли соответствующее количество фосфатного буфера (pH 7,4). Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA или 33 МЕ/мл uPA. Формирование и лизис сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Представлены репрезентативные тэмограммы одного из пяти независимых экспериментов.

Рисунок 3.18 — Влияние концентрата фибриногена (F4883, Sigma-Aldrich) на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза

приводило к снижению MCF с $38,6 \pm 6,9$ мм до $27,5 \pm 5,0$ мм ($P = 0,001$) и укорочению LOT с $25,0 \pm 6,4$ мин до $14,4 \pm 7,3$ мин ($P = 0,003$), т. е. оказывало выраженное профибринолитическое действие. Следовательно, эффекты добавления концентрата фибриногена, обнаруженные в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза, не зависят от технологии его приготовления и не связаны с наличием в использованных растворах определенных вспомогательных веществ или компонентов плазмы.

Для исследования роли форменных элементов крови в реализации обнаруженных эффектов концентрата фибриногена (Наемосомплеттан Р) в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза, мы изучили влияние этого препарата на формирование и лизис сгустка в ОТП и плазме без клеточных микрочастиц. Было установлено, что добавление концентрата фибриногена в ОТП в присутствии tPA приводило к увеличению MCF с $24,2 \pm 3,5$ мм до $38,4 \pm 6,3$ мм ($P < 0,001$) и удлинению LOT с $7,6 \pm 6,7$ мин до $20,3 \pm 7,4$ мин ($P < 0,001$) (Рисунок 3.19, А), тогда как в присутствии uPA концентрат фибриногена не оказывал заметного



В обогащенную тромбоцитами плазму (А) или плазму без клеточных микрочастиц (Б) добавляли 3 мг/мл концентрата фибриногена (Наемосompletтан Р). В контрольные образцы добавляли соответствующее количество фосфатного буфера (рН 7,4). 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 пяти независимых экспериментов.

Рисунок 3.19 — Влияние концентрата фибриногена на формирование и лизис сгустка плазмы в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза

влияния на величину MCF, но значительно укорачивал LOT — с $30,5 \pm 9,8$ мин до $8,5 \pm 4,5$ мин ($P < 0,001$), т. е. оказывал выраженное профибринолитическое действие. Аналогичные результаты были получены и при добавлении концентрата фибриногена в плазму без клеточных микрочастиц (Рисунок 3.19, Б). Следовательно, профибринолитический эффект концентрата фибриногена в условиях uPA-индуцированного гиперфибринолиза реализуется без участия форменных элементов крови.

Таким образом, исследование формирования и лизиса кровяного сгустка в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза, а также влияния на этот

процесс ТКК, концентрата FXIII и концентрата фибриногена показало, что в условиях гиперфибринолиза эффект от применения гемостатических препаратов существенно зависит от вида действующего активатора плазминогена. В случае tPA-индуцированного гиперфибринолиза и ТКК, и концентрат FXIII, и концентрат фибриногена способствуют увеличению плотности кровяного сгустка и оказывают отчетливый антифибринолитический эффект. В случае uPA-индуцированного гиперфибринолиза ТКК и концентрат FXIII также вызывают антифибринолитический эффект, а концентрат фибриногена — противоположный, профибринолитический эффект. Разнонаправленный эффект концентрата фибриногена не зависит от способа активации свертывания крови и технологии его приготовления.

Глава 4

Нарушения гемостатического потенциала крови и его коррекция при тромбоцитопении

4.1. Способ оценки функций тромбоцитов в условиях тромбоцитопении

Оценка адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов в условиях тромбоцитопении является сложной задачей, поскольку содержание тромбоцитов в исследуемом образце оказывает прямое влияние на показатели основных методов исследования тромбоцитарного звена системы гемостаза. В связи с этим бывает трудно ответить на вопрос, связано ли отклонение того или иного показателя функциональной активности тромбоцитов у пациента с тромбоцитопенией только лишь со снижением их содержания в образце или же определенное влияние на это оказала возможная сопутствующая дисфункция тромбоцитов. Мы полагаем, что ответить на этот вопрос можно, если установить критерии оценки функциональной активности тромбоцитов в зависимости от их содержания в исследуемом образце. Решению этой задачи и посвящен настоящий раздел нашей работы.

Используя кровь здоровых добровольцев, мы разработали оригинальную модель изолированной тромбоцитопении *in vitro* (см. раздел 2.3.2). Путем смешивания эритроцитарной массы, ОТП и бестромбоцитарной плазмы в определенном объемном соотношении мы создали образцы восстановленной крови с содержанием тромбоцитов 5×10^9 , 10×10^9 , 20×10^9 , 40×10^9 , 80×10^9 и 160×10^9 л⁻¹. Затем для этих образцов определили значения показателей адгезии и агрегации тромбоцитов, а также показателей формирования кровяного сгустка (с целью оценки контрактильной функции тромбоцитов) и на основе полученных данных методом нелинейного регрессионного анализа для каждого изученного показателя построили кривую наилучшего приближения, отражающую зависимость этого

¹ Создать восстановленную кровь с нулевым содержанием тромбоцитов не представлялось возможным вследствие методических ограничений (эритроцитарная масса всегда содержит небольшое количество тромбоцитов).

показателя от содержания тромбоцитов в крови. При этом для каждой кривой мы установили границы 95 % предсказательного интервала, в котором будут находиться 95 % значений исследуемых показателей, характерных для функционально полноценных тромбоцитов при их определенном содержании в исследуемом образце.

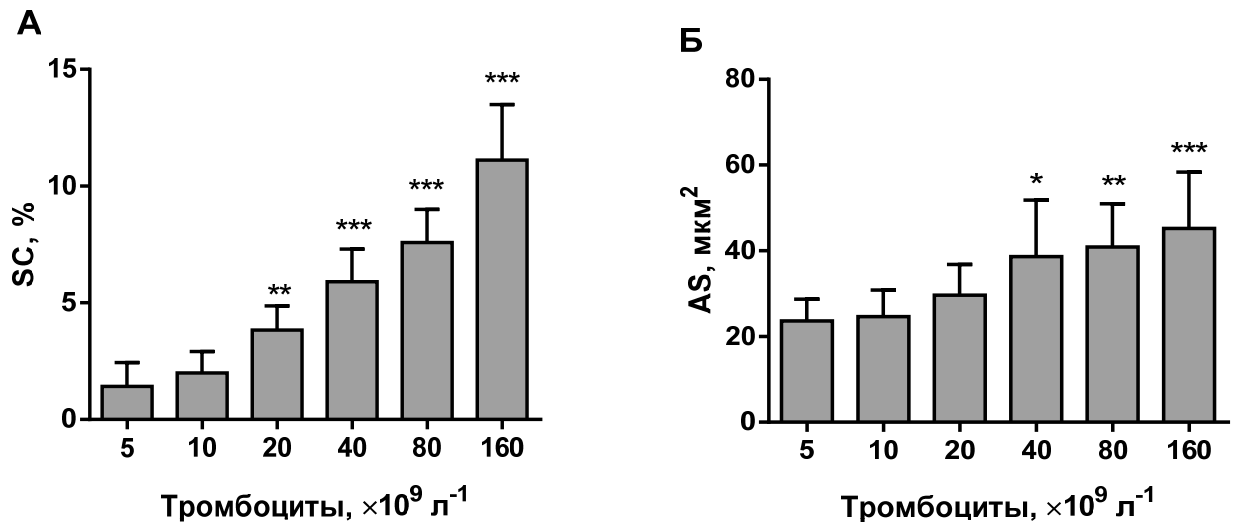
***Нахождение 95 % предсказательного интервала
для показателей адгезии и агрегации тромбоцитов***

Адгезию и агрегацию тромбоцитов исследовали при скорости сдвига $1\,800\text{ с}^{-1}$ с помощью анализатора Impact-R и оценивали по показателям площади покрытия ячейки адгезированными частицами (SC, %) и среднему размеру частиц (AS, мкм^2).

В образцах крови с содержанием тромбоцитов $5 \times 10^9\text{ л}^{-1}$ SC составила $1,4 \pm 1,0\%$. Увеличение содержания тромбоцитов до $10 \times 10^9\text{ л}^{-1}$ не приводило к существенному изменению данного показателя, а увеличение в интервале от 20×10^9 до $160 \times 10^9\text{ л}^{-1}$ сопровождалось его постепенным увеличением с $3,8 \pm 1,0\%$ до $11,1 \pm 2,4\%$ соответственно (Рисунок 4.1, А).

В восстановленной крови с содержанием тромбоцитов $5 \times 10^9\text{ л}^{-1}$ AS составил $23,7 \pm 5,1\text{ мкм}^2$. Увеличение содержания тромбоцитов до 10×10^9 и $20 \times 10^9\text{ л}^{-1}$ не вызывало существенного изменения данного показателя. Дальнейшее увеличение содержания тромбоцитов в интервале от 40×10^9 до $160 \times 10^9\text{ л}^{-1}$ приводило к статистически значимому увеличению AS с $38,6 \pm 13,2\text{ мкм}^2$ до $45,3 \pm 13,1\text{ мкм}^2$ соответственно (Рисунок 4.1, Б).

На основе полученных данных для каждого показателя методом нелинейного регрессионного анализа были построены кривые наилучшего приближения и 95 % предсказательные интервалы (Рисунок 4.2). Из рисунка видно, что при изменении содержания тромбоцитов в крови SC изменяется в большей степени, чем AS. Это объясняется тем, что SC является интегральным показателем функциональной активности тромбоцитов: чем меньше содержание тромбоцитов, тем меньше тромбоцитов и их агрегатов адгезирует и тем меньше значение этого показателя.



Образцы восстановленной крови помещали в ячейки для Impact-R и подвергали воздействию скорости сдвига 1800 с^{-1} в течение 2 мин. Анализировали площадь покрытия ячейки адгезированными частицами (А) и средний размер адгезированных частиц (Б). Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 8-10$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного теста Даннетта (сравнение с образцами, содержащими $5 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ тромбоцитов). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Рисунок 4.1 — Площадь покрытия ячейки и средний размер адгезированных частиц в модели тромбоцитопении

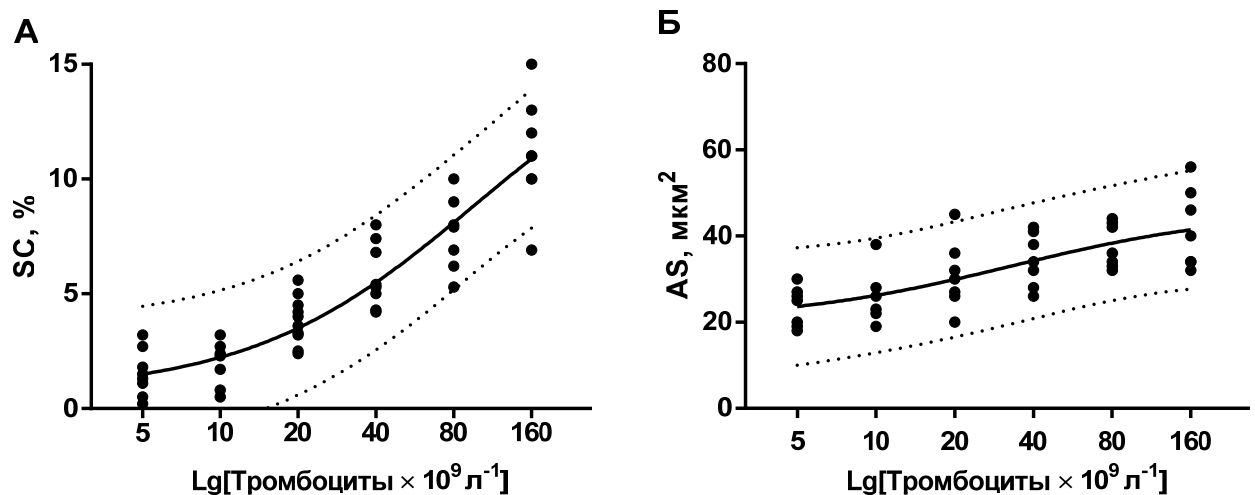


Рисунок 4.2 — Кривые наилучшего приближения и 95 % предсказательный интервал для показателей адгезии и агрегации тромбоцитов в модели тромбоцитопении

В отличие от этого AS оказался показателем более устойчивым к изменению содержания тромбоцитов в крови. Это свидетельствует о том, что агрегационная функция тромбоцитов меньше зависит от их содержания в исследуемом образце.

**Нахождение 95 % предсказательного интервала
для показателей формирования кровяного сгустка**

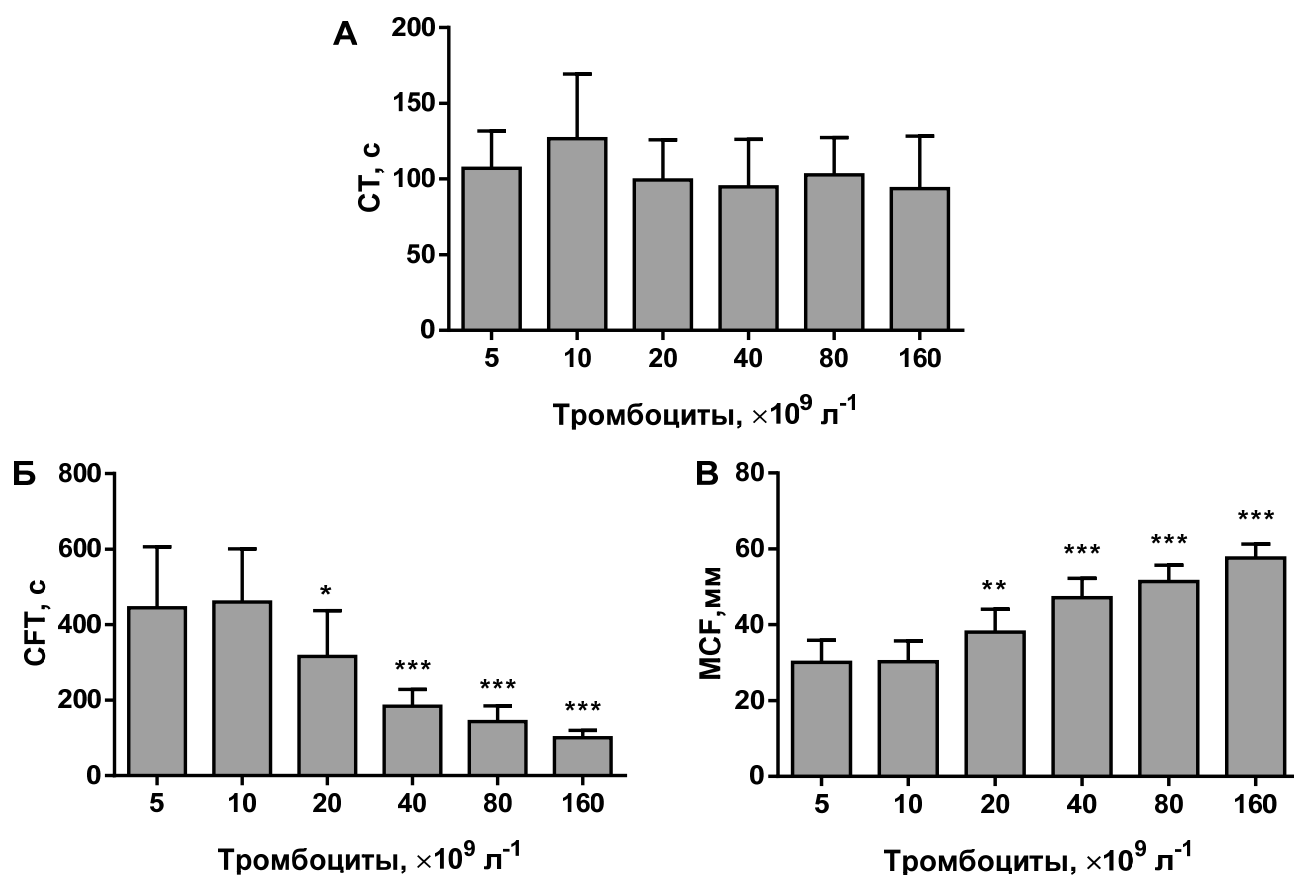
Для построения кривых наилучшего приближения и 95 % предсказательных интервалов для показателей формирования кровяного сгустка образцы восстановленной крови с содержанием тромбоцитов 5×10^9 , 10×10^9 , 20×10^9 , 40×10^9 , 80×10^9 и $160 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). Формирование сгустка оценивали по времени свертывания (СТ, с), времени формирования сгустка (CFT, с) и максимальной плотности сгустка (MCF, мм).

СТ. Исследования показали, что в образцах восстановленной крови с содержанием тромбоцитов $5 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ СТ составило 107 ± 25 с. Увеличение содержания тромбоцитов в интервале от 10×10^9 до $160 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ не вызвало существенных изменений данного показателя (Рисунок 4.3, А).

CFT. В образцах крови с содержанием тромбоцитов $5 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ CFT составило 445 ± 162 с. Увеличение содержания тромбоцитов до $10 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ не вызвало существенных изменений данного показателя. Увеличение содержания тромбоцитов в интервале от 20×10^9 до $160 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ сопровождалось прогрессирующим укорочением CFT с 316 ± 121 с до 101 ± 20 с соответственно (Рисунок 4.3, Б).

MCF. В образцах крови с содержанием тромбоцитов $5 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ MCF составила $30,1 \pm 5,7$ мм. Увеличение содержания тромбоцитов до $10 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ не вызвало существенных изменений данного показателя. Дальнейшее увеличение содержания тромбоцитов в интервале от 20×10^9 до $160 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ сопровождалось прогрессирующим увеличением MCF с $38,1 \pm 6,0$ мм до $57,6 \pm 3,7$ мм соответственно (Рисунок 4.3, В). Полученные результаты свидетельствуют о том, что минимальное содержание тромбоцитов в крови, необходимое для реализации их контрактильной функции и минимального уплотнения сгустка, составляет более $10 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$.

Поскольку показатель времени свертывания оказался нечувствительным к изменению содержания тромбоцитов в крови, для дальнейшего анализа были выбраны показатели времени формирования сгустка и максимальной плотности сгустка. На основе полученных данных методом нелинейного регрессионного анализа для этих показателей были построены кривые наилучшего приближения и



Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали время свертывания (А), время формирования сгустка (Б) и максимальную плотность сгустка (В). Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 8-10$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного теста Даннетта (сравнение с образцами, содержащими $5 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ тромбоцитов). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Рисунок 4.3 — Показатели формирования кровяного сгустка в модели тромбоцитопении

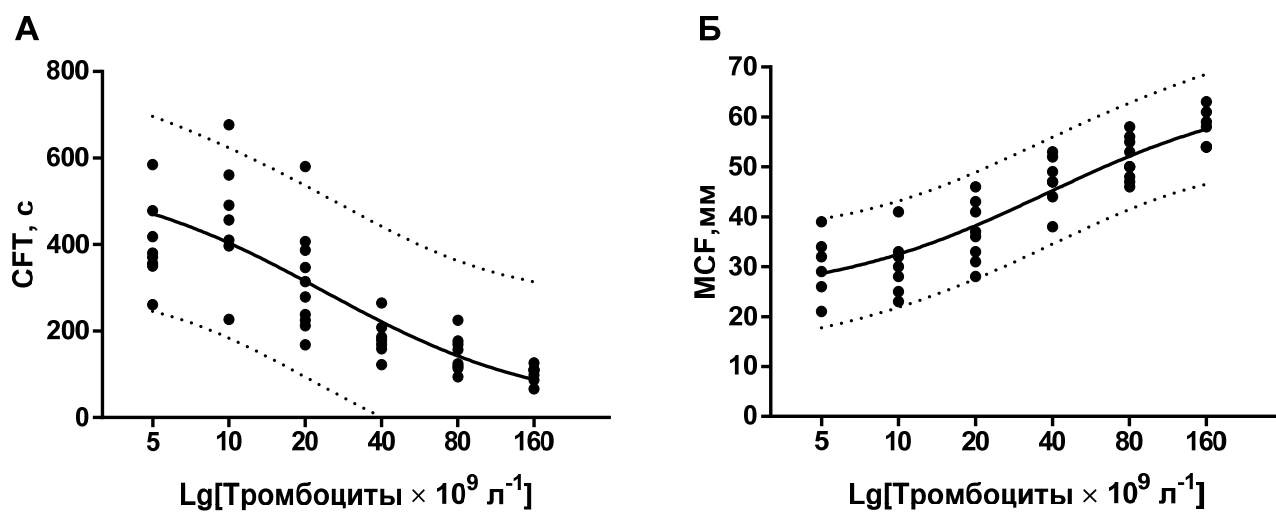


Рисунок 4.4 — Кривые наилучшего приближения и 95% предсказательный интервал для показателей формирования кровяного сгустка в модели тромбоцитопении

95 % предсказательные интервалы (Рисунок 4.4). Из рисунка видно, что и время формирования сгустка, и максимальная плотность сгустка существенно изменяются при изменении содержания тромбоцитов в крови, при этом ширина предсказательного интервала для показателя времени формирования сгустка заметно шире, чем для показателя максимальной плотности сгустка.

Таким образом, исследовав ключевые показатели адгезии и агрегации тромбоцитов, а также показатели формирования кровяного сгустка в модели изолированной тромбоцитопении, созданной с использованием крови здоровых добровольцев, для каждого из этих показателей мы установили предсказательные интервалы, охватывающие 95 % значений, которые могут быть зарегистрированы у пациентов с тромбоцитопенией при условии нормальной функциональной активности тромбоцитов. Следовательно, выпадение значения за границы этого интервала будет означать нарушение функции тромбоцитов с вероятностью ошибки менее 5 %. В следующем разделе нашей работы, используя установленные предсказательные интервалы, мы оценили функции тромбоцитов у пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией.

Оценка функций тромбоцитов у пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией

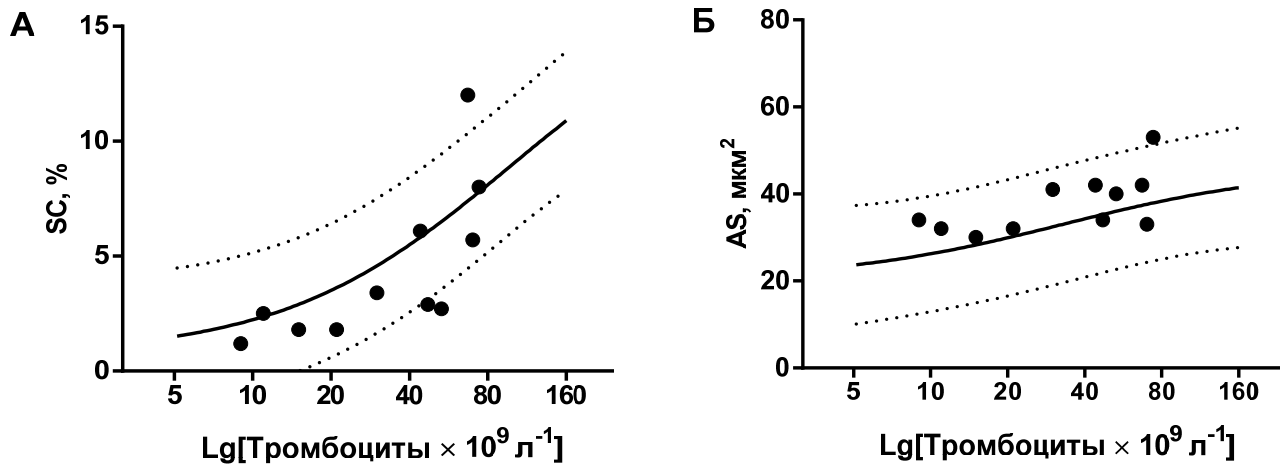
С целью выявления возможной тромбоцитопатии у пациентов с первичной ИТП мы исследовали у них адгезивную и агрегационную функции тромбоцитов, а также участие тромбоцитов в формировании кровяного сгустка. Для этого мы определили значения показателей тестов Impact-R и ROTEM у этих пациентов и соотнесли их значения с ранее установленными 95 % предсказательными интервалами.

Содержанием тромбоцитов у пациентов с первичной ИТП варьировало от 2×10^9 до $74 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$. Результаты оценки адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов у этих пациентов представлены на Рисунке 4.5. В среднем SC у пациентов с ИТП составила $4,0 \pm 3,4 \%$, а AS — $36,5 \pm 7,4 \text{ мкм}^2$. Из рисунка видно, что значения этих показателей снижались по мере нарастания тяжести тромбо-

цитопении. Это подтверждается также наличием сильной положительной корреляционной связи между содержанием тромбоцитов в крови и SC ($r = 0,81$; $P = 0,015$), а также AS ($r = 0,61$; $P = 0,037$). Из рисунка также видно, что у большинства пациентов значения обоих показателей находились в пределах установленного 95 % предсказательного интервала. Только у двух пациентов SC была ниже нижней границы и у одного пациента — выше верхней границы предсказательного интервала (Рисунок 4.5, А). AS был выше верхней границы соответствующего предсказательного интервала только у одного пациента (Рисунок 4.5, Б). В целом полученные результаты свидетельствуют о нормальной адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов у большинства пациентов с первичной ИТП.

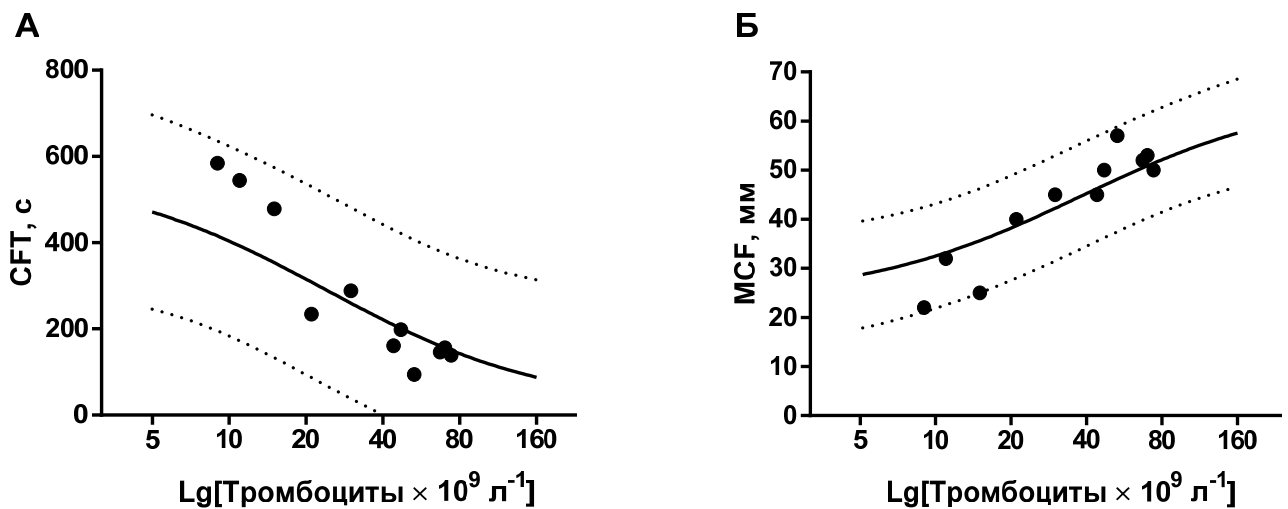
Результаты исследования формирования кровяного сгустка у пациентов с первичной ИТП методом ротационной тромбоэластометрии представлены на Рисунке 4.6. У одного из обследованных пациентов, у которого содержание тромбоцитов составило $2 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, амплитуда тэмограммы не достигла 20 мм, в результате чего CFT для этого пациента не могло быть установлено. У других 11 пациентов CFT в среднем составило $275 \pm 177 \text{ с}$. По мере уменьшения содержания тромбоцитов в крови значения CFT увеличивались (Рисунок 4.6, А), что подтверждается наличием между этими показателями сильной отрицательной корреляционной связи ($r = -0,86$; $P < 0,001$). MCF была зарегистрирована у всех обследованных пациентов, и в среднем она составила $40,8 \pm 13,1 \text{ мм}$. Значения этого показателя уменьшались по мере снижения содержания тромбоцитов в крови (Рисунок 4.6, Б), что подтверждается наличием сильной положительной корреляционной связи между ними ($r = 0,89$; $P < 0,001$). Как видно на Рисунке 4.6, у всех обследованных пациентов значения CFT и MCF находились в пределах 95 % предсказательного интервала.

Таким образом, проведенные исследования показали, что как и в разработанной нами модели изолированной тромбоцитопении *in vitro*, так и у пациентов с первичной ИТП снижение содержания тромбоцитов в крови сопровождается прогрессирующим снижением адгезии и в меньшей степени агрегации тромбо-



Цельную кровь, полученную от 12 пациентов с первичной ИТП, исследовали с помощью анализатора Impact-R при скорости сдвига 1 800 с⁻¹. Анализировали площадь покрытия ячейки (А) и средний размер адгезированных частиц (Б). Результаты каждого измерения обозначены точкой. Кривая наилучшего приближения (сплошная линия) и 95% предсказательный интервал (ограничен пунктирными линиями) построены метом нелинейного регрессионного анализа.

Рисунок 4.5 — Показатели адгезия и агрегация тромбоцитов у пациентов с первичной ИТП



Цельную кровь, полученную от 12 пациентов с ИТП, исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали время формирования сгустка (А) и максимальную плотность сгустка (Б). Результаты каждого измерения обозначены точкой. У одного пациента с содержанием тромбоцитов 2×10^9 л⁻¹ время формирования сгустка зарегистрировано не было. Кривая наилучшего приближения (сплошная линия) и 95% предсказательный интервал (ограничен пунктирными линиями) построены метом нелинейного регрессионного анализа.

Рисунок 4.6 — Показатели формирования кровяного сгустка у пациентов с первичной ИТП

цитов при высокой скорости сдвига, а также прогрессирующим снижением скорости формирования и плотности кровяного сгустка. При этом установлено, что

адгезивная и агрегационная функции тромбоцитов как таковых, а также их участие в процессе формирования кровяного сгустка у большинства обследованных пациентов с хронической первичной ИТП не нарушены. Следовательно, снижение гемостатического потенциала крови при данной патологии является именно результатом снижения содержания тромбоцитов в крови при сохранении нормальной функциональной активности отдельно взятых тромбоцитов.

4.2. Коррекция гемостатического потенциала крови в зависимости от тяжести тромбоцитопении

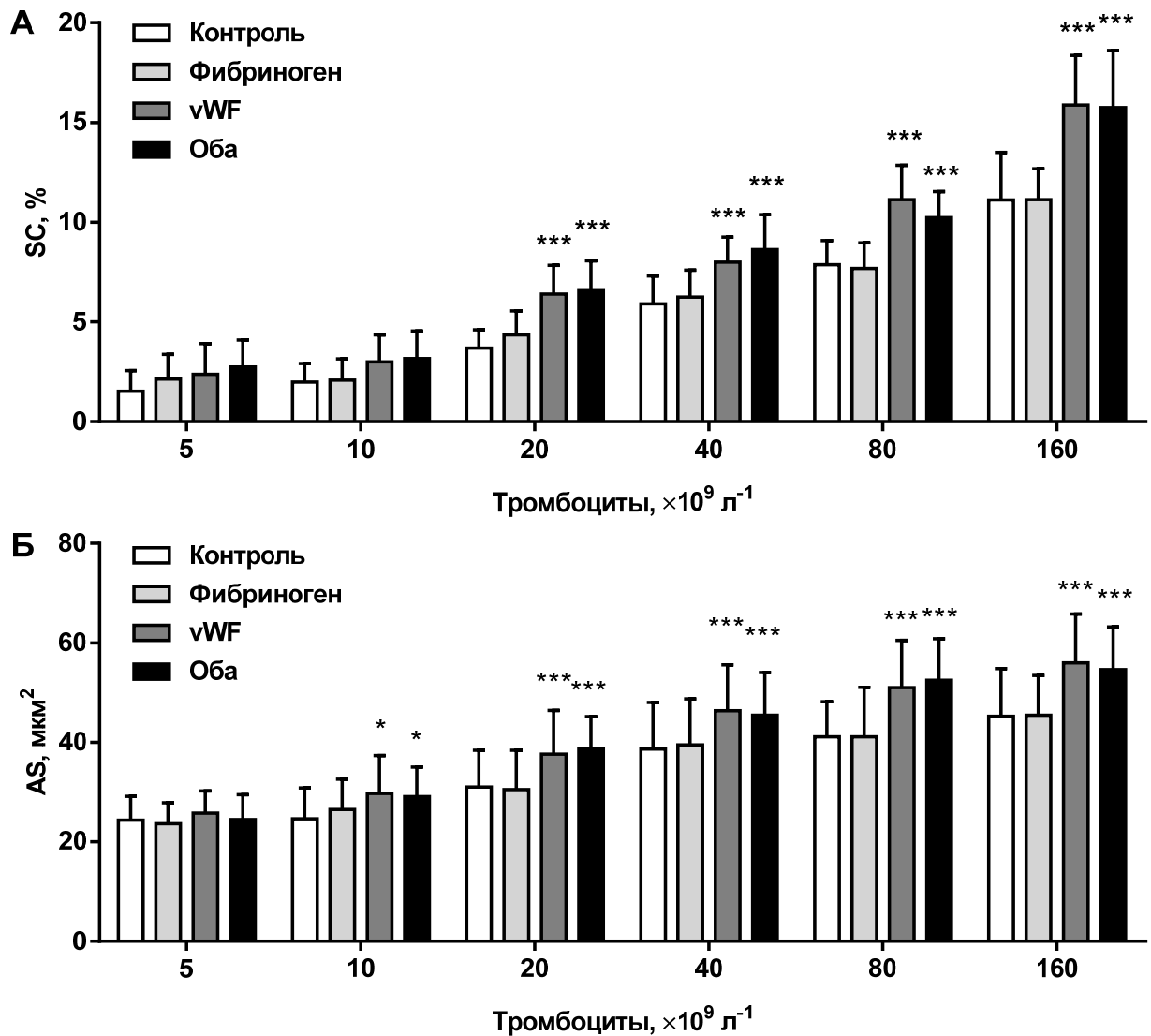
Настоящий раздел посвящен исследованию возможностей коррекции гемостатического потенциала крови в условиях тромбоцитопении различной тяжести. Для этого мы изучили влияние концентратов фибриногена и VWF на адгезию и агрегацию тромбоцитов, а также на формирование кровяного сгустка в зависимости от содержания тромбоцитов в модели изолированной тромбоцитопении *in vitro*. При этом содержание тромбоцитов в крови составило 5×10^9 , 10×10^9 , 20×10^9 , 40×10^9 , 80×10^9 и 160×10^9 л⁻¹. Гемостатические препараты добавляли в восстановленную кровь так, чтобы их конечная концентрация в пересчете на 1 мл плазмы составила: 3 мг/мл концентрата фибриногена, 2 МЕ/мл концентрата VWF.

Адгезию и агрегацию тромбоцитов изучали при скорости сдвига 1 800 с⁻¹ с помощью анализатора Impact-R и оценивали по площади покрытия ячейки адгезированными частицами (SC, %) и среднему размеру адгезированных частиц (AS, мкм²). Для оценки влияния указанных препаратов на исследованные показатели использовали двухфакторный дисперсионный анализ (см. раздел 2.7 «Статистический анализ»). При этом было обнаружено статистически значимое взаимодействие между содержанием тромбоцитов в крови и добавлением в кровь гемостатических препаратов ($P < 0,001$ для обоих показателей). Это означает, что эффект гемостатических препаратов зависел от содержания тромбоцитов в крови. Дальнейший анализ показал, что при содержании тромбоцитов 5×10^9 и 10×10^9 л⁻¹ концентрат VWF не оказывал статистически значимого эффекта на SC, но приводил к увеличению этого показателя при содержании тромбоцитов в

интервале от 20×10^9 до $160 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ ($P < 0,001$ для всех сравнений с контролем при указанном содержании тромбоцитов). Концентрат фибриногена не оказывал влияния на SC при использовании отдельно и не модифицировал эффект концентрата VWF при их добавлении в кровь одновременно (Рисунок 4.7, А). Было также установлено, что при содержании тромбоцитов $5 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ концентрат VWF не вызывал заметного изменения AS, но увеличивал его при содержании тромбоцитов $10 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ ($P = 0,016$) и более ($P < 0,001$ для всех более высоких содержаний тромбоцитов в крови). Концентрат фибриногена не оказывал влияния на данный показатель и не модифицировал эффект концентрата VWF при их одновременном использовании (Рисунок 4.7, Б).

Для оценки возможностей коррекции формирования кровяного сгустка с помощью концентратов фибриногена и VWF в зависимости от тяжести тромбоцитопении аналогичные образцы восстановленной крови, содержащие указанные препараты, исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). При этом оценивали время формирования сгустка (CFT, с) и максимальную плотность сгустка (MCF, мм). Проведенное исследование показало наличие статистически значимого взаимодействия ($P < 0,001$) между содержанием тромбоцитов и добавлением в кровь гемостатических препаратов для показателя CFT. Это указывает на то, что влияние использованных гемостатиков на данный показатель зависит от тяжести тромбоцитопении. Дальнейший анализ показал, что добавление в кровь концентрата фибриногена при содержании тромбоцитов в интервале $5\text{--}40 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ вызывало заметное сокращение CFT. Примечательно, что выраженность этого эффекта постепенно уменьшалась по мере увеличения содержания тромбоцитов в крови в пределах указанного интервала, а при содержании тромбоцитов 80×10^9 и $160 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ добавление фибриногена не оказывало статистически значимого влияния на CFT. Концентрат VWF не оказывал влияния на этот показатель при его использовании отдельно и не модифицировал эффект концентрата фибриногена при их добавлении в кровь одновременно (Рисунок 4.8, А).

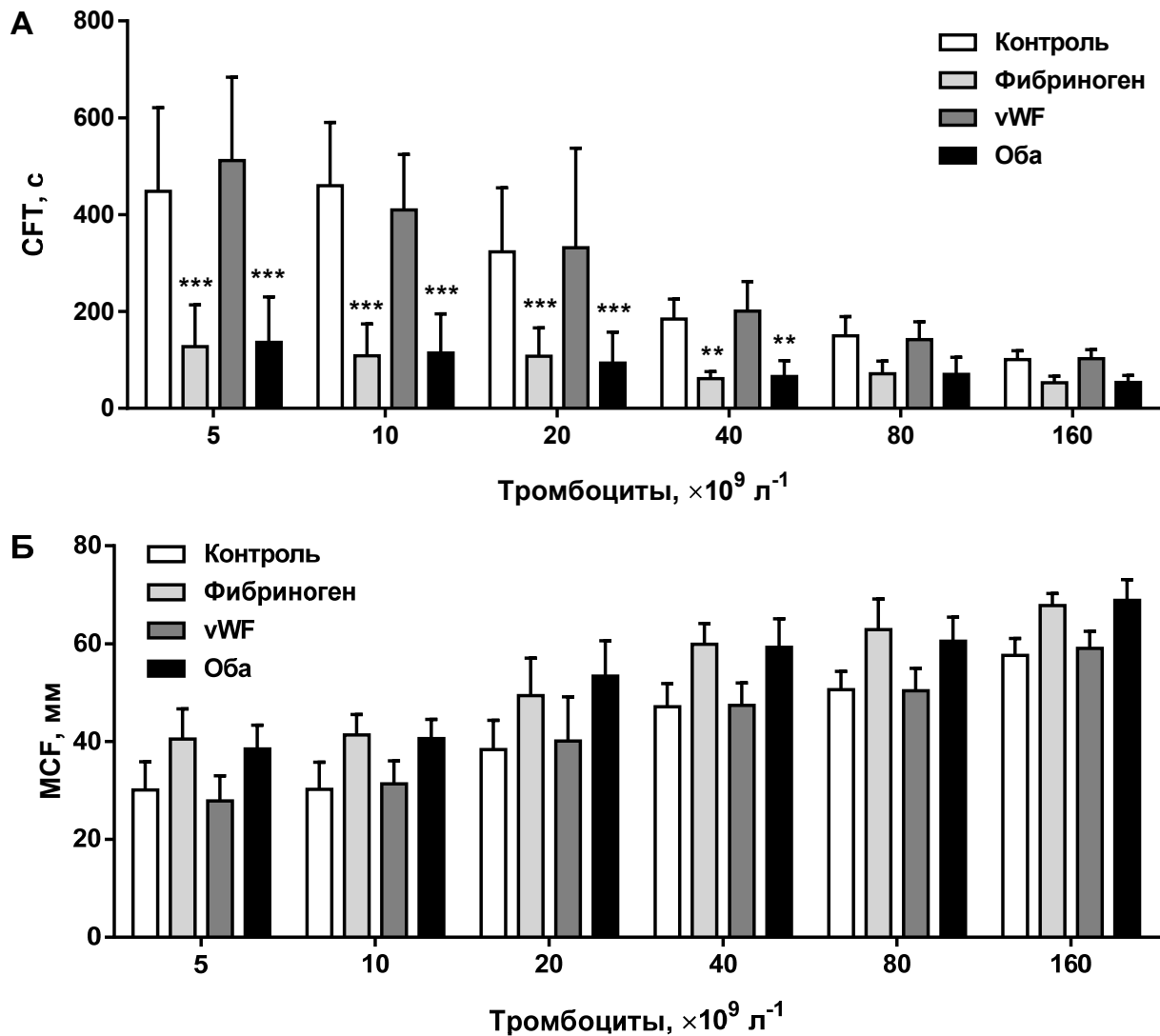
При исследовании MCF эффект взаимодействия не был статистически значимым ($P = 0,118$). Это свидетельствует о том, что влияние использованных гемо-



В кровь с указанным содержанием тромбоцитов добавляли 3 мг/мл фибриногена и/или 2 МЕ/мл VWF. Далее кровь подвергали воздействию скорости сдвига 1800 с^{-1} в течение 2 мин. Анализировали площадь покрытия ячейки (А) и средний размер адгезированных частиц (Б). Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 10$). Сравнения средних проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями, в котором вид гемостатического препарата и содержание тромбоцитов рассматривали как внутригрупповые факторы. Обнаружен статистически значимый эффект взаимодействия указанных факторов для каждого из исследованных показателей ($P < 0,001$). Апостериорные сравнения средних проводили с помощью критерия Шидака. $*P < 0,05$, $***P < 0,001$, сравнение с соответствующим контролем.

Рисунок 4.7 — Влияние концентратов фибриногена и VWF на адгезию и агрегацию тромбоцитов в модели тромбоцитопении

статических препаратов на данный показатель не зависело от содержания тромбоцитов в восстановленной крови. Анализ главных эффектов показал, что добавление концентрата фибриногена вызывало увеличение MCF в среднем на 11,3 мм ($P < 0,001$). Концентрат VWF не оказывал влияния на величину MCF при исполь-



В кровь с указанным содержанием тромбоцитов добавляли 3 мг/мл фибриногена и/или 2 МЕ/мл VWF. Формирование кровяного сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали время формирования сгустка (А) и максимальную плотность сгустка (Б). Результаты представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 10$). Сравнения средних проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями, в котором вид гемостатика и содержание тромбоцитов рассматривали как внутригрупповые факторы. Обнаружен статистически значимый эффект взаимодействия указанных факторов для времени формирования сгустка ($P < 0,001$). Апостериорные сравнения средних для времени формирования сгустка проводили с помощью критерия Шидака. $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, сравнение с соответствующим контролем. Ввиду отсутствия эффекта взаимодействия для максимальной плотности сгустка попарные сравнения средних для каждого содержания тромбоцитов отдельно не проводили, а оценивали только главные эффекты вышеуказанных факторов. Апостериорные сравнения проводили также с помощью критерия Шидака.

Рисунок 4.8 — Влияние концентратов фибриногена и VWF на формирование кровяного сгустка в модели тромбоцитопении

зовании отдельно и не усиливало эффект концентрата фибриногена в случае их одновременного добавления в кровь (Рисунок 4.8, Б).

С целью верификации эффектов концентратов фибриногена и VWF, обнаруженных в модели изолированной тромбоцитопении, мы исследовали эффекты этих препаратов в крови, полученной от пациентов с первичной ИТП. При этом конечная концентрация добавленного фибриногена в пересчет на 1 мл плазмы составила 1 или 3 мг/мл, конечная концентрация добавленного VWF — 2 МЕ/мл. Результаты исследования адгезии и агрегации тромбоцитов с помощью анализатора Impact-R представлены в Таблице 4.1. В контрольных образцах крови пациентов SC составила $4,0 \pm 3,4 \%$, а AS — $36,5 \pm 7,4 \text{ мкм}^2$. Добавление в кровь концентрата VWF увеличивало значения этих показателей на $3,1 \pm 1,7 \%$ ($P < 0,001$) и $13,2 \pm 11,4 \text{ мкм}^2$ ($P = 0,002$) соответственно. Примечательно, что между степенью прироста SC и содержанием тромбоцитов в исследуемом образце отмечалась близкая к уровню статистической значимости умеренная положительная корреляция ($r = 0,54$; $P = 0,071$). В то же время корреляции между степенью прироста AS и содержанием тромбоцитов в крови обнаружено не было ($r = 0,27$; $P = 0,396$). Добавление фибриногена ни в одной из использованных концентраций не оказывало влияния ни на SC, ни на AS. Одновременное добавление в кровь концентратов VWF и фибриногена не вызывало дополнительного прироста исследуемых показателей.

Результаты исследования формирования кровяного сгустка после добавления концентратов фибриногена и VWF в кровь пациентов с первичной ИТП представлены в Таблицах 4.3 и 4.4. В контрольных образцах крови пациентов CFT составило $273 \pm 186 \text{ с}$, MCF — $40,5 \pm 13,7 \text{ мм}$. Добавление в кровь концентрата VWF, а также концентрата фибриногена в дозе 1 мг/мл не оказывало влияния ни на один из этих показателей. После добавления концентрата фибриногена в дозе 3 мг/мл CFT составило $165 \pm 83 \text{ с}$, однако это изменение не достигало уровня статистической значимости при сравнении с контролем ($P = 0,153$). В то же время между содержанием тромбоцитов в крови и степенью сокращения CFT отмечалась сильная отрицательная корреляционная связь ($r = -0,82$; $P = 0,003$). MCF при этом возрастала до $48,3 \pm 13,6 \text{ мм}$, т. е. в среднем на $8,1 \pm 6,0 \text{ мм}$ ($P = 0,003$), однако корреляционная связь между содержанием тромбоцитов в крови и степенью

Таблица 4.1 — Влияние концентратов фибриногена и VWF на площадь покрытия ячейки адгезированными частицами у пациентов с первичной ИТП

Тромбоциты, $\times 10^9 \text{ л}^{-1}$	Площадь покрытия, %					
	Контроль	Фибриноген, н, 1 мг/мл	Фибриноген, н, 3 мг/мл	VWF	Фибриноген, н, 1 мг/мл + VWF	Фибриноген, н, 3 мг/мл + VWF
2	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,3
9	1,2	1,4	0,9	1,9	1,6	1,4
11	2,5	1,8	3,0	4,9	2,2	4,2
15	1,8	1,6	2,4	5,5	6,2	7,4
21	1,8	2,5	3,3	3,7	5,5	5,9
30	3,4	4,7	5,0	9,0	4,9	8,0
44	6,1	6,4	5,4	10,0	10,0	7,2
47	2,9	2,5	3,5	7,4	5,2	5,4
53	2,7	3,4	2,5	7,1	7,6	7,3
67	12,0	10,0	10,0	14,0	10,0	9,0
70	5,7	7,1	5,7	9,0	7,6	7,2
74	8,0	10,0	12,0	13,0	11,0	13,0

Таблица 4.2 — Влияние концентратов фибриногена и VWF на средний размер адгезированных частиц у пациентов с первичной ИТП

Тромбоциты, $\times 10^9 \text{ л}^{-1}$	Средний размер, мкм^2					
	Контроль	Фибриноген, н, 1 мг/мл	Фибриноген, н, 3 мг/мл	VWF	Фибриноген, н, 1 мг/мл + VWF	Фибриноген, н, 3 мг/мл + VWF
2	25	26	26	34	36	35
9	34	38	32	44	42	50
11	32	32	30	45	41	48
15	30	39	42	50	42	42
21	32	30	32	32	33	46
30	41	48	47	71	84	74
44	42	39	30	41	39	42
47	34	26	26	39	30	32
53	40	27	28	39	40	32
67	42	40	48	72	88	84
70	33	46	47	53	64	58
74	53	54	57	76	73	90

Примечание к Таблицам 4.1 и 4.2. В кровь пациентов с первичной ИТП концентрат фибриногена и/или VWF и подвергали воздействию скорости сдвига 1800 с^{-1} . Статистический анализ результатов выполнен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями, апостериорные сравнения средних проводили с помощью критерия Шидака.

Таблица 4.3 — Влияние концентратов фибриногена и VWF на время формирования сгустка (CFT) у пациентов с первичной ИТП

Тромбоциты, $\times 10^9 \text{ л}^{-1}$	CFT, с					
	Контроль	Фибриноген н, 1 мг/мл	Фибриноген н, 3 мг/мл	VWF	Фибриноген н, 1 мг/мл + VWF	Фибриноген н, 3 мг/мл + VWF
2*	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
9	584	618	246	561	906	228
11	544	490	235	584	417	211
15	478	479	339	523	669	346
21	234	220	126	237	223	114
30*	288	242	138	310	н/о	н/о
44	161	208	130	186	222	116
47	198	151	132	158	139	84
53	94	96	77	93	102	82
67	146	115	138	130	123	226
70	156	131	156	148	135	93
74	139	107	74	146	153	70

Таблица 4.4 — Влияние концентратов фибриногена и VWF на максимальную плотность сгустка (MCF) у пациентов с первичной ИТП

Тромбоциты, $\times 10^9 \text{ л}^{-1}$	MCF, мм					
	Контроль	Фибриноген н, 1 мг/мл	Фибриноген н, 3 мг/мл	VWF	Фибриноген н, 1 мг/мл + VWF	Фибриноген н, 3 мг/мл + VWF
2	19	15	24	18	20	29
9	22	29	37	38	24	38
11	32	33	42	29	34	38
15	25	29	32	28	27	34
21	40	41	47	40	39	45
30*	45	44	50	40	н/о	н/о
44	45	43	51	45	42	60
47	50	60	56	53	55	60
53	57	58	59	56	56	58
67	52	60	61	58	60	54
70	53	58	52	53	56	62
74	50	74	70	52	50	75

Примечание к Таблицам 4.3 и 4.4. В кровь пациентов с ИТП добавляли концентрат фибриногена и/или VWF. Формирование сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Статистический анализ результатов выполнен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями, апостериорные сравнения средних проводили с помощью критерия Шидака. *Пациенты, исключенные из статистического анализа.

увеличения MCF не наблюдалось ($r = -0,04$; $P = 0,915$). Добавление концентрата VWF одновременно с концентратом фибриногена в дозе 3 мг/мл не вызывало дополнительного прироста исследованных показателей.

Таким образом, исследования показали принципиальную возможность усиления адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов в условиях изолированной тромбоцитопении с помощью концентрата VWF. Значимый эффект этого препарата обнаруживался при содержании тромбоцитов $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ и более. Добавление же в кровь концентрата фибриногена не оказывало влияния на адгезию и агрегацию тромбоцитов. Напротив, при исследовании формирования кровяного сгустка концентрат фибриногена оказывал выраженный корригирующий эффект, который выражался в сокращении времени формирования сгустка и увеличении максимальной плотности сгустка. Сокращение времени формирования сгустка наблюдалось при содержании тромбоцитов в интервале $5\text{--}40 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, причем по мере увеличения содержания тромбоцитов в пределах этого интервала выраженность указанного эффекта уменьшалась, а при содержании тромбоцитов $80 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ и более — не наблюдалось. В то же время положительное влияние концентрата фибриногена на максимальную плотность сгустка обнаруживалось вне зависимости от содержания тромбоцитов в крови. Возможность коррекции адгезии и агрегации тромбоцитов, а также формирования кровяного сгустка в условиях изолированной тромбоцитопении с помощью концентратов VWF и фибриногена была подтверждена при использовании крови пациентов с хронической первичной ИТП.

4.3. Коррекция гемостатического потенциала крови в условиях тяжелой тромбоцитопении в зависимости от уровня фибринолитической активности плазмы и гемодилюции

Тяжелая тромбоцитопения, характеризующаяся снижением содержания тромбоцитов в крови ниже $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, связана с риском больших спонтанных и хирургических кровотечений. Потеря значительного объема крови приводит к гипоперфузии тканей и, как следствие, к высвобождению tPA из эндотелиальных клеток и развитию гиперфибринолиза. Проведение интенсивной инфузионной

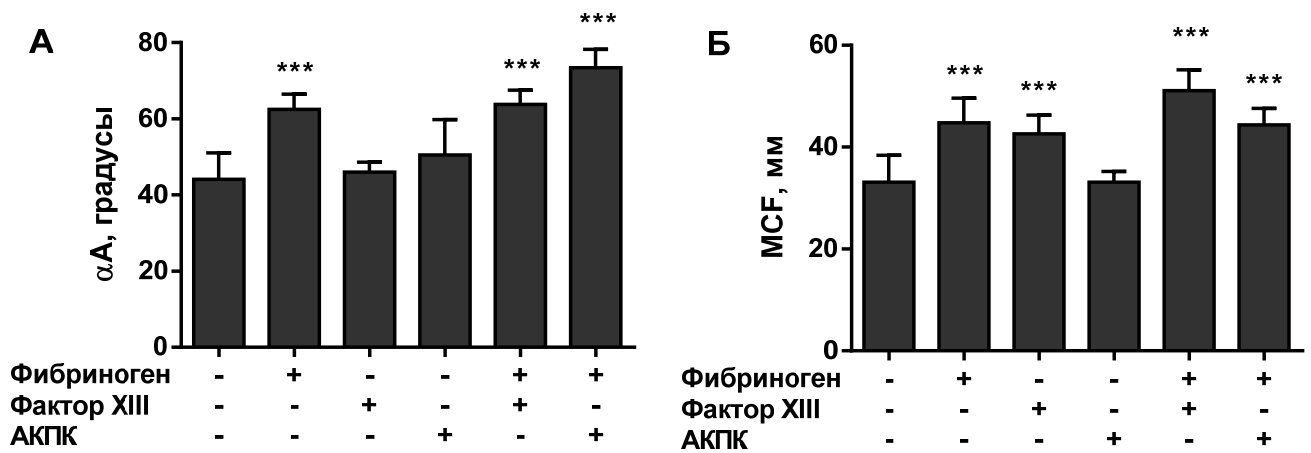
терапии сопряжено с разведением крови, что ведет к дополнительному снижению гемостатического потенциала крови. В связи с этим мы изучили возможности коррекции гемостатического потенциала крови в условиях тяжелой тромбоцитопении в зависимости от наличия гиперфибринолиза и/или гемодилюции.

Для выполнения этой задачи мы использовали модель изолированной тромбоцитопении *in vitro*, содержание тромбоцитов в которой составило $(16 \pm 4) \times 10^9 \text{ л}^{-1}$. Фибринолиз индуцировали добавлением в кровь 150 МЕ/мл tPA. Гемодилюцию создавали добавлением в тромбоцитопеническую кровь 40 % объема Трис-буферизированного 0,9 % раствора хлорида натрия (pH 7,4). Гемостатические препараты добавляли в кровь так, чтобы их конечная концентрация в плазме составила: концентрат фибриногена — 3 мг/мл, концентрат FXIII — 2 МЕ/мл, АКПК — 1 ЕД/мл, TAFI — 0,25 ЕД/мл. Образцы, не содержащие гемостатических препаратов служили контролем. Формирование кровяного сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM) и оценивали по следующим показателям: угол альфа (αA , °), максимальная плотность сгустка (MCF, мм) и время начала лизиса сгустка (LOT, мин).

Коррекция формирования кровяного сгустка при тяжелой тромбоцитопении, не осложненной гиперфибринолизом

αA . В контроле αA составил $44,1 \pm 6,9^\circ$. Добавление концентрата фибриногена и АКПК по отдельности приводило к увеличению этого показателя до $62,5 \pm 4,0^\circ$ ($P < 0,001$) и $52,0 \pm 8,1^\circ$ ($P = 0,048$) соответственно (Рисунок 4.9, А). Одновременное добавление этих препаратов вызывало дополнительное увеличение αA , который составил $73,4 \pm 4,8^\circ$, что существенно превышало его значение при использовании концентрата фибриногена отдельно ($P = 0,002$). Добавление в кровь концентрата FXIII не вызывало заметного изменения αA . Эффект от одновременного добавления в кровь концентратов фибриногена и FXIII не отличался от такового при добавлении концентрата фибриногена отдельно.

MCF. В контроле MCF составила $33,1 \pm 5,3$ мм. Добавление концентратов фибриногена и FXIII по отдельности повышало значение этого показателя до



В восстановленную кровь с содержанием тромбоцитов $(16 \pm 4) \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ добавляли концентрат фибриногена (3 г/л), FXIII (2 МЕ/мл) и/или АКПК (2 ЕД/мл). В контрольные образцы вместо указанных препаратов добавляли такой же объем PBS (рН 7,4). Формирование кровяного сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали угол альфа (А) и максимальную плотность сгустка (Б). Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака. Все образцы, содержащие гемостатик, сравнивали с контролем; образцы, содержащие два гемостатика, сравнивали с образцами, содержащими один гемостатик. Сравнения с контролем отмечены на графике. *** $P < 0,001$.

Рисунок 4.9 — Влияние концентратов фибриногена, FXIII и АКПК на формирование кровяного сгустка в модели тяжелой тромбоцитопении

$44,8 \pm 4,9 \text{ мм}$ ($P < 0,001$) и $42,6 \pm 3,7 \text{ мм}$ ($P < 0,001$) соответственно (Рисунок 4.9, Б), а их одновременное применение вызывало увеличение MCF до $51,1 \pm 4,1 \text{ мм}$, что было статистически значимо больше, чем при их использовании по отдельности ($P = 0,024$ и $P < 0,001$ соответственно). Добавление АКПК не оказывало существенно влияния на MCF, а эффект от одновременного добавления АКПК и концентрата фибриногена не отличался от такового при добавлении концентрата фибриногена отдельно.

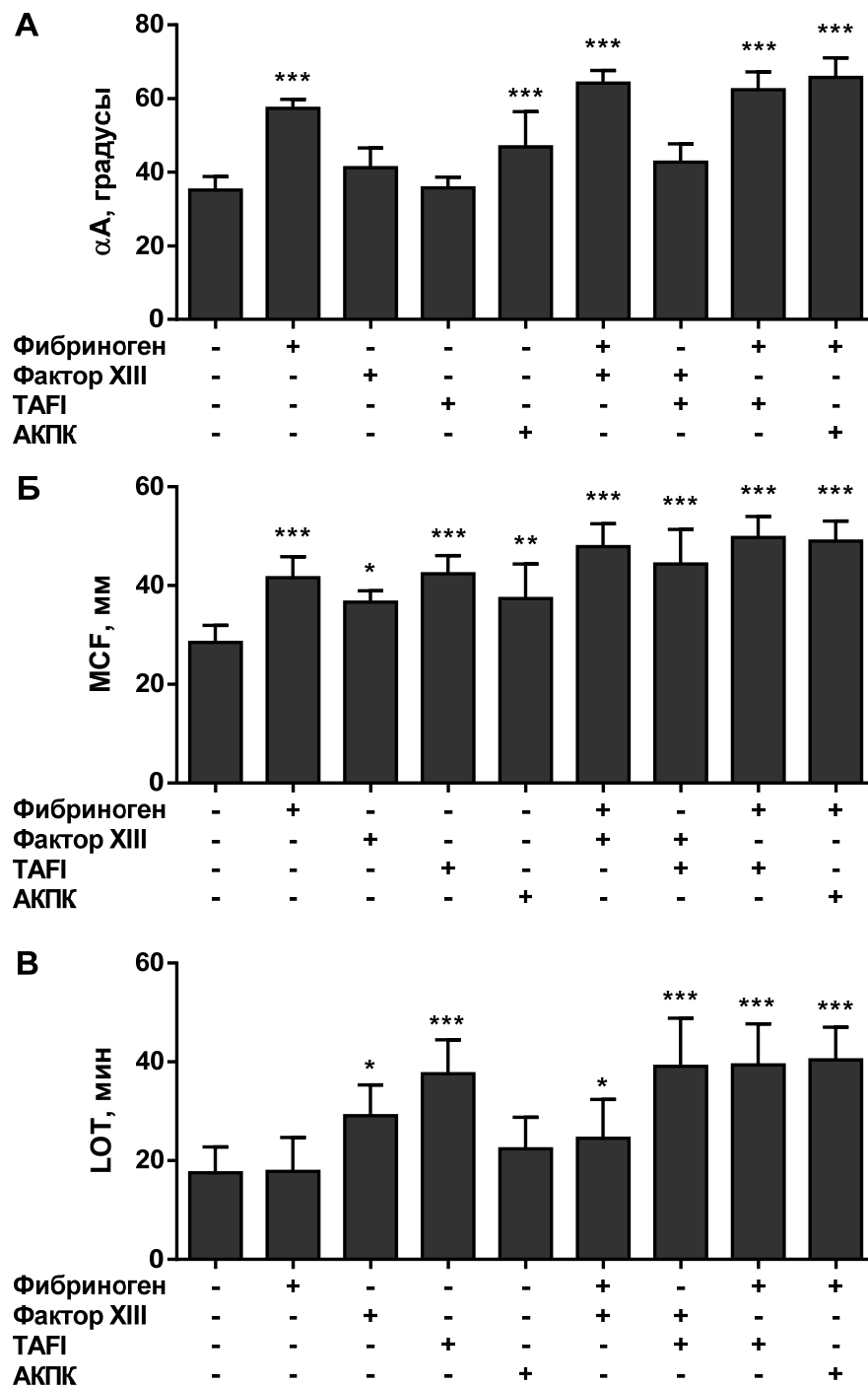
Таким образом, тяжелая изолированная тромбоцитопения характеризуется снижением скорости формирования кровяного сгустка и его максимальной плотности. Добавление в тромбоцитопеническую кровь концентрата фибриногена вызывает увеличение и скорости формирования, и максимальной плотности сгустка. АКПК в этих условиях увеличивает скорость формирования сгустка, не влияя на плотность сгустка, тогда как концентрат FXIII, наоборот, увеличивает плотность сгустка, не влияя на скорость его формирования. В случае применения концентрата фибриногена одновременно с АКПК или концентратом FXIII

отмечается синергетический эффект, выражающийся в дополнительном приросте скорости формирования сгустка или его максимальной плотности соответственно.

***Коррекция формирования кровяного сгустка при
тяжелой тромбоцитопении, осложненной гиперфибринолизом***

αА. При индукции фибринолиза в тромбоцитопенической крови αА составил $35,1 \pm 3,7^\circ$ ($P = 0,005$, сравнение с тромбоцитопенией при отсутствии гиперфибринолиза). Добавление концентрата фибриногена и АКПК по отдельности приводило к увеличению этого показателя до $57,4 \pm 2,4^\circ$ ($P < 0,001$) и $46,9 \pm 9,6^\circ$ ($P < 0,001$) соответственно, тогда как добавление концентрата FXIII или TAFI не вызывало его значимого изменения (Рисунок 4.10, А). Одновременное добавление концентрата фибриногена и АКПК приводило к дополнительному увеличению αА, который составил $65,8 \pm 5,3^\circ$, что статистически значимо превышало его значение при использовании концентрата фибриногена отдельно ($P = 0,027$). Эффект от добавления концентрата фибриногена одновременно с концентратом FXIII или TAFI не отличался от такового при добавлении концентрата фибриногена отдельно. При одновременном добавлении в кровь концентрата FXIII и TAFI αА составил $42,8 \pm 5,0^\circ$, однако по сравнению с контролем это изменение не достигло уровня статистической значимости ($P = 0,064$).

МСF. При индукции фибринолиза в тромбоцитопенической крови МСF составила $28,5 \pm 3,4$ мм. Добавление концентратов фибриногена, FXIII, TAFI и АКПК по отдельности приводило к увеличению этого показателя до $41,6 \pm 4,2$ мм ($P < 0,001$), $36,6 \pm 2,3$ мм ($P = 0,017$), $42,4 \pm 3,7$ мм ($P < 0,001$) и $37,4 \pm 7,0$ мм ($P = 0,006$) соответственно (Рисунок 4.10, Б). При одновременном добавлении в кровь концентрата фибриногена и АКПК МСF возрастала до $49,0 \pm 4,1$ мм, что статистически значимо превышало значение этого показателя при использовании концентрата фибриногена отдельно ($P = 0,044$). При одновременном добавлении концентрата фибриногена и TAFI также отмечалось дополнительное увеличение МСF, которая составила $49,8 \pm 4,2$ мм, что превышало значение этого показателя при использовании указанных препаратов по отдельности ($P = 0,017$ и $P = 0,044$).



В восстановленную кровь с содержанием тромбоцитов $(16 \pm 4) \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ добавляли концентрат фибриногена (3 мг/мл), FXIII (2 МЕ/мл), АКПК (2 ЕД/мл) и/или TAFI (0,25 ЕД/мл). В контрольные образцы добавляли PBS (pH 7,4). Фибринолиз индуцировали добавлением 150 МЕ/мл tPA. Формирование кровяного сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали угол альфа (А), максимальную плотность сгустка (Б) и время начала лизиса сгустка (В). Результаты представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака. Образцы, содержащие один гемостатик, сравнивали с контролем; образцы, содержащие два гемостатика, сравнивали с образцами, содержащими один гемостатик. Сравнения с контролем отмечены на графике. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Рисунок 4.10 — Влияние фибриногена, FXIII, АКПК и TAFI на формирование кровяного сгустка в модели тяжелой тромбоцитопении, осложненной гиперфибринолизом

соответственно). При одновременном добавлении в кровь концентратов фибриногена и FXIII MCF составила $47,9 \pm 4,6$ мм, что существенно не отличалось от ее значения при добавлении концентрата фибриногена отдельно ($P = 0,157$). Эффект от добавления в кровь концентрата FXIII и TAFI не отличался от такового при добавлении TAFI отдельно.

LOT. Индукция фибринолиза вызывала лизис кровяного сгустка, время начала которого (LOT) составило $17,6 \pm 5,2$ мин. Добавление в кровь концентратов фибриногена или АКПК не вызывало статистически значимого изменения данного показателя. В отличие от этого добавление FXIII и TAFI приводило к увеличению LOT до $29,1 \pm 6,2$ мин ($P = 0,034$) и $37,6 \pm 6,9$ мин ($P < 0,001$) соответственно (Рисунок 4.10, В). При одновременном добавлении в кровь концентрата фибриногена и АКПК отмечалось их синергетическое взаимодействие, выражавшееся в увеличении LOT до $40,4 \pm 6,6$ мин, что статистически значимо превышало значение этого показателя при использовании этих препаратов по отдельности ($P < 0,001$ для обоих сравнений). Эффект от одновременного добавления в кровь концентратов фибриногена и FXIII не отличался такового при добавлении концентрата FXIII отдельно. Эффект от добавления TAFI в комбинации с концентратом фибриногена или FXIII не отличался от такового при добавлении TAFI отдельно.

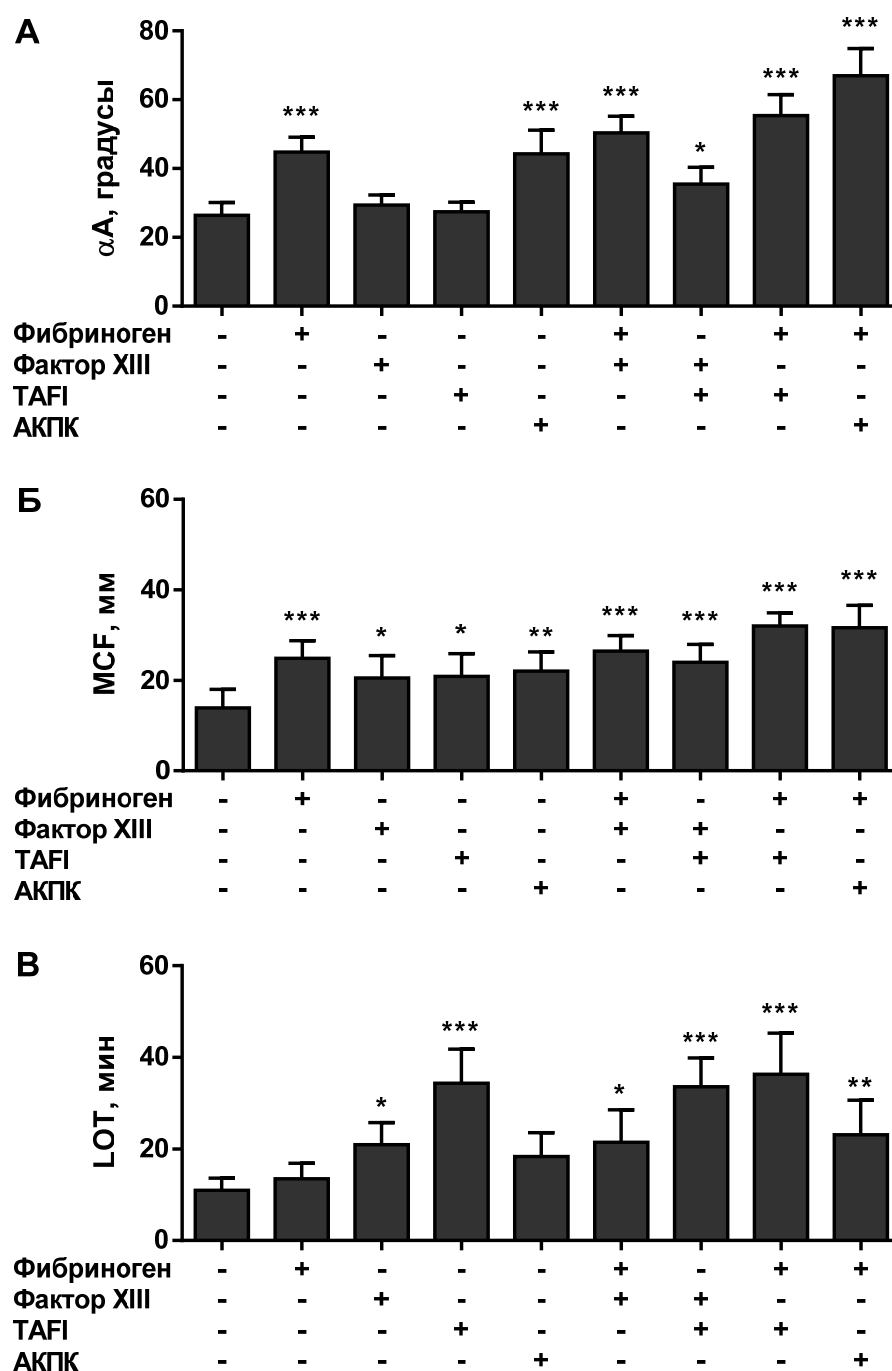
Таким образом, индукция фибринолиза в условиях изолированной тяжелой тромбоцитопении приводит к еще большему снижению скорости формирования и максимальной плотности сгустка. При этом добавление в кровь концентрата фибриногена или АКПК вызывает увеличение скорости формирования и плотности сгустка, не оказывая влияния на время начала его лизиса, а добавление концентрата FXIII или TAFI вызывает увеличение плотности сгустка и угнетает его лизис, не влияя на скорость формирования сгустка. При этом TAFI оказывает наибольший антифибринолитический эффект. Применение концентрата фибриногена в комбинации с АКПК или TAFI вызывает наибольшую коррекцию скорости формирования, максимальной плотности и фибринолитической устойчивости сгустка. Эффект от применения концентрата FXIII в комбинации с концентратом

фибриногена или ТАФИ в целом не превышает больший из эффектов, вызываемых этими препаратами по отдельности и, таким образом, уступает эффекту от применения концентрата фибриногена в комбинации с АКПК или ТАФИ.

Коррекция формирования кровяного сгустка при тяжелой тромбоцитопении, осложненной гиперфибринолизом и гемодилюцией

αА. В условиях тромбоцитопении, осложненной гиперфибринолизом и гемодилюцией αА снижался до $26,4 \pm 3,7^\circ$ ($P = 0,006$, сравнение с тромбоцитопенией и гиперфибринолизом в неразведенной крови). Добавление концентрата фибриногена и АКПК приводило к увеличению этого показателя до $44,8 \pm 4,4^\circ$ и $44,3 \pm 6,9^\circ$ соответственно ($P < 0,001$ для обоих сравнений), а их одновременное добавление — до αА до $67,0 \pm 7,9^\circ$, что статистически значимо превышало значение этого показателя при использовании указанных препаратов по отдельности ($P < 0,001$ для обоих сравнений) (Рисунок 4.11, А). Добавление концентрата FXIII и ТАФИ по отдельности не вызывало существенного изменения αА, однако их одновременное применение приводило к увеличению αА до $35,5 \pm 4,9^\circ$ ($P = 0,014$, сравнение с контролем). Добавление в кровь комбинации концентрата фибриногена и ТАФИ вызывало увеличение αА до $55,4 \pm 6,1^\circ$, что статистически значимо превышало его значение при их использовании по отдельности ($P = 0,002$ и $P < 0,001$ соответственно). Эффект от одновременного добавления в кровь концентратов фибриногена и FXIII существенно не отличался от такового при добавлении концентрата фибриногена отдельно ($P = 0,432$).

МСФ. В условиях тромбоцитопении, осложненной гиперфибринолизом и гемодилюцией, МСФ составила $13,9 \pm 4,1$ мм. Добавление концентратов фибриногена, FXIII, ТАФИ и АКПК приводило к увеличению этого показателя до $24,9 \pm 3,9$ мм ($P < 0,001$), $20,5 \pm 4,9$ мм ($P = 0,040$), $20,9 \pm 5,0$ мм ($P = 0,024$) и $22,0 \pm 4,3$ мм ($P = 0,004$) соответственно (Рисунок 4.11, Б). При добавлении в кровь концентрата фибриногена в комбинации с АКПК МСФ возрастала до $31,6 \pm 4,9$ мм, что превышало значения этого показателя при использовании указанных препаратов по отдельности ($P = 0,033$ и $P < 0,001$ соответственно). Одновременное



В восстановленную кровь с содержанием тромбоцитов $(16 \pm 4) \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ добавляли 40 % объема Трис-буферизированного 0,9 % раствора NaCl (pH 7,4), затем добавляли концентрат фибриногена (3 мг/мл), FXIII (2 МЕ/мл), АКПК (2 ЕД/мл) и/или TAFI (0,25 ЕД/мл). В контрольные образцы добавляли PBS (pH 7,4). Фибринолиз индуцировали добавлением 150 МЕ/мл tPA. Формирование кровяного сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали угол альфа (А), максимальную плотность сгустка (Б) и время начала лизиса сгустка (В). Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили методом однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака. Все образцы, содержащие гемостатик, сравнивали с контролем; образцы, содержащие два гемостатика сравнивали с образцами, содержащими один гемостатик. Сравнения с контролем отмечены на графике. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Рисунок 4.11 — Влияние фибриногена, FXIII, АКПК и TAFI на формирование кровяного сгустка в модели тяжелой тромбоцитопении, гиперфибринолиза и гемодилюции

добавление концентрата фибриногена и TAFI приводило к увеличению MCF до $32,0 \pm 2,9$ мм, что превышало ее значение при использовании этих препаратов по отдельности ($P = 0,020$ и $P < 0,001$ соответственно). Эффект от одновременного добавления в кровь концентратов фибриногена и FXIII не отличался от такового при добавлении концентрата фибриногена отдельно, а эффект от одновременного добавления концентрата FXIII и TAFI не отличался от такового при добавлении каждого из них по отдельности.

LOT. При индукции фибринолиза в разведенной тромбоцитопенической крови LOT составило $10,9 \pm 2,7$ мин. Добавление в кровь концентратов фибриногена и АКПК по отдельности не вызывало статистически значимого изменения этого показателя, однако при их одновременном добавлении он увеличивался до $23,1 \pm 7,6$ мин ($P = 0,004$), что указывает на определенное синергетическое взаимодействие между этими препаратами. Добавление концентрата FXIII вызывало увеличение LOT до $20,9 \pm 4,9$ мин ($P = 0,036$), а добавление TAFI вызывало еще больший эффект, который выражался в увеличении этого показателя до $34,3 \pm 7,5$ мин ($P < 0,001$) (Рисунок 4.11, В). Эффект от одновременного добавления концентратов фибриногена и FXIII не отличался от такового при добавлении концентрата FXIII отдельно. Эффект от добавления TAFI в комбинации с концентратом фибриногена или FXIII не отличался от такового при добавлении TAFI отдельно.

Таким образом, при сочетании тяжелой тромбоцитопении, гиперфибринолиза и гемодилюции наблюдается дальнейшее снижение скорости формирования и максимальной плотности сгустка, а также более раннее начало его лизиса. Эффекты от применения концентратов фибриногена, FXIII, АКПК и TAFI в этих условиях в целом схожи с таковыми при сочетании тяжелой тромбоцитопении и гиперфибринолиза без гемодилюции. Так, добавление в кровь концентрата фибриногена или АКПК вызывает увеличение скорости формирования и максимальной плотности сгустка, но не оказывает статистически значимого влияния на время начала лизиса. В отличие от этого добавление в кровь концентрата FXIII или TAFI не отражается на скорости формирования кровяного сгустка, но приводит к увеличению его максимальной плотности и отдалению времени начала лизиса. Причем

антифибринолитический эффект ТАФИ значительно превышает таковой при использовании концентрата FXIII. Наибольший корригирующий эффект в целом достигается при комбинированном применении концентрата фибриногена и ТАФИ, что приводит одновременно к увеличению скорости формирования, плотности и фибринолитической устойчивости сгустка. Комбинация концентрата фибриногена и АКПК хотя и обеспечивает наибольший прирост скорости формирования и максимальной плотности сгустка, значительно уступает предыдущей комбинации гемостатиков по выраженности антифибринолитического эффекта. Корригирующий эффект концентрата FXIII в комбинации с концентратом фибриногена или ТАФИ в целом превышает таковой при их использовании по отдельности, но уступает эффекту концентрата фибриногена в комбинации с ТАФИ или АКПК.

* * *

Анализ формирования кровяного сгустка в условиях тяжелой изолированной тромбоцитопении показал, что для этого состояния характерно снижение скорости формирования и максимальной плотности. Повышение фибринолитической активности плазмы в этих условиях потенцирует эти нарушения и вызывает лизис кровяного сгустка, что особенно выражено при сопутствующей гемодилюции. При исследовании возможности коррекции формирования кровяного сгустка в условиях тяжелой тромбоцитопении было установлено:

1. Концентрат фибриногена при отсутствии гиперфибринолиза обеспечивает увеличение скорости формирования сгустка и его максимальной плотности. В условиях гиперфибринолиза (в том числе при его сочетании с гемодилюцией) этот препарат вызывает те же эффекты, не влияя, однако, на время начала лизиса сгустка.

2. АКПК при отсутствии гиперфибринолиза вызывает некоторое ускорение формирования сгустка без увеличения его максимальной плотности. В условиях гиперфибринолиза (в том числе при его сочетании с гемодилюцией) этот препарат способствует коррекции как скорости формирования, так и максимальной плотности сгустка, не влияя при этом на время начала его лизиса.

3. Концентрат FXIII при отсутствии гиперфибринолиза не влияет на скорость формирования сгустка, но обеспечивает увеличение его максимальной плотности. В условиях гиперфибринолиза (в том числе при его сочетании с гемодилюцией) этот препарат способствует также отдалению времени начала лизиса сгустка.

4. TAFI в условиях гиперфибринолиза (в том числе при его сочетании с гемодилюцией) не влияет на скорость формирования кровяного сгустка, но увеличивает его максимальную плотность и отдалляет время начала лизиса сгустка. Антифибринолитический эффект TAFI значительно превышает таковой при использовании трех других вышеуказанных гемостатиков.

5. Комбинированное применение концентрата фибриногена и АКПК, по сравнению с их применением по отдельности, обеспечивает еще большее ускорение формирования кровяного сгустка вне зависимости от уровня фибринолитической активности плазмы, а в условиях гиперфибринолиза (в том числе при его сочетании с гемодилюцией) вызывает дополнительное увеличение максимальной плотности сгустка и отдаление времени начала лизиса сгустка, что свидетельствует о синергетическом действии этих препаратов.

6. Комбинированное применение концентрата фибриногена и TAFI в условиях гиперфибринолиза в неразведенной крови способствует дополнительному увеличению максимальной плотности сгустка, по сравнению с их применением по отдельности, а при сопутствующей гемодилюции способствует еще и дополнительному увеличению скорости формирования сгустка, что свидетельствует о синергизме в действии этих препаратов. Необходимо отметить, однако, что эффект комбинированного применения этих препаратов в условиях гиперфибринолиза в отношении времени начала лизиса не превосходит таковой при использовании TAFI отдельно вне зависимости от наличия сопутствующей гемодилюции.

7. Комбинированное применение концентратов фибриногена и FXIII при отсутствии гиперфибринолиза способствует дополнительному увеличению максимальной плотности сгустка, однако в условиях гиперфибринолиза (в том числе при его сочетании с гемодилюцией) эффект комбинированного применения этих

препаратов не превосходит больший из эффектов, вызываемых этими препаратами по отдельности.

8. Комбинированное применение концентрата FXIII и TAFI в условиях гиперфибринолиза (в том числе при его сочетании с гемодилюцией) способствует дополнительному ускорению формирования кровяного сгустка, по сравнению с их использованием по отдельности, однако эффект их одновременного действия в отношении максимальной плотности сгустка и время начала лизиса не превосходит таковой при использовании TAFI отдельно.

Таким образом, в условиях тромбоцитопении (при отсутствии гиперфибринолиза) использование концентрата фибриногена позволяет достичь большей коррекции формирования кровяного сгустка по сравнению с АКПК и концентратом FXIII: если концентрат фибриногена увеличивает и скорость формирования, и максимальную плотность сгустка, то два других препарата вызывают коррекцию только какого-то одного из этих. Дополнительная коррекция может быть достигнута при использовании концентрата фибриногена в комбинации с АКПК (дополнительное увеличение скорости формирования сгустка) или FXIII (дополнительное увеличение максимальной плотности сгустка).

В условиях тяжелой тромбоцитопении, осложненной гиперфибринолизом (в том числе при его сочетании с гемодилюцией), применение концентрата фибриногена или АКПК ускоряют формирование и повышают плотность кровяного сгустка, но не защищают его от лизиса, тогда как применение концентрата FXIII или TAFI повышают плотность сгустка и защищают его от лизиса, но не влияют на скорость формирования сгустка. Это обстоятельство определяет целесообразность применения этих препаратов в комбинации с целью достижения наибольшего корригирующего эффекта. Действительно, применение концентрата фибриногена в комбинации с АКПК или TAFI позволяет достичь максимальной коррекции, выражающейся в одновременном увеличении скорости формирования, плотности и фибринолитической устойчивости сгустка. Менее выраженная коррекция этих свойств сгустка может быть достигнута при использовании концентрата FXIII в комбинации с концентратом фибриногена или TAFI.

Глава 5

Нарушения гемостатического потенциала крови и его коррекция при тромбастении Гланцмана

5.1. Генерация тромбина при тромбастении Гланцмана и возможности ее коррекции с помощью rFVIIa

Как известно, выраженность геморрагического синдрома при тромбастении Гланцмана (ТГ) варьирует от единичных петехий до угрожающих жизни кровотечений. При этом тяжесть кровотечений не зависит от вида мутации, лежащей в основе данной патологии, или количества интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов. Даже у пациентов с одной и той же мутацией и уровнем экспрессии интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ склонность к кровоточивости может значительно различаться. Возможным объяснением этого феномена является то, что дефицит интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ оказывает влияние на реализацию определенных функций тромбоцитов, не зависящих напрямую от этих рецепторов, например на прокоагулянтную активность тромбоцитов. Снижение генерации тромбина действительно характерно для ТГ, однако вариабельность нарушения генерации тромбина, которая может быть причиной различной склонности пациентов к кровотечениям при этой патологии, еще не была предметом специального исследования.

На сегодняшний день единственным гемостатиком, одобренным для купирования больших кровотечений при ТГ, является концентрат rFVIIa. Эффективность его применения составляет около 90 %. Это говорит о том, что у каждого десятого пациента остановить кровотечение с помощью rFVIIa не удастся. Возможно, это обусловлено введением недостаточной дозы препарата или нечувствительностью пациента. В то же время периодически у пациентов с ТГ, получивших инъекцию rFVIIa, регистрируются тромботические события, в т. ч. с летальным исходом, что указывает на завышение дозы этого препарата. Очевидно, пациенты получили бы выгоду, если бы доза rFVIIa выбиралась не эмпирически, а на основании объективной оценки индивидуальной чувствительности пациента к этому препарату.

Таблица 5.1 — Мутации у пациентов с тромбастенией Гланцмана, включенных в исследование

Мутация	Кол-во пациентов	Ген	Изменение в гене	Комплементарная ДНК	Белок
IJ1	14	ITGB3	Ex13: 11-bp del	c.2051–61del	Asp651Glufs*3
IJ2	1	ITGB3	IVS9: 11.2-Kb del	c.1285–2181del	Val695Cysfs*33
Arab	8	ITGA2B	IVS3: (–3) 13-bp del	c.410–427del	Ala106–Gln111del
Alt25	1	ITGA2B	Ex25: 6-bp del / 31-bp ins	c.2473–8 del / 8 ins	Leu786–Asn795del / 8f ins

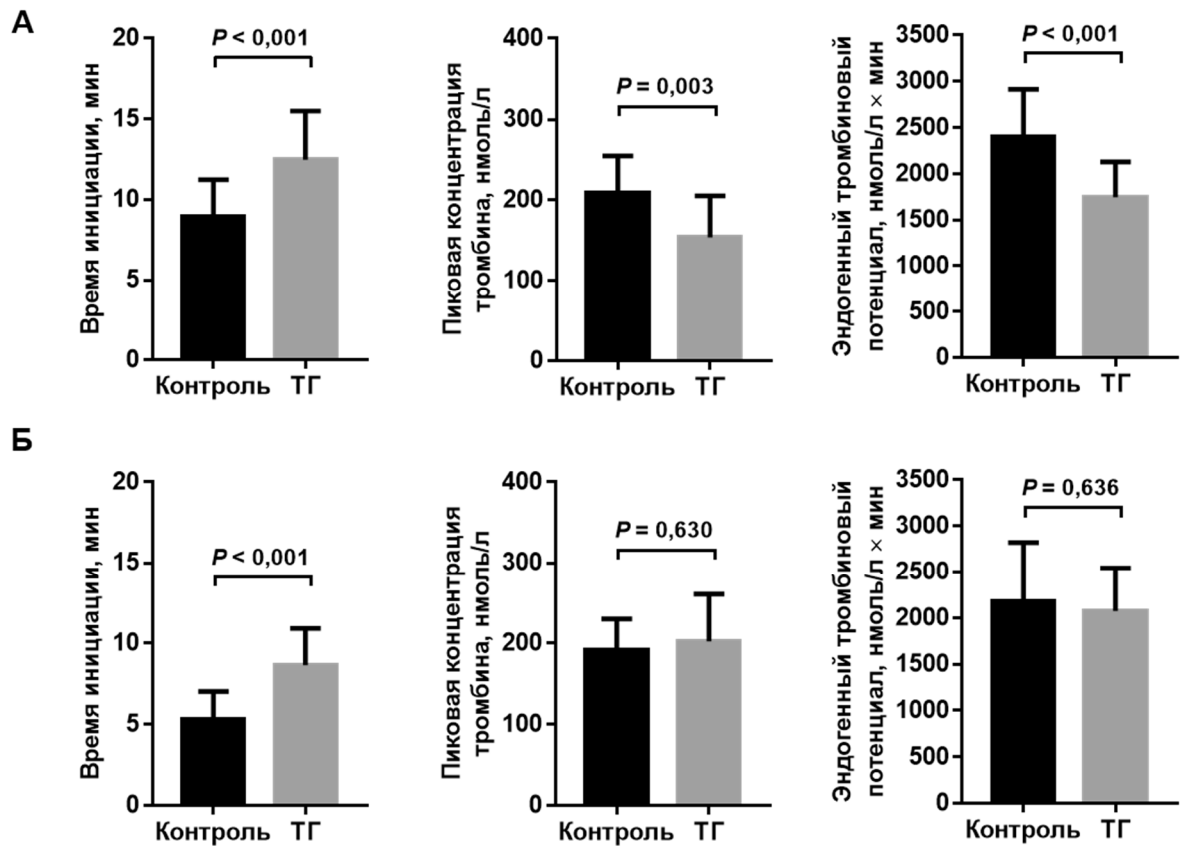
В связи с вышеизложенным мы поставили перед собой задачу изучить степень нарушения генерации тромбина у пациентов с ТГ типа 1 и разработать способ персонализированной оценки возможности коррекции нарушенной генерации тромбина с помощью концентрата rFVIIa при этой патологии. В исследовании приняли участие 24 пациента с указанной патологией. Диагноз был подтвержден на основании оценки уровня экспрессии интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов и идентификации вида мутации в генах, кодирующих указанный рецептор (Таблица 5.1). Все пациенты страдали кровотечениями различной выраженности, включая носовые, десневые кровотечения, меноррагии, послеродовые кровотечения, желудочно-кишечные кровотечения и другие. Группу контроля составили 15 здоровых добровольцев, схожих по полу и возрасту. Генерацию тромбина изучали в ОТП методом калиброванной автоматизированной тромбографии и оценивали по времени инициации (*мин*), пиковой концентрации тромбина (ПКТ, *нмоль/л*) и величине эндогенного тромбинового потенциала (ЭТП, *нмоль/л × мин*).

Генерация тромбина у пациентов с тромбастенией Гланцмана

Поскольку чрезмерная активация системы свертывания может нивелировать различия в генерации тромбина между пациентами с ТГ и здоровыми добровольцами, прежде всего было важно определить такой способ индукции генерации

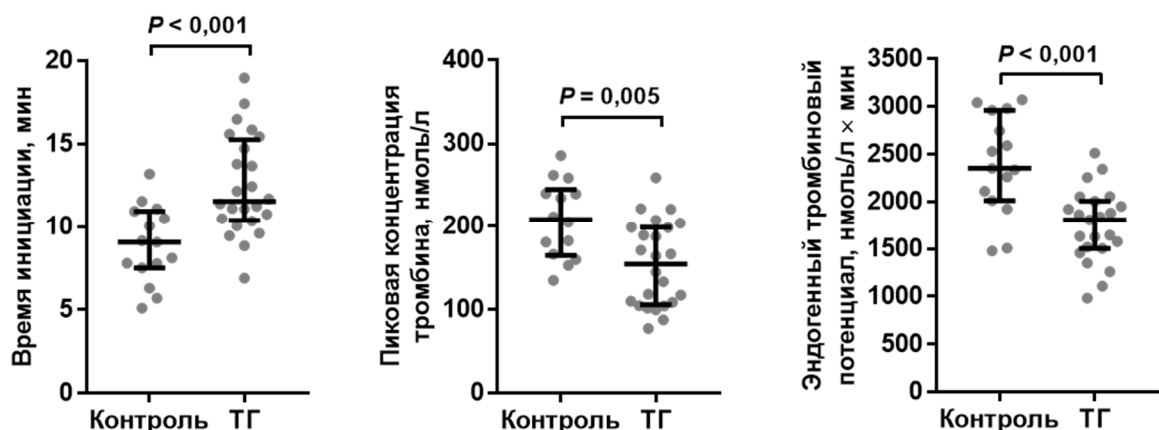
тромбина, который позволил бы дифференцировать эти две группы обследуемых. Для этого мы сравнили показатели теста генерации тромбина у пациентов с ТГ и здоровых добровольцев при индукции генерации тромбина двумя способами: 1) путем рекальцификации без добавления тканевого фактора и 2) путем рекальцификации с добавлением 0,2 пмоль/л тканевого фактора. Исследование показало, что при индукции генерации тромбина первым способом у пациентов с ТГ время инициации было на 40 % больше ($P < 0,001$), а значения ПКТ и ЭТП были на 26 % ($P = 0,003$) и 27 % ($P < 0,001$) соответственно меньше, чем у здоровых добровольцев (Рисунок 5.1, А). При индукции генерации тромбина вторым способом было обнаружено, что по сравнению со здоровыми добровольцами у пациентов с ТГ время инициации было также статистически значимо больше ($P < 0,001$), однако значения ПКТ и ЭТП были близки к таковым у здоровых добровольцев ($P = 0,630$ и $P = 0,636$ соответственно) (Рисунок 5.1, Б). Следовательно, индукция генерации тромбина путем рекальцификации ОТП без добавления в нее тканевого фактора позволяет лучше дифференцировать пациентов с ТГ и здоровых добровольцев.

Далее мы проанализировали распределение значений показателей теста генерации тромбина у пациентов с ТГ и здоровых добровольцев (контроль). Как видно на Рисунке 5.2, у пациентов с ТГ медианное значение времени инициации было больше, а медианные значения ПКТ и ЭТП были меньше, чем в контроле, что совпадает с результатами анализа, представленными на Рисунке 5.1, Б. В то же время на Рисунке 5.2 видно, что у 8/24 (33 %) пациентов значения времени инициации были не выше верхнего квартиля этого показателя в контроле, а также что у 11/24 (46 %) и 5/24 (22 %) пациентов значения ПКТ и ЭТП соответственно были не ниже нижнего квартиля этих показателей в контроле. Иными словами, несмотря на практически полное отсутствие интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов, у каждого 3–4-го пациента с ТГ типа 1 генерация тромбина была не хуже, чем у 75 % здоровых лиц. Установленные различия в степени нарушения генерации тромбина у пациентов с ТГ типа 1 могут лежать в основе их различной склонности к кровоточивости.



Генерацию тромбина индуцировали путем (А) рекальцификации без добавления тканевого фактора или (Б) путем рекальцификации с добавлением 0,2 пмоль/л тканевого фактора в ОТП, полученной из цитратной крови здоровых добровольцев (контроль, $n = 15$) и пациентов с тромбастенией Гланцмана (ТГ, $n = 24$). Данные представлены в виде $M \pm SD$. Сравнения средних проводили с помощью двустороннего t -критерия Стьюдента для независимых выборок.

Рисунок 5.1 — Генерация тромбина в ОТП пациентов с тромбастенией Гланцмана и здоровых добровольцев



Результаты эксперимента, представленные на Рисунке 5.1, Б, представлены в виде диаграммы рассеяния, медианы и межквартильного размаха. Сравнения медиан проводили с помощью двустороннего критерия Манна–Уитни.

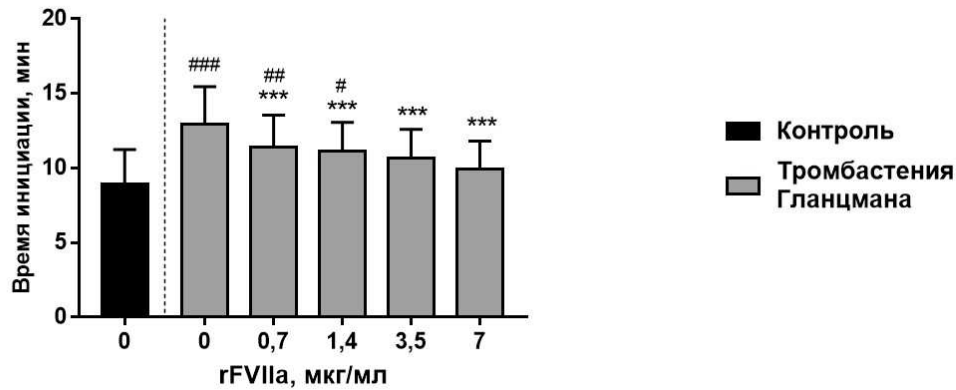
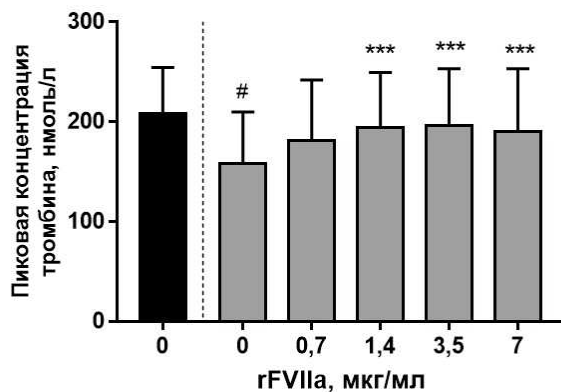
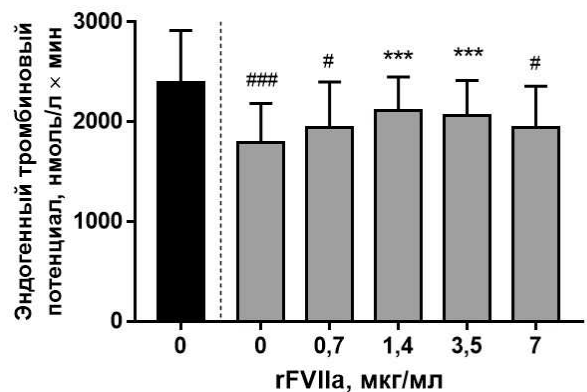
Рисунок 5.2 — Распределение значений показателей теста генерации тромбина у пациентов с тромбастенией Гланцмана и здоровых добровольцев

***Влияние rFVIIa на генерацию тромбина
у пациентов с тромбастенией Гланцмана***

Учитывая, что механизм действия rFVIIa связан с усилением генерации тромбина, для решения поставленной задачи мы изучили особенности генерации тромбина у пациентов с ТГ и влияние различных концентраций rFVIIa на генерацию тромбина у этих пациентов — в среднем и индивидуально для каждого пациента. Мы также изучили, зависит ли влияние rFVIIa на генерацию тромбина при ТГ от типа мутации, лежащей в основе данного заболевания.

Далее мы исследовали влияние rFVIIa на генерацию тромбина у пациентов с ТГ. Для этого каждый образец ОТП, полученной из крови пациентов, делили на несколько аликвот, в каждую из которых добавляли rFVIIa. Конечные концентрации препарата составили 0,7, 1,4, 3,5 и 7,0 мкг/мл (что приблизительно соответствует дозам 25, 50, 125 или 250 мкг/кг). ОТП пациентов, не содержащая rFVIIa, а также ОТП здоровых добровольцев служили контролем. Исследования показали, что добавление rFVIIa в концентрации 0,7 мкг/мл (соответствует дозе 25 мкг/кг) вызывало статистически значимое сокращение времени инициации — в среднем на $1,5 \pm 1,3$ мин ($P < 0,001$) (Рисунок 5.3, А). Увеличение концентрации rFVIIa до 3,5 мкг/мл приводило к еще большему сокращению времени инициации, так что его продолжительность уже не отличалась от значения этого показателя у здоровых добровольцев. Статистически значимое увеличение ПКТ и ЭТП у пациентов с ТГ отмечалось при использовании rFVIIa в концентрации 1,4 мкг/мл (соответствует дозе 50 мкг/кг) — в среднем на 35 ± 29 нмоль/л и 311 ± 270 нмоль/л $\times$ мин ($P < 0,001$ для обоих сравнений) соответственно (Рисунок 5.3, Б и В). Примечательно, что при использовании rFVIIa в концентрации 0,7 и 1,4 мкг/мл значения ПКТ и ЭТП соответственно уже не отличались от их значений у здоровых добровольцев.

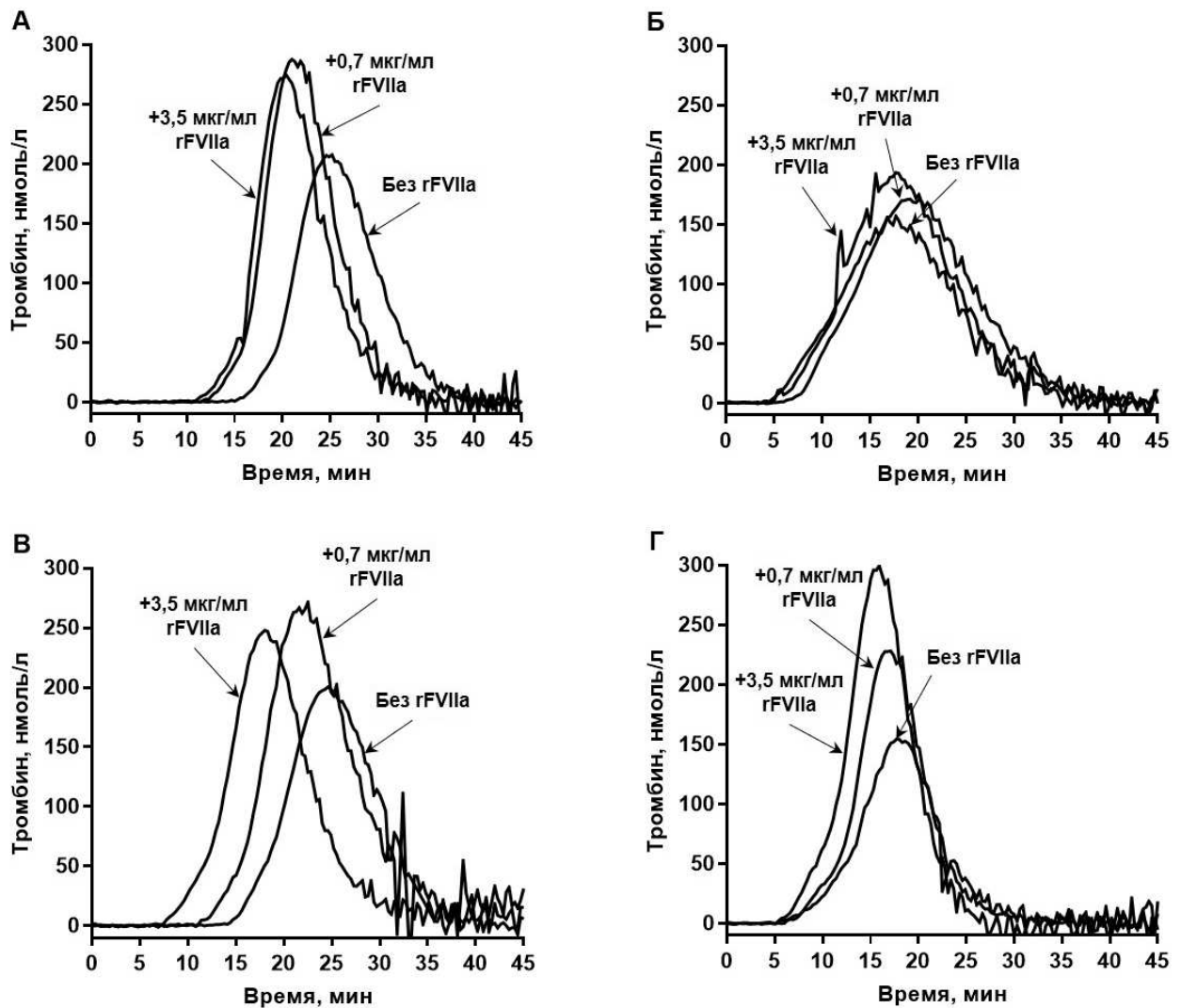
При изучении влияния различных концентраций rFVIIa на генерацию тромбина в каждом отдельно взятом образце ОТП, полученной из крови пациентов с ТГ, мы обнаружили значительную вариабельность ответа показателей теста генерации тромбина на добавление rFVIIa (Рисунок 5.4). Так, у 4/24 (17 %) пациентов добавление rFVIIa в концентрации 0,7 мкг/мл (наименьшей из использованных, соответ-

А**Б****В**

В ОТП, полученную из крови пациентов с тромбастенией Гланцмана, добавляли rFVIIa в конечных концентрациях, указанных на рисунке. Генерацию тромбина индуцировали путем рекальцификации плазмы без добавления тканевого фактора. Анализировали время инициации генерации тромбина (А), пиковую концентрацию тромбина (Б) и эндогенный тромбиновый потенциал (В). Данные представлены в виде $M \pm SD$. Сравнение средних в образцах, содержащих rFVIIa, со средним в образцах, не содержащих rFVIIa, проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Даннетта; *** $P < 0,001$. Сравнения средних в образцах, содержащих rFVIIa, с контролем (здоровыми добровольцами) проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Даннетта; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$.

Рисунок 5.3 — Влияние возрастающих концентраций rFVIIa на генерацию тромбина в ОТП пациентов с тромбастенией Гланцмана

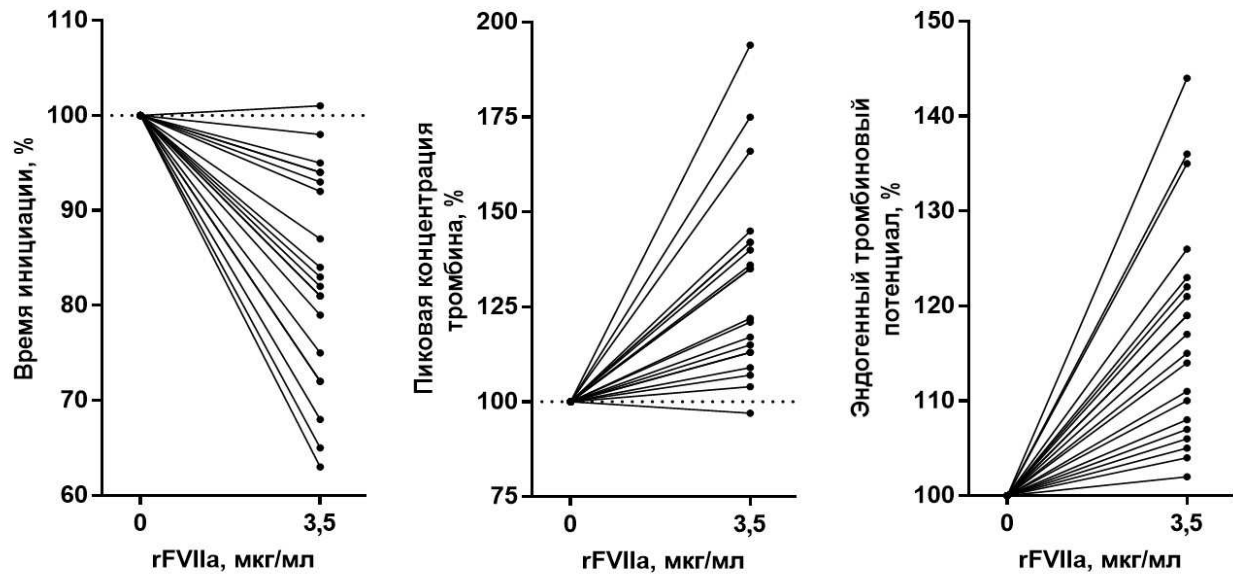
ствуется дозе 25 мкг/кг) уже вызывало максимальный эффект, так что повышение концентрации препарата не приводило к дополнительному усилению генерации тромбина («сильный» ответ) (Рисунок 5.4, А). В то же время у 6/24 (25 %) пациентов, наоборот, добавление rFVIIa даже в концентрации 3,5 мкг/мл (соответствует дозе 125 мкг/кг) не приводило к заметному изменению генерации тромбина («слабый» ответ) (Рисунок 5.4, А). У 14/24 (58 %) пациентов увеличение концентрации rFVIIa сопровождалось последовательным сокращением времени инициа-



В ОТП, полученную из крови пациентов с тромбоастенией Гланцмана, добавляли rFVIIa в концентрациях, указанных на рисунке. Генерацию тромбина индуцировали путем рекальцификации плазмы. Приведены репрезентативные тромбограммы, отражающие различный ответ ОТП на добавление rFVIIa. А — «сильный» ответ; Б — «слабый» ответ; В и Г — «средний» ответ.

Рисунок 5.4 — Типы ответа на добавление rFVIIa в ОТП пациентов с тромбоастенией Гланцмана

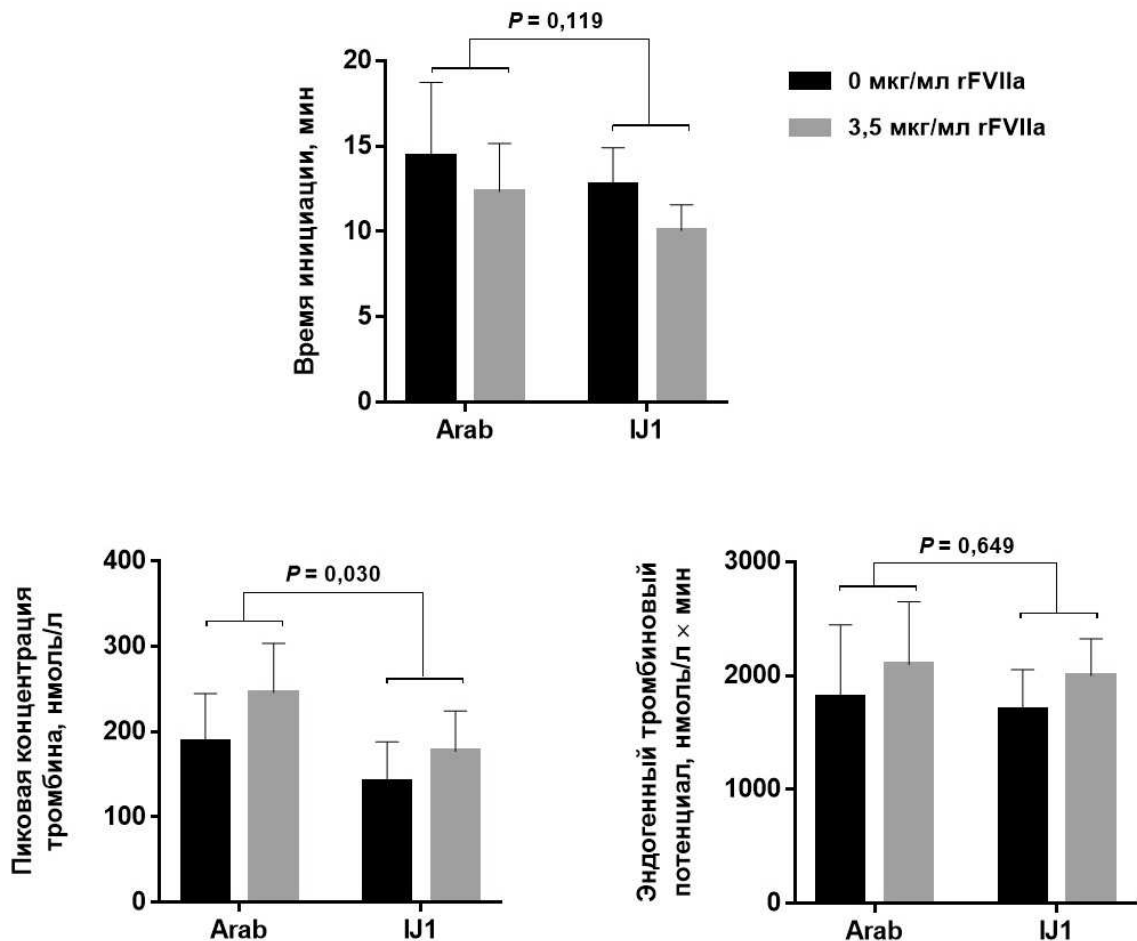
ации или увеличением ПКТ (Рисунок 5.4, В и Г) без заметного изменения других показателей генерации тромбина («средний» ответ). Степень изменения показателей теста генерации тромбина (в процентах от их исходного значения) в каждом образце ОТП после добавления 3,5 мкг/мл rFVIIa приведена на Рисунке 5.5. Аналогичная картина наблюдалась и при использовании rFVIIa в концентрациях 0,7 и 1,4 мкг/мл. Таким образом, при ТГ добавление rFVIIa в ОТП в целом вызывает коррекцию генерации тромбина, однако выраженность корригирующего эффекта носит индивидуальных характер.



Генерацию тромбина изучали в ОТП пациентов с ТГ до и после добавления в нее 3,5 мкг/мл rFVIIa. Значения показателей генерации тромбина после добавления rFVIIa выражали в процентах от их исходного значения, которое принимали за 100 %. Значения показателей, зарегистрированные у каждого пациента, до и после добавления rFVIIa обозначены точкой и соединены линией.

Рисунок 5.5 — Вариабельность ответа показателей теста генерации тромбина на добавление 3,5 мкг/мл rFVIIa в ОТП пациентов с тромbastенией Гланцмана

Согласно результатам генетического анализа у 15/24 (63 %) пациентов с ТГ, включенных в исследование, имела место мутация IJ1, у 8/24 (33 %) — мутация Arab, у 1 (4 %) пациента — мутация IJ2 и у еще 1 (4 %) — мутация Alt25. Характеристика указанных мутаций представлена в Таблице 5.1. В связи с этим мы проанализировали, зависит ли степень коррекции показателей генерации тромбина при добавлении в ОТП пациентов 3,5 мкг/мл rFVIIa от вида мутации (Arab и IJ1), лежащей в основе данной патологии. Проведенный анализ показал, что ни для времени инициации, ни для ПКТ, ни для ЭТП эффект взаимодействия между видом мутации и концентрацией rFVIIa не был статистически значимым ($P = 0,538$, $P = 0,215$ и $P = 0,858$ соответственно), однако имел место статистически значимый главный эффект добавления rFVIIa, который заключался в сокращении времени инициации и увеличении ПКТ и ЭТП ($P < 0,001$ для всех трех показателей) (Рисунок 5.6). Иными словами, добавление rFVIIa в ОТП пациентов в одинаковой мере вызывало коррекцию генерации тромбина у пациентов с мутацией Arab и IJ1. Кроме того, для показателя ПКТ был установлен статистически значимый главный



Генерацию тромбина изучали в ОТП пациентов с ТГ до и после добавления в нее 3,5 мкг/мл rFVIIa. Значения показателей теста для пациентов с мутациями Arab ($n = 8$) и IJ1 ($n = 14$) представлены по отдельности в виде $M \pm SD$. Влияние типа мутации на степень коррекции показателей теста генерации тромбина изучали с помощью двухфакторного смешанного дисперсионного анализа, в котором тип мутации рассматривали как межгрупповой фактор, а концентрацию rFVIIa — как внутригрупповой фактор. Эффект взаимодействия между факторами не был статистически значимым ни для одного из показателей. Обнаружен статистически значимый главный эффект типа мутации для показателя пиковой концентрации тромбина ($P = 0,030$), а также статистически значимый главный эффект добавления rFVIIa для каждого из исследованных показателей ($P < 0,001$ для каждого).

Рисунок 5.6 — Влияние типа мутации на реакцию показателей теста генерации тромбина при добавлении rFVIIa в ОТП при тромбастении Гланцмана

эффект вида мутации, который заключался в том, что у пациентов с мутацией Arab этот показатель в среднем был выше, чем у пациентов с мутацией IJ1 ($P = 0,030$) (вне зависимости от добавления rFVIIa в ОТП). При этом средние значения времени инициации и ЭТП у пациентов с указанными мутациями статистически значимо не отличались ($P = 0,119$ и $P = 0,649$ соответственно).

Таким образом, проведенное исследование показало:

1. У пациентов с ТГ типа 1, для которых характерно практически полное отсутствие интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов, отмечается в среднем пониженная генерация тромбина, что выражается в увеличении времени инициации генерации тромбина, снижении пиковой концентрации тромбина и уменьшении эндогенного тромбинового потенциала. При этом степень нарушения генерации тромбина при данной патологии существенно варьирует — от тяжелого снижения до незначительного изменения. У каждого 3–4-го пациента показатели генерации тромбина оказываются не хуже, чем у 75 % здоровых добровольцев.

2. При ТГ типа 1 существуют определенные паттерны коррекции генерации тромбина при использовании концентрата rFVIIa, в соответствии с которыми пациенты могут быть разделены на три категории: пациенты с «сильным» ответом, ответом «средней силы» и «слабым» ответом на указанный препарат. У пациентов с «сильным» ответом полная коррекция генерации тромбина может быть достигнута с помощью малых концентраций rFVIIa — значительно меньших по сравнению с концентрациями, возникающими в плазме при использовании этого препарата в рекомендованной дозе.

3. У пациентов с ТГ мутация Arab ассоциирована с большей величиной пиковой концентрации тромбина, чем мутация IJ1. В то же время степень коррекции генерации тромбина при использовании rFVIIa не зависит от того, какая из этих мутаций лежит в основе данной патологии.

В целом проведенное исследование дает основания полагать, что фармакологический ответ на rFVIIa при ТГ может быть предсказан персонально для каждого пациента путем предварительной оценки влияния этого препарата *in vitro* на генерацию тромбина. Это позволит ответить на вопрос, возможна ли коррекция генерации тромбина у данного пациента в принципе, и, если да, поможет выбрать оптимальную дозу препарата.

5.2. Верификация модели тромбастении Гланцмана *in vitro*

Невысокая распространенность ТГ затрудняет исследование эффектов различных гемостатических средств при данной патологии. Использование трансгенных животных, нокаутных по генам *ITGA2B* или *ITGB3*, в качестве экспериментальных моделей ТГ позволяет частично решить эту проблему, однако эти модели требуют специализированного оборудования, стерильного вивария и специально обученного персонала, что ограничивает возможности их применения. Кроме того, результаты, полученные в моделях на животных, в силу различных видовых особенностей течения одних и тех же патологических процессов не могут быть напрямую экстраполированы на пациентов и нуждаются в верификации у человека. В связи с этим существует потребность в создании более доступных и простых в исполнении экспериментальных моделей ТГ, например моделей *in vitro*. Наличие таких моделей позволило бы существенно ускорить поиск оптимальных терапевтических стратегий для экстренной коррекции гемостатического потенциала при этой патологии. При анализе литературных данных нам не удалось обнаружить моделей ТГ *in vitro*. В связи с этим мы поставили перед собой задачу создать такую модель, используя для этого кровь здоровых добровольцев. Решению этой задачи и посвящен настоящий раздел нашей работы.

Для создания оригинальной экспериментальной модели ТГ *in vitro* мы использовали эпitifибатид — высокоселективный низкомолекулярный антагонист интегрина $\alpha\text{IIb}\beta 3$, конкурирующий с фибриногеном и другими лигандами за связывание с указанным рецептором тромбоцитов. Для верификации этой модели мы провели три серии экспериментов, в которых сравнили поведение тромбоцитов у пациентов с ТГ типа 1 с поведением тромбоцитов у здоровых добровольцев после инкубации крови с эпitifибатидом в конечной концентрации 25 мкг на 1 мл плазмы. Контролем при этом служили образцы крови здоровых добровольцев, не обработанные эпitifибатидом.

1. Исследование адгезии и агрегации тромбоцитов в условиях высокой скорости сдвига. Известно, что отсутствие интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов, характерное для ТГ, приводит к значительному нарушению адгезии

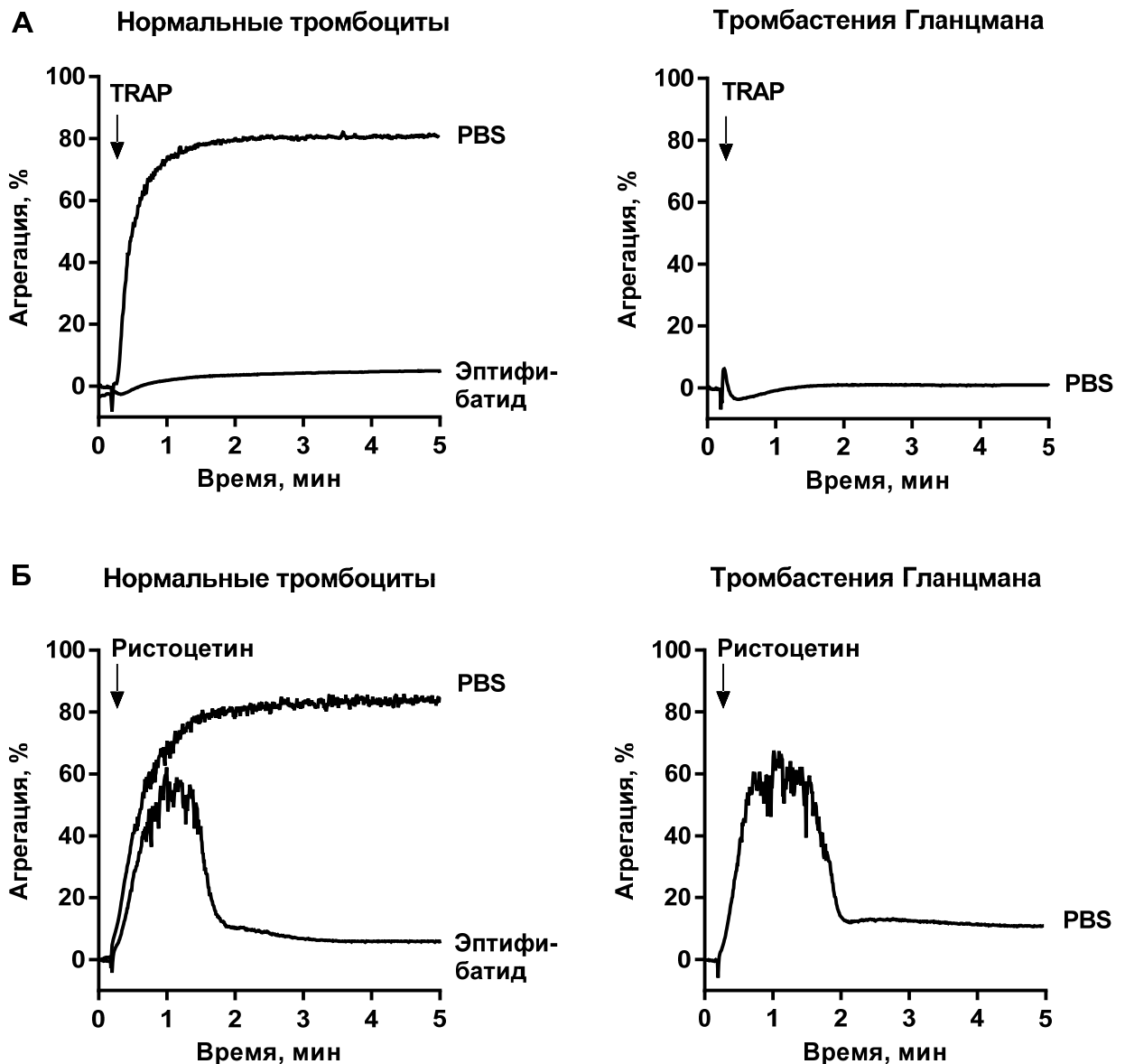


Цитратную кровь, полученную от здоровых добровольцев, инкубировали с эптифибатидом в конечной концентрации 25 мкг на 1 мл плазмы или с таким же объемом PBS (pH 7,4). Обработанную таким образом кровь добровольцев, а также кровь, полученную от пациентов с ТГ типа 1, помещали в полистироновые ячейки и подвергали воздействию скорости сдвига $1\,800\text{ с}^{-1}$ в течение 2 мин. После этого ячейки отмывали от крови и адгезированные объекты окрашивали. Приведены результаты одного из 8 независимых экспериментов.

Рисунок 5.7 — Адгезия и агрегация тромбоцитов в условиях высокой скорости сдвига у здоровых добровольцев и при тромбоастении Гланцмана

и агрегации тромбоцитов при высокой скорости сдвига. Используя анализатор Impact-R, мы сравнили адгезию и агрегацию тромбоцитов в крови при скорости сдвига $1\,800\text{ с}^{-1}$ в модели ТГ и у пациентов с этой патологией, которую оценивали по площади покрытия ячейки адгезированными частицами (SC, %). В контроле SC составила $14,2 \pm 4,6\%$. В модели ТГ SC была близка к нулю. Следовательно, инкубация нормальных тромбоцитов с эптифибатидом практически предотвращала адгезию и агрегацию тромбоцитов в условиях кровотока. В образцах крови, полученной от пациентов с ТГ, адгезии и агрегации тромбоцитов в этих условиях также не наблюдалось (Рисунок 5.7).

2. Исследование агрегации тромбоцитов в ОТП. «Золотым стандартом» диагностики ТГ является световая трансмиссионная агрегометрия. Характерным признаком этой патологии является отсутствие агрегационного ответа тромбоцитов на добавление в ОТП АДФ, адреналина, коллагена, арахидоновой кислоты, TRAP при сохранении агрегационного ответа на добавление ристоцетина. Проведенные исследования показали, что в контрольных образцах ОТП степень агрегации тромбоцитов составила $80,3 \pm 5,2\%$, тогда как в образцах нормальной ОТП, проинкубированной с эптифибатидом (модель ТГ), а также в образцах ОТП,



Образцы ОТП, полученной из крови здоровых добровольцев, проинкубированной с эптифибатидом в конечной концентрации 25 мкг на 1 мл плазмы или с таким же объемом PBS (рН 7,4), а также образцы ОТП, полученной из крови пациентов с ТГ, стимулировали с помощью 25 мкМ TRAP или 1,5 мг/мл ристоцетина. Момент добавления индукторов агрегации отмечен стрелкой. Изменения светопропускания регистрировали в течение 5 мин.

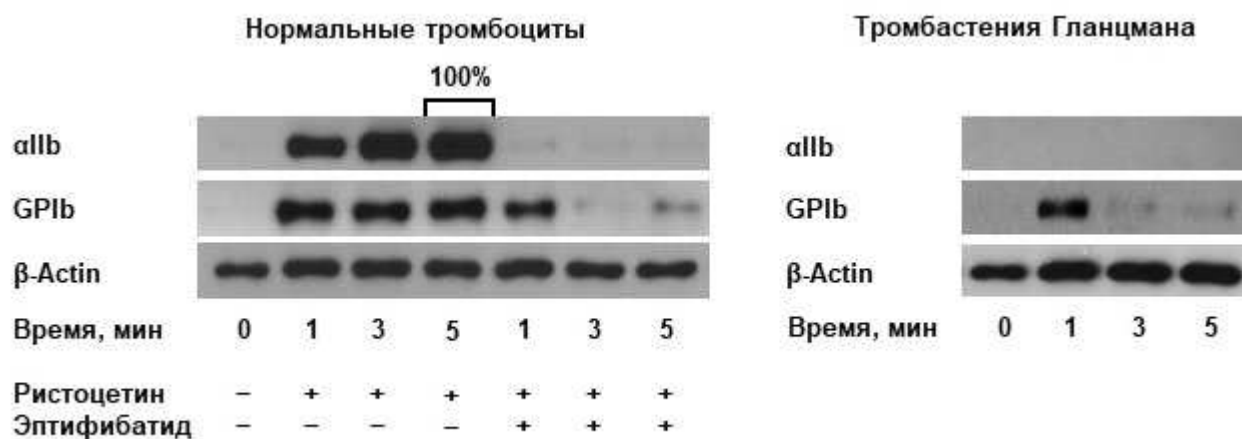
Рисунок 5.8 — TRAP- и ристоцетин-индуцированная агрегация тромбоцитов при ТГ и в модели этой патологии

полученной из крови пациентов с ТГ, агрегация тромбоцитов отсутствовала (Рисунок 5.8, А). При использовании ристоцетина в качестве индуктора агрегации в контрольных образцах ОТП наблюдалась устойчивая агрегация тромбоцитов, составившая $82,7 \pm 4,4\%$, тогда как в образцах ОТП, проинкубированных с эптифибатидом, имела место спонтанно обратимая агрегация, составившая

$61,7 \pm 6,4 \%$. В образцах ОТП, приготовленных из крови пациентов с ТГ, ристоцетин также вызывал спонтанно обратимую агрегацию, составившую $63,3 \pm 5,2 \%$ (Рисунок 5.8, Б). Обращает на себя внимание высокое сходство формы агрегатограмм при использовании образцов нормальной ОТП, проинкубированной с эптифибатидом, и агрегатограмм при использовании ОТП, приготовленной из крови пациентов с ТГ.

3. Исследование состава цитоскелета тромбоцитов. Как известно, в процессе агрегации тромбоцитов их цитоскелет претерпевает значительную перестройку, включающую полимеризацию актина и ассоциацию с цитоскелетом интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и рецепторного комплекса GPIb-IX-V. В связи с этим для более полной верификации предложенной нами экспериментальной модели ТГ мы сравнили изменения в составе цитоскелета тромбоцитов в динамике их ристоцетин-индуцированной агрегации в модели ТГ и у пациентов с ТГ. Для этого спустя 1, 3 и 5 мин после индукции агрегации (Рисунок 5.8, Б) в образцы ОТП добавляли лизирующий буфер с Тритоном X-100. В образцы покоящихся тромбоцитов вместо ристоцетина добавляли соответствующее количество фосфатного буфера, а затем — того же лизирующего буфера. Далее из полученного лизата путем центрифугирования выделяли цитоскелетную фракцию (материал, не растворимый в лизирующем буфере с Тритоном X-100) и с помощью вестерн-блоттинга исследовали содержание в ней β -актина, интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и рецепторов GPIb-IX-V. О содержании указанных белков в цитоскелетной фракции судили по интенсивности соответствующих им полос на рентгеновской пленке. Интенсивность полос выражали в процентах от интенсивности аналогичных полос при 5-минутной агрегации контрольных тромбоцитов (100 %).

Проведенные исследования показали, что в покоящихся контрольных тромбоцитах цитоскелетная фракция содержала $68,9 \pm 8,4 \%$ β -актина, $3,7 \pm 2,6 \%$ αIIb и $3,6 \pm 2,4 \%$ GPIb (Рисунок 5.9). Ристоцетин-индуцированная агрегация контрольных (не обработанных эптифибатидом) тромбоцитов сопровождалась быстрым накоплением β -актина и GPIb в цитоскелетной фракции, так что их количество уже через 1 мин после стимуляции тромбоцитов не отличалось от 100 %, а также по-



ОТП, полученную из крови здоровых добровольцев, проинкубированной с эпифибатидом в конечной концентрации 25 мкг на 1 мл плазмы или с таким же объемом PBS (pH 7,4), а также в ОТП, полученную из крови пациентов с ТГ типа 1, стимулировали добавлением 1,5 мг/мл ристоцетина и вызвали агрегацию тромбоцитов, как представлено на Рисунке 5.7, Б. Через указанные промежутки времени образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100. Цитоскелетную (нерастворимую) фракцию выделяли и исследовали методом вестерн-блоттинга с использованием антител против β -актина, α IIb и GPIb. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов.

Рисунок 5.9 — Реорганизация цитоскелета тромбоцитов в динамике ристоцетин-индуцированной агрегации тромбоцитов при тромбастении Гланцмана

степенным накоплением α IIb, количество которого через 1 мин после стимуляции составило $73,6 \pm 10,1 \%$, а через 3 мин также не отличалось от 100 % (Рисунок 5.9). Ристоцетин-индуцированная агрегация в модели ТГ также сопровождалась быстрым накоплением в цитоскелете тромбоцитов β -актина, количество которого уже через 1 мин после стимуляции не отличалось от 100 %, однако в отличие от контроля агрегация этих тромбоцитов не сопровождалась ассоциацией α IIb с цитоскелетом ни в одной из временных точек, а ассоциация GPIb с цитоскелетом носила транзиторный характер — на 1-й минуте после стимуляции тромбоцитов содержание GPIb увеличивалась до $58,0 \pm 9,3 \%$, а затем на 3 и 5-й минуте снижалась до $9,4 \pm 8,8 \%$ и $12,6 \pm 6,7 \%$ соответственно.

В покое тромбоцитах, полученных от пациентов с ТГ, содержание β -актина составило $68,9 \pm 8,4 \%$, а через 1 и 3 мин после стимуляции ристоцетином не отличалось от такового при 5-минутной агрегации (100 %). Как и в случае нормальных тромбоцитов, обработанных эпифибатидом, ристоцетининдуцированная агрегация тромбоцитов от пациентов с ТГ сопровождалась транзиторной

ассоциацией GPIb с цитоскелетом через 1 мин после стимуляции тромбоцитов с последующим снижением ассоциации на 3 и 5-й минуте. Обнаружить α IIb в цитоскелете тромбоцитов, полученных от пациентов с ТГ, методом вестерн-блоттинга не удалось, что характерно для ТГ типа 1 (Рисунок 5.9).

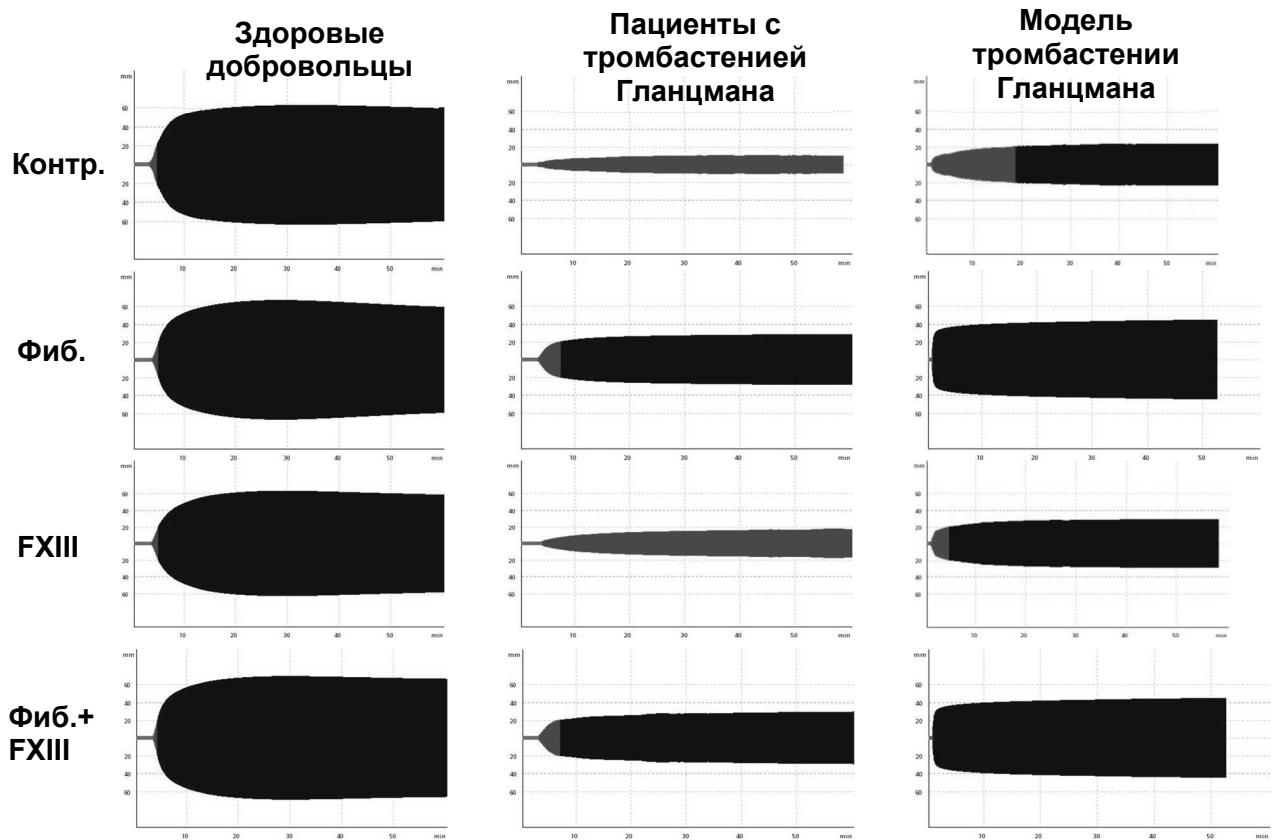
Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что инкубация цитратной крови или ОТП с 25 мкг/мл эптифибатида (на 1 мл плазмы крови) позволяет создать фенотип тромбоцитов схожий с таковым при ТГ, а следовательно, этот подход действительно может служить моделью ТГ *in vitro*. Эта модель была использована нами в дальнейших экспериментах.

5.3. Коррекция гемостатического потенциала крови при тромбастении Гланцмана в зависимости от уровня фибринолитической активности плазмы

Влияние концентратов фибриногена и FXIII на формирование гемостатического потенциала крови при ТГ остается во многом неизученным. В связи с этим мы изучили влияние указанных концентратов на формирование и фибринолитическую устойчивость кровяного сгустка у пациентов с ТГ и в модели этой патологии *in vitro*. В исследование вошел 21 пациент с ТГ типа 1 и 15 здоровых добровольцев, составивших группу контроля. Гемостатические препараты добавляли в кровь в следующих конечных концентрациях (на 1 мл плазмы): концентрат фибриногена — 3 мг/мл, концентрат FXIII — 2 МЕ/мл. Формирование кровяного сгустка исследовали методом ROTEM (тест EXTEM) и оценивали по следующим показателям тэмограммы: максимальная плотность сгустка (MCF, мм), площадь под кривой (AUC, мм $\times$ 100) и время начала лизиса сгустка (LOT, мин).

Коррекция формирования кровяного сгустка при тромбастении Гланцмана, не осложненной гиперфибринолизом

Репрезентативные тэмограммы здоровых добровольцев, пациентов с ТГ, а также тэмограммы в модели ТГ представлены на Рисунке 5.10.

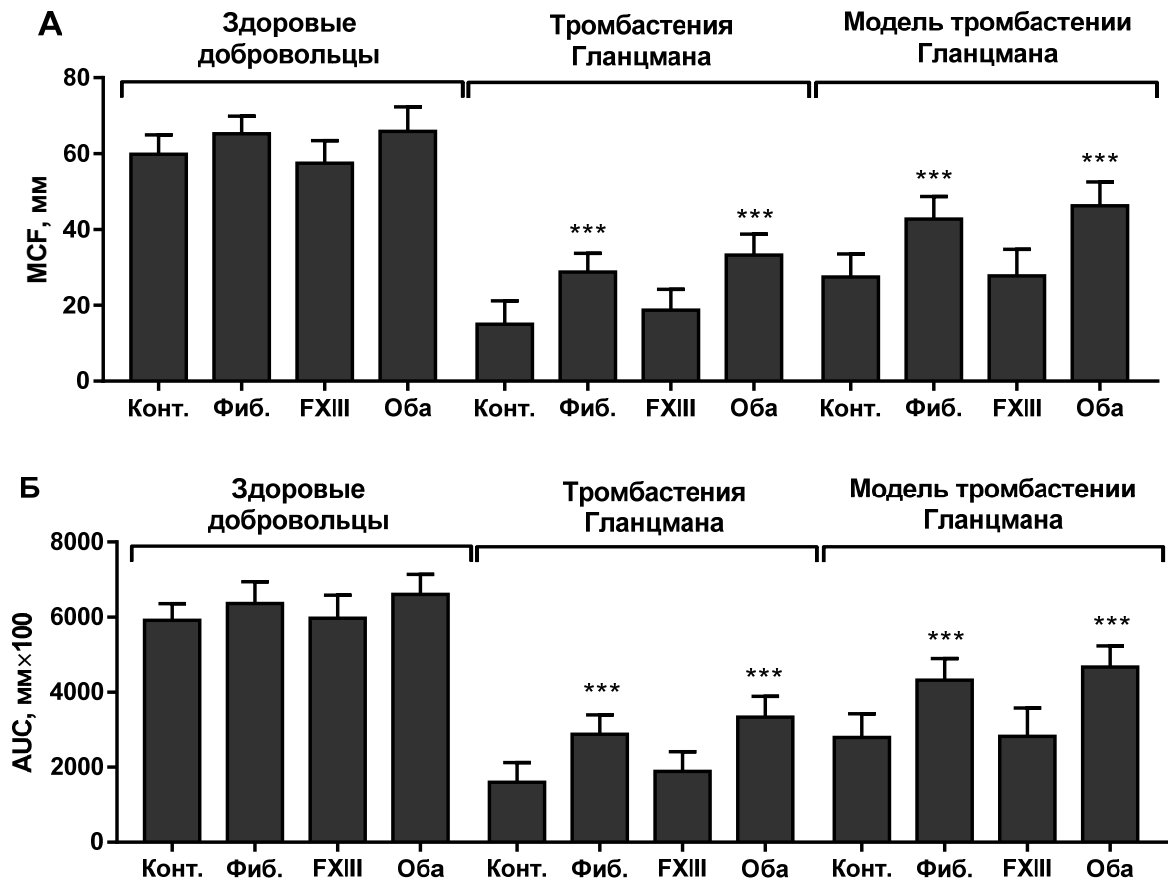


В цитратную кровь добавляли концентрат фибриногена (3 г/л) и/или FXIII (2 МЕ/мл). В контрольные образцы вместо указанных препаратов добавляли такой же объем PBS (pH 7,4). Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Представлены репрезентативные тэмограммы одного из восьми независимых экспериментов.

Рисунок 5.10 — Влияние концентрата фибриногена и FXIII на формирование кровяного сгустка у здоровых добровольцев и при тромбастении Гланцмана

MCF. В контрольных образцах крови, полученной от здоровых добровольцев, MCF составила $59,8 \pm 5,1$ мм. Добавление в кровь концентратов фибриногена и FXIII как по отдельности, так и одновременно не оказывало существенного влияния на данный показатель.

У пациентов с ТГ MCF была значительно ниже, чем у здоровых добровольцев, и составила $15,0 \pm 6,2$ мм. Добавление в их кровь концентрата фибриногена повышало MCF до $28,8 \pm 5,0$ мм ($P < 0,001$), тогда как добавление концентрата FXIII не оказало заметного влияния на этот показатель. При одновременном добавлении обоих препаратов значение MCF не отличалось от такового при добавлении концентрата фибриногена отдельно (Рисунок 5.11, А).



В цитратную кровь добавляли концентрат фибриногена (3 г/л) и/или FXIII (2 МЕ/мл). В контрольные образцы добавляли PBS (pH 7,4). Формирование кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Анализировали максимальную плотность сгустка (А) и площадь под кривой (Б). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 8$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака. *** $P < 0,001$ — сравнение с соответствующим контролем.

Рисунок 5.11 — Влияние фибриногена и FXIII на показатели формирования кровяного сгустка у здоровых добровольцев и при тромбастении Гланцмана

В модели ТГ MCF составила $27,5 \pm 6,0$ мм. Добавление концентрата фибриногена в этих условиях приводило к увеличению этого показателя до $43,1 \pm 6,0$ мм ($P < 0,001$), добавление концентрата FXIII не оказало заметного влияния на MCF, а одновременное добавление обоих препаратов вызывало такой же эффект, как и добавление концентрата фибриногена отдельно.

AUC. В контрольных образцах крови, полученной от здоровых добровольцев, AUC составила 5918 ± 439 мм $\times$ 100. Добавление в эту кровь концентратов фибриногена и FXIII как по отдельности, так и в комбинации не оказывало существенного влияния на данный показатель.

В крови пациентов с ТГ AUC была равна $1596 \pm 528 \text{ мм} \times 100$. Добавление в кровь пациентов концентрата фибриногена повышало данный показатель до $2877 \pm 516 \text{ мм} \times 100$ ($P < 0,001$), тогда как добавление концентрата FXIII не оказало на него заметного влияния. При одновременном добавлении этих препаратов в кровь пациентов значение AUC не отличалось от такового при добавлении концентрата фибриногена отдельно (Рисунок 5.11, Б).

В модели ТГ AUC составила $2789 \pm 633 \text{ мм} \times 100$. Добавление фибриногена в этих условиях приводило к увеличению AUC до $4317 \pm 580 \text{ мм} \times 100$ ($P < 0,001$), добавление XIII фактора не оказало на нее заметного влияния, а при одновременном добавлении обоих препаратов значение AUC не отличалось от такового при добавлении концентрата фибриногена отдельно.

Спонтанный лизис кровяного сгустка ни в крови, полученной от здоровых добровольцев, ни в крови, полученной от пациентов с ТГ, ни в крови, проинкубированной с эптифибатином, не наблюдался.

Таким образом, для ТГ характерно значительное снижение максимальной плотности кровяного сгустка и уменьшение площади под кривой. Добавление в кровь пациентов с ТГ концентрата фибриногена приводит к увеличению и максимальной плотности сгустка, и площади под кривой, тогда как добавление концентрата FXIII не оказывает влияния на эти показатели, а эффект от одновременного применения указанных препаратов не отличается от эффекта концентрата фибриногена отдельно. Аналогичные эффекты концентратов фибриногена и FXIII обнаруживаются и в разработанной нами модели ТГ *in vitro*.

Коррекция формирования кровяного сгустка при тромбастении

Гланцмана, осложненной гиперфибринолизом

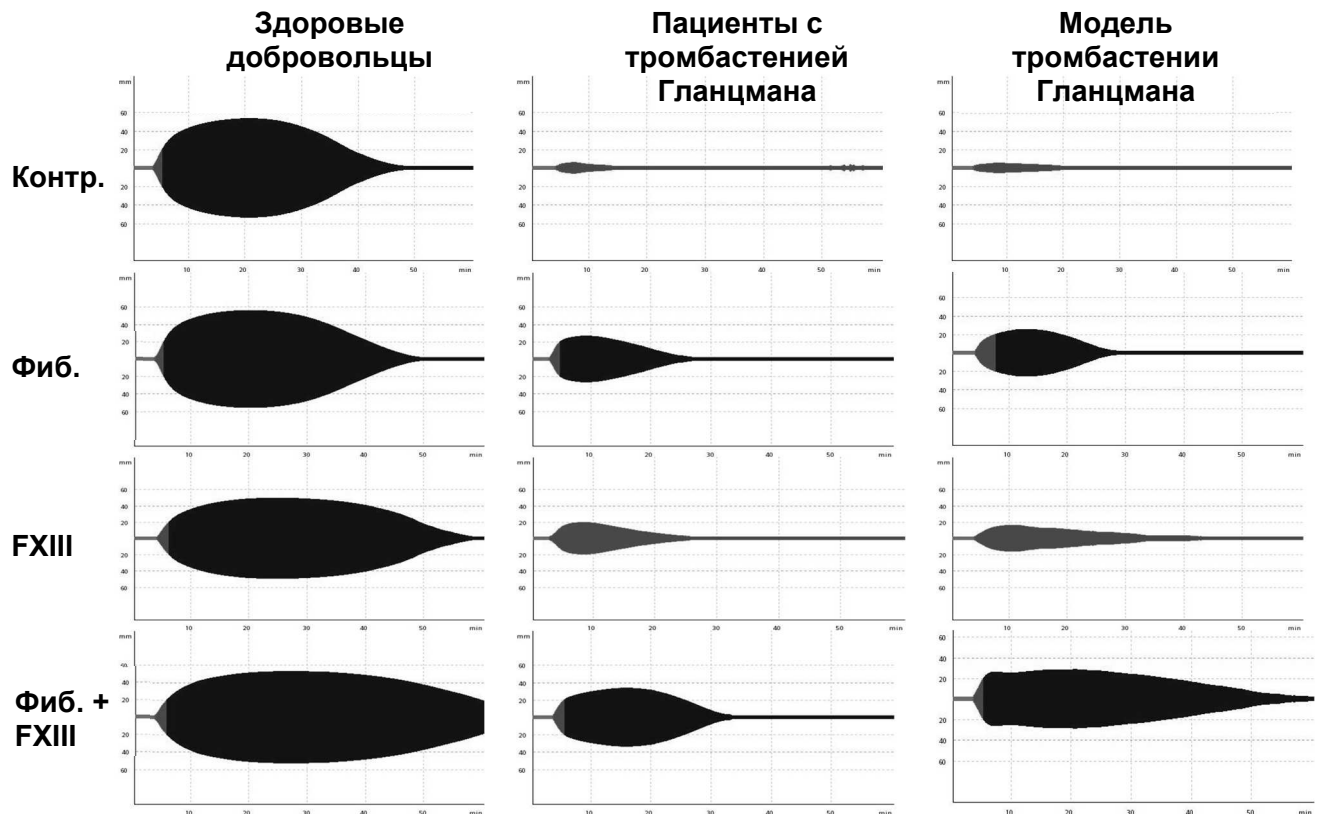
Гиперфибринолиз нередко осложняет нарушения гемостатического потенциала крови при острой массивной кровопотере. Во многом это обусловлено гипоперфузией тканей, системной активацией эндотелиальных клеток и высвобождением из них значительного количества tPA. Дополнительными факторами, способствующими развитию гиперфибринолиза при ТГ является дефицит и/или

дисфункцией интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и снижение генерации тромбина. Дефицит интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ обуславливает нарушение способности тромбоцитов генерировать и передавать контрактильную силу на структуры внеклеточного матрикса, включая нити фибрина, составляющие основу тромба или кровяного сгустка. Это приводит к нарушению ретракции сгустка, увеличению его пористости, проницаемости и подверженности лизису. Снижение генерации тромбина в свою очередь приводит к замедлению превращения фибриногена в фибрин, так что образуется фибриновая сеть, состоящая из толстых, слабо переплетенных нитей фибрина, отличающаяся повышенной подверженностью лизису.

В связи с этим мы поставили перед собой задачу установить возможность коррекции гемостатического потенциала крови при ТГ, осложненной гиперфибринолизом. Для этого мы провели дополнительную серию экспериментов, в которой исследовали влияние фибриногена и FXIII на формирование и лизис кровяного сгустка в крови, полученной от пациентов с ТГ, а также в модели этой патологии *in vitro* в условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза. Во избежание преждевременной генерации плазмина и фибриногенолиза, tPA добавляли в кровь после добавления гемостатических препаратов, непосредственно перед индукцией свертывания. Репрезентативные тэмограммы здоровых добровольцев, пациентов с ТГ, также тэмограммы в модели ТГ в условиях гиперфибринолиза, представлены на Рисунке 5.12.

МСФ. Индукция фибринолиза в контрольных образцах, полученных от здоровых добровольцев, приводила к снижению МСФ до $35,5 \pm 6,6$ мм по сравнению с таковой в интактной крови ($P < 0,001$). Добавление концентратов фибриногена и FXIII по отдельности повышало значение этого показателя до $47,9 \pm 5,7$ мм и $50,3 \pm 4,6$ мм соответственно ($P < 0,001$ для обоих сравнений). Одновременное добавление этих препаратов не приводило к дополнительному увеличению МСФ.

Индукция фибринолиза в крови, полученной от пациентов с ТГ, приводила к снижению МСФ до $9,6 \pm 3,9$ мм по сравнению с таковой в крови пациентов в отсутствие гиперфибринолиза ($P = 0,056$). Добавление в кровь концентрата фибриногена повышало значение этого показателя до $22,9 \pm 3,0$ мм ($P < 0,001$). В то же

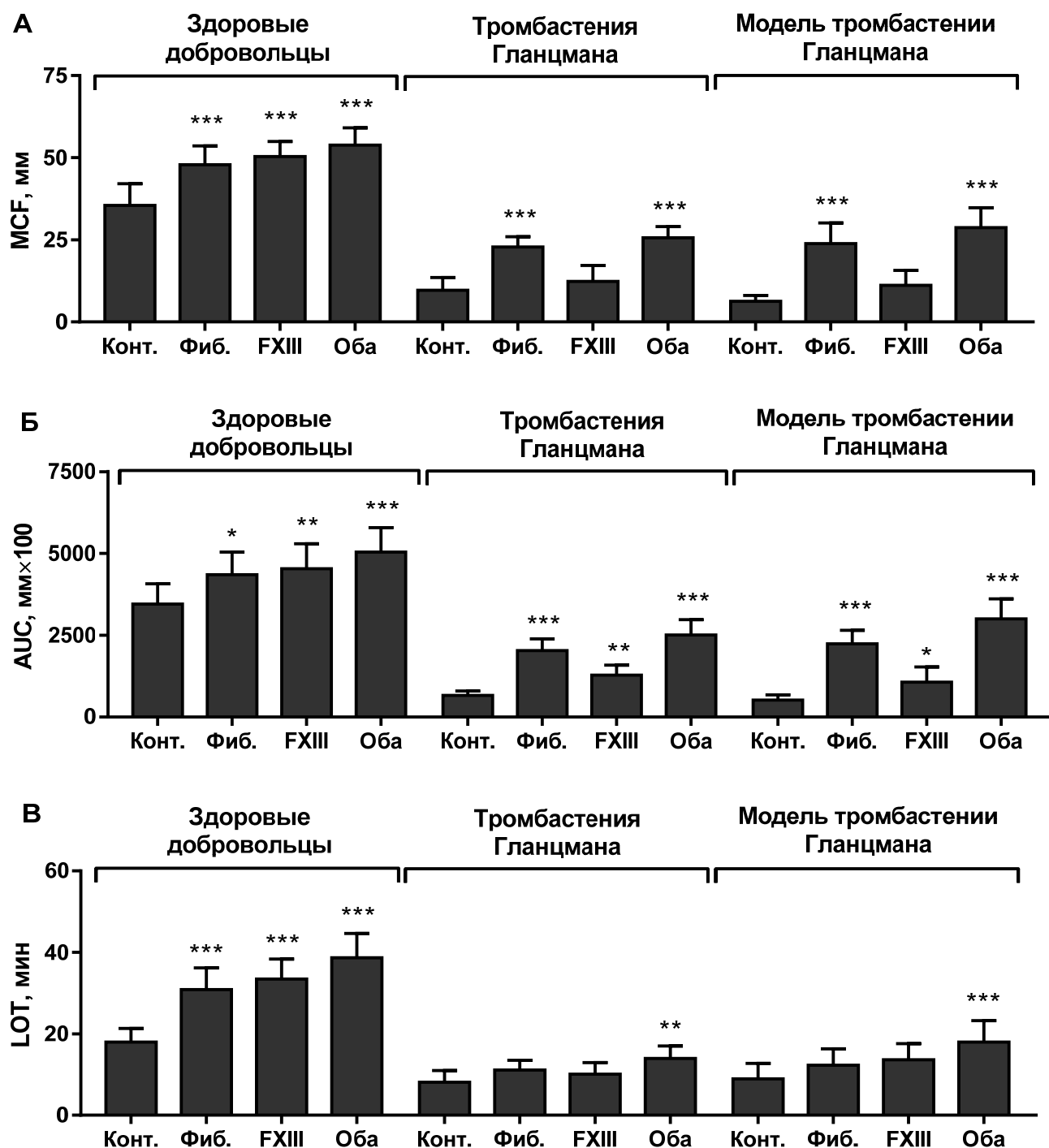


В цитратную кровь добавляли концентрат фибриногена (3 г/л) и/или FXIII (2 МЕ/мл). В контрольные образцы вместо указанных препаратов добавляли такой же объем фосфатного буфера (рН 7,4). Фибринолиз индуцировали добавлением 150 МЕ/мл tPA. Формирование и лизис кровяного сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Представлены репрезентативные тэмограммы одного из восьми независимых экспериментов.

Рисунок 5.12 — Влияние фибриногена и FXIII на формирование кровяного сгустка в условиях гиперфибринолиза у здоровых добровольцев и при тромбастении Гланцмана

время добавление концентрата FXIII не оказывало заметного влияния на данный параметр. При одновременном добавлении в кровь концентратов фибриногена и FXIII значение MCF составило $25,6 \pm 3,4$ мм, что статистически значимо не отличалось от значения этого показателя при добавлении концентрата фибриногена отдельно ($P = 0,494$) (Рисунок 5.13, А).

Схожие результаты были получены и в модели ТГ. Индукция фибринолиза приводила к снижению MCF до $6,3 \pm 1,8$ мм по сравнению с ее значением в этой модели в отсутствие гиперфибринолиза ($P < 0,001$). При добавлении концентрата фибриногена этот показатель повышался до $23,9 \pm 6,2$ мм ($P < 0,001$), тогда как добавление концентрата FXIII не оказывало на него заметного влияния. При



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

Рисунок 5.13 — Влияние фибриногена и FXIII на формирование и лизис кровяного сгустка у здоровых добровольцев и при тромбастении Гланцмана в условиях гиперфибринолиза

одновременном добавлении этих препаратов MCF составил $28,7 \pm 6,1$ мм, что статистически значимо не отличалось от такового при добавлении концентрата фибриногена отдельно ($P = 0,157$).

AUC. Индукция фибринолиза в контрольных образцах крови, полученных от здоровых добровольцев, приводила к снижению AUC до 3448 ± 622 мм $\times$ 100. Добавление концентратов фибриногена и FXIII приводило к повышению этого показателя до 4346 ± 693 мм $\times$ 100 ($P = 0,036$) и 4529 ± 764 мм $\times$ 100 ($P = 0,008$) соответственно. При одновременном добавлении этих препаратов значение AUC не отличалось от такового при добавлении каждого из них по отдельности.

Индукция фибринолиза в крови, полученной от пациентов с ТГ, вызывала снижение AUC до 662 ± 139 мм $\times$ 100 по сравнению с таковой в крови пациентов в отсутствие гиперфибринолиза ($P < 0,001$). Добавление концентрата фибриногена повышало AUC до 2030 ± 362 мм $\times$ 100 ($P < 0,001$). Менее выраженное, но статистически значимое повышение этого показателя отмечалось при добавлении концентрата FXIII — до 1285 ± 298 мм $\times$ 100 ($P = 0,005$). При одновременном добавлении этих препаратов AUC еще больше возрастала и достигала 2507 ± 466 мм $\times$ 100, что статистически значимо превышало ее значение при добавлении концентратов фибриногена и FXIII по отдельности ($P = 0,040$ и $P < 0,001$ соответственно) (Рисунок 5.13, Б).

При индукции фибринолиза в модели ТГ AUC составила 517 ± 162 мм $\times$ 100, что было статистически значимо меньше, чем в отсутствие гиперфибринолиза ($P < 0,001$). Добавление концентрата фибриногена в этих условиях приводило к увеличению AUC до 2240 ± 410 мм $\times$ 100 ($P < 0,001$). Менее выраженная коррекция этого показателя наблюдалась при добавлении концентрата FXIII, при котором AUC увеличивалась до 1068 ± 462 мм $\times$ 100 ($P = 0,040$). При одновременном добавлении обоих концентратов AUC еще больше возрастала и составляла 2997 ± 613 мм $\times$ 100, превышая ее значение при использовании концентрата фибриногена отдельно ($P = 0,003$).

LOT. В цельной крови, полученной от здоровых добровольцев, в условиях фибринолиза LOT составило $18,0 \pm 3,4$ мин. Добавление концентратов фибрино-

гена и FXIII по отдельности LOT увеличивалось до $30,8 \pm 5,3$ мин и $33,4 \pm 4,9$ мин соответственно ($P < 0,001$ для обоих сравнений). Эффект от одновременного добавления в кровь этих препаратов не отличался от такового при добавлении концентрата FXIII отдельно ($P = 0,107$).

В образцах, полученных от пациентов с ТГ, LOT было равно $8,1 \pm 2,9$ мин. При добавлении в кровь концентратов фибриногена и FXIII по отдельности LOT статистически значимо не отличалось от исходного уровня ($P = 0,173$ и $P = 0,506$ соответственно). Однако при одновременном добавлении этих препаратов отмечалось увеличение LOT до $13,9 \pm 3,1$ мин ($P = 0,002$) (Рисунок 5.13, В).

В модели ТГ LOT составило $8,9 \pm 3,8$ мин. При добавлении фибриногена и FXIII по отдельности LOT не претерпевало значимых изменений ($P = 0,307$ и $P = 0,083$ соответственно), однако при их одновременном добавлении этот показатель возрастал до $18,0 \pm 5,3$ мин ($P < 0,001$).

Таким образом, индукция гиперфибринолиза при ТГ приводит к снижению максимальной плотности сгустка и площади под кривой. Добавление в кровь концентрата фибриногена вызывает увеличение этих показателей, не влияя на время начала лизиса сгустка. Добавление концентрата FXIII увеличивает площадь под кривой, хотя и не оказывает заметного влияния на максимальную плотность сгустка и время начала лизиса. Одновременное применение указанных препаратов вызывает синергетический эффект, выражающийся в еще большем увеличении площади под кривой, чем при их использовании по отдельности, а также в отдалении времени начала лизиса сгустка. Схожие эффекты были обнаружены и при использовании указанных препаратов в модели ТГ.

* * *

В целом результаты данного раздела работы показали, что для ТГ характерно значительное снижение максимальной плотности кровяного сгустка и уменьшение площади по кривой. Активация фибринолиза в крови пациентов с ТГ потенцирует вышеуказанные нарушения. Обобщая результаты исследования возможности коррекции формирования кровяного сгустка при ТГ с помощью концентратов фибриногена и FXIII можно заключить следующее:

1. Концентрат фибриногена как при отсутствии, так и при наличии гиперфибринолиза обеспечивает увеличение максимальной плотности кровяного сгустка и площади под кривой, но не влияет на время начала лизиса сгустка в условиях гиперфибринолиза.
2. Концентрат FXIII при отсутствии гиперфибринолиза не оказывает влияния ни на максимальную плотность сгустка, ни на площадь под кривой, а в условиях гиперфибринолиза вызывает увеличение площади под кривой, не влияя при этом на максимальную плотность сгустка и время начала его лизиса.
3. Одновременное применение концентратов фибриногена и FXIII при отсутствии гиперфибринолиза вызывает такой же эффект, как и применение концентрата фибриногена отдельно. При гиперфибринолизе комбинация указанных препаратов способствует дополнительному увеличению площади под кривой и отдалению времени начала лизиса сгустка (чем при их использовании по отдельности), не вызывая при этом дополнительной коррекции максимальной плотности сгустка, по сравнению с таковой при использовании концентрата фибриногена отдельно.
4. Эффекты применения концентратов фибриногена и FXIII, обнаруженные в крови пациентов с ТГ совпадают с таковыми в разработанной нами модели этой патологии.

Таким образом, при отсутствии гиперфибринолиза для коррекции формирования кровяного сгустка у пациентов с ТГ целесообразно использовать концентрат фибриногена; использование же концентрата FXIII в этих условиях не вызывает значимого корригирующего эффекта. При наличии гиперфибринолиза для коррекции формирования кровяного сгустка у пациентов с ТГ целесообразно использовать комбинацию вышеуказанных препаратов, что позволяет одновременно достичь коррекции и формирования кровяного сгустка, и его фибринолитической устойчивости; использование концентратов фибриногена и FXIII по отдельности не позволяет достичь коррекции фибринолитической устойчивости кровяного сгустка. Следовательно, при выборе гемостатического препарата (концентрата фибриногена и/или концентрата FXIII) для коррекции формирования кровяного

сгустка при ТГ необходимо учитывать выраженность фибринолитической активности плазмы.

5.4. Стимуляция тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с G-белком, как способ коррекции формирования кровяного сгустка в модели тромбастении Гланцмана

Как было отмечено ранее, снижение гемостатического потенциала при ТГ обусловлено не только нарушением адгезии и агрегации тромбоцитов и ретракции кровяного сгустка, т. е. функций, напрямую зависящих от взаимодействия интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ с фибриногеном, фибрином и другими лигандами, но и нарушением прокоагулянтной активности тромбоцитов, проявляющимся в снижении генерации тромбина, необходимого для формирования фибриновой сети. Тем не менее существующие на данный момент методы экстренной коррекции гемостатического потенциала при ТГ сводятся преимущественно к переливанию тромбоцитарного концентрата и введению концентратов факторов свертывания и/или антифибринолитиков. Методы, направленные на усиление прокоагулянтных свойств самих тромбоцитов, на сегодняшний день отсутствуют.

Исследования последних лет указывают на то, что активированные тромбоциты образуют как минимум две фенотипически различные субпопуляции: агрегирующие тромбоциты и прокоагулянтные (сверхактивированные, «укутанные») тромбоциты. Агрегирующие тромбоциты адгезируют к поврежденной сосудистой стенке, агрегируют друг с другом, формируя основу тромбоцитарной пробки. Функция этих тромбоцитов существенно зависит от наличия на их мембране интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Прокоагулянтные тромбоциты отличаются высоким содержанием фосфатидилсерина, необходимого для сборки теназных и протромбиназного комплексов и генерации тромбина. Важной особенностью прокоагулянтных тромбоцитов является инактивация интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ и неспособность образовывать агрегаты, что делает их в этом схожими с тромбоцитами при ТГ. Одним из основных факторов, определяющих фенотип активированных тромбоцитов, является степень их активации. Чем сильнее активирующий стимул, тем меньше

доля агрегирующих и больше доля прокоагулянтных тромбоцитов. В связи с этим мы предположили, что, дополнительно стимулируя тромбоциты при ТГ, можно увеличивать долю прокоагулянтных тромбоцитов и тем самым способствовать генерации большего количества тромбина, что в конечном счете должно приводить к увеличению плотности фибриновой сети и усилению гемостатического потенциала при этой патологии.

Для проверки данного предположения мы изучили возможность коррекции формирования кровяного сгустка в модели ТГ *in vitro* путем дополнительной стимуляции тромбоцитов растворимыми агонистами, действующими через рецепторы, сопряженные с гетеротримерными G-белками. В частности, цитратную кровь, полученную от здоровых добровольцев, инкубировали с эпitifибатидом в конечной концентрации 25 мкг на 1 мл плазмы, а также с определенными ингибиторами функций тромбоцитов (или соответствующими растворителями). Обработанную кровь помещали в кюветы ротационного тромбоэластометра (ROTEM) и добавляли в нее определенные тромбоцитарные агонисты. В контрольные образцы вместо агонистов добавляли соответствующий объем PBS (pH 7,4). Поскольку перед нами стояла задача установить, можно ли в принципе улучшить формирование кровяного сгустка при ТГ путем дополнительной стимуляции тромбоцитов с помощью растворимых агонистов, в данной серии экспериментов сравнение показателей формирования сгустка в модели ТГ с таковыми в нормальной крови не проводили. Во избежание избыточной активации коагуляционного каскада и для лучшего раскрытия эффектов дополнительной стимуляции G-белков с помощью растворимых тромбоцитарных агонистов, свертывание индуцировали путем рекальцификации крови без добавления тканевого фактора (тест NATeM). Формирование кровяного сгустка оценивали по следующим показателям тэмограммы: время свертывания (СТ, с), угол альфа (αA , градусы) и максимальная плотность сгустка (MCF, мм).

Для селективной и сочетанной активации определенных G-белков мы использовали следующие комбинации тромбоцитарных агонистов и ингибиторов:

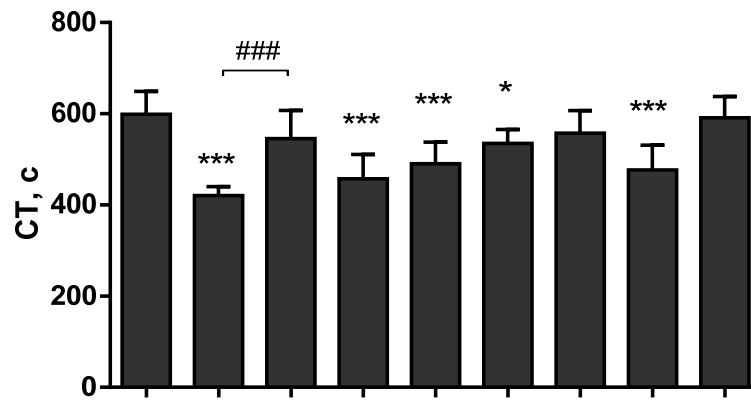
- Для активации $G_{\alpha q}$ ОТП инкубировали с AR-C66096 (высокоселективный антагонист рецептора $P2Y_{12}$) и стимулировали с помощью АДФ. В этих условиях АДФ может взаимодействовать только с рецептором $P2Y_1$, сопряженным с $G_{\alpha q}$ (Таблица 5.2).
- Для активации $G_{\alpha i}$ ОТП инкубировали с MRS2500 (высокоселективный антагонист рецептора $P2Y_1$) и стимулировали с помощью АДФ. В этих условиях АДФ взаимодействует только с рецептором $P2Y_{12}$, сопряженным с $G_{\alpha i}$.
- Для активации $G_{\alpha 12/13}$ тромбоциты стимулировали с помощью 0,1 мкМ U46619 (стабильного аналога TXA_2), действующего через рецептор TP, сопряженный с $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha 12/13}$. В использованной концентрации U46619 вызывает активацию только $G_{\alpha 12/13}$.
- Для сочетанной активации $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha i}$ тромбоциты стимулировали с помощью АДФ (без преинкубации с антагонистами рецепторов $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$).
- Для сочетанной активации $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha 12/13}$ тромбоциты стимулировали с помощью 1,5 мкМ U46619. В этой концентрации U46619 вызывает активацию обоих G-белков с которыми сопряжен рецептор TP.
- Для сочетанной активации всех трех G-белков — $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ и $G_{\alpha 12/13}$ — тромбоциты стимулировали с помощью 50 мкМ TRAP (thrombin receptor-activating peptide; пептид, активирующий рецептор тромбина), действующего через рецептор PAR-1, сопряженный с $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ и $G_{\alpha 12/13}$, и PAR-4, сопряженный с $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha 12/13}$.

Таблица 5.2 — Фармакологические подходы для активации определенных G-белков

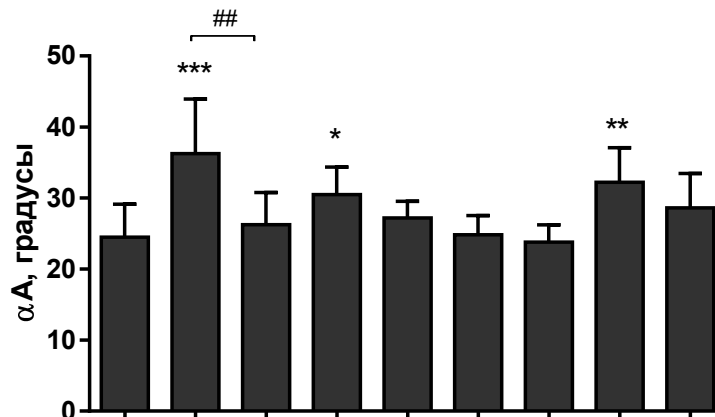
Семейство G-белков	Способ активации	
	Агонист	Ингибитор
$G_{\alpha q}$	1,25 мкМ АДФ	10 мкМ AR-C66096
$G_{\alpha 12/13}$	0,1 мкМ U46619	—
$G_{\alpha i}$	1,25 мкМ АДФ	10 мкМ AR-C66096
$G_{\alpha q} + G_{\alpha i}$	10 мкМ АДФ	+/- АСК
$G_{\alpha q} + G_{\alpha 12/13}$	1,5 мкМ U46619	—
$G_{\alpha q} + G_{\alpha i} + G_{\alpha 12/13}$	50 мкМ TRAP	+/- АСК

СТ. В контрольных образцах СТ составило 599 ± 50 с. Дополнительная сочетанная активация представителей всех трех семейств G-белков — $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ и $G_{\alpha 12/13}$ — с помощью TRAP, а также сочетанная активация $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha i}$ с помощью АДФ приводила к сокращению СТ до 421 ± 20 с и 458 ± 53 с соответственно ($P < 0,001$ для обоих сравнений) (Рисунок 5.14, А). Для выявления возможного участия ТХА2 в качестве посредника обнаруженных эффектов мы повторили стимуляцию тромбоцитов с помощью тех же агонистов после предварительной инкубации ОТП с ацетилсалициловой кислотой (АСК). Преинкубация с АСК приводила к отмене вышеуказанного эффекта TRAP, так что СТ статистически значимо не отличалось от его значения в контроле ($P = 0,209$), но не препятствовала реализации стимулирующего действия АДФ ($P = 0,788$, сравнение с АДФ без АСК). Сочетанная активация $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha 12/13}$ с помощью 1,5 мкМ U46619 приводила к сокращению СТ до 477 ± 55 с ($P < 0,001$). Активация $G_{\alpha i}$ путем стимуляции тромбоцитов с помощью АДФ в присутствии AR-C66096 приводила к сокращению СТ до 535 ± 31 с ($P = 0,039$), тогда как активация $G_{\alpha q}$ с помощью АДФ в присутствии MRS2500 или $G_{\alpha 12/13}$ с помощью 0,1 мкМ U46619 не приводила к заметному изменению СТ ($P = 0,468$ и $P > 0,999$ соответственно).

αA . В контрольных образцах восстановленной крови αA составил $24,5 \pm 4,6^\circ$. Сочетанная активация $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ и $G_{\alpha 12/13}$ с помощью TRAP вызывала увеличение этого показателя до $36,3 \pm 7,7^\circ$ ($P < 0,001$) (Рисунок 5.14, Б). Преинкубация с АСК полностью отменяла стимулирующий эффект TRAP, в результате чего αA составил $26,3 \pm 4,5^\circ$ ($P = 0,997$, сравнение с контролем). Сочетанная активация $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha i}$ с помощью АДФ приводила к увеличению αA до $30,5 \pm 3,8^\circ$ ($P = 0,033$). Как и в случае с TRAP, преинкубация с АСК отменяла стимулирующий эффект АДФ, так что αA составил $27,2 \pm 2,3^\circ$ ($P = 0,875$, сравнение с контролем). Сочетанная активация $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha 12/13}$ приводила к увеличению этого показателя до $32,2 \pm 4,9^\circ$ ($P = 0,002$). Селективная дополнительная активация $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ или $G_{\alpha 12/13}$ не вызывала статистически значимого изменения αA ($P > 0,999$, $P > 0,999$ и $P = 0,359$ соответственно).

А

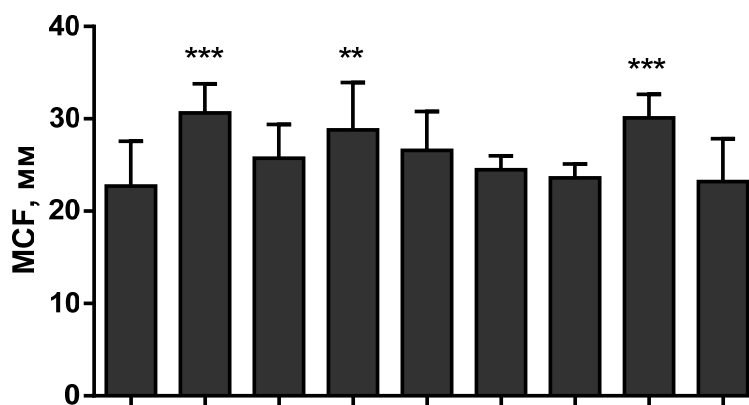
Ингибиторы	ACK	-	-	+	-	+	-	-	-
	AR-C	-	-	-	-	-	-	+	-
	MRS	-	-	-	-	-	+	-	-
Агонисты	TRAP	-	+	+	-	-	-	-	-
	АДФ	-	-	-	+	+	+	+	-
	U46619, 1,5 мкМ	-	-	-	-	-	-	+	-
	U46619, 0,1 мкМ	-	-	-	-	-	-	-	+
Семейство G-белков	12/13		v	v				v	v
	q		v	v	v	v		v	
	i		v	v	v	v	v		

Б

Ингибиторы	ACK	-	-	+	-	+	-	-	-
	AR-C	-	-	-	-	-	-	+	-
	MRS	-	-	-	-	-	+	-	-
Агонисты	TRAP	-	+	+	-	-	-	-	-
	АДФ	-	-	-	+	+	+	+	-
	U46619, 1,5 мкМ	-	-	-	-	-	-	+	-
	U46619, 0,1 мкМ	-	-	-	-	-	-	-	+
Семейство G-белков	12/13		v	v				v	v
	q		v	v	v	v		v	
	i		v	v	v	v	v		

Рисунок 5.14 — Влияние активации G-белков на формирование кровяного сгустка в модели тромбастении Гланцмана
(продолжение рисунка на следующей странице)

B



Ингибиторы	ACK	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	AR-C	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	MRS	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Агонисты	TRAP	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	АДФ	-	-	-	+	+	+	+	-	-
	U46619, 1,5 мкМ	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	U46619, 0,1 мкМ	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Семейство G-белков	12/13		v	v					v	v
	q		v	v	v	v		v	v	
	i		v	v	v	v	v			

Цитратную кровь, полученную от здоровых добровольцев, инкубированной с 25 мкг/мл эптифибатида в течение 20 мин, а затем — с 10 мкмоль/л MRS2500, 10 мкмоль/л AR-C66096 и/или 0,5 ммоль/л АСК (или соответствующим растворителем) в течение 20 мин при комнатной температуре. Далее в кровь добавляли активаторы тромбоцитов: 50 мкмоль/л TRAP, 1,25 мкмоль/л АДФ, 0,1 или 1,5 мкмоль/л U46619, — и сразу начинали регистрировать формирование кровяного сгустка методом ROTEM (тест NATEM). Все концентрации даны в пересчете на 1 мл плазмы. Оценивали время свертывания (А), угол альфа (Б) и максимальную плотность сгустка (В). Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n = 10$). Сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного критерия Шидака. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$ — сравнение с покоящимися тромбоцитами. $^{##}P < 0,01$, $^{###}P < 0,001$ — сравнение между образцами, проинкубированными и не проинкубированными с АСК.

Рисунок 5.14 — Влияние активации G-белков на формирование кровяного сгустка в модели тромбастении Гланцмана
(продолжение)

МСФ. В контрольных образцах МСФ составила $22,7 \pm 4,9$ мм. Сочетанная активация Gαq, Gαi и Gα12/13 с помощью TRAP и сочетанная активация Gαq и Gαi с помощью АДФ вызывала увеличение этого показателя до $30,6 \pm 3,2$ мм ($P < 0,001$) и $28,8 \pm 5,1$ мм ($P = 0,005$) соответственно (Рисунок 5.14, В). Преинкубация с АСК полностью отменяла их стимулирующий эффект, так что значение МСФ не отличалось от такового в контроле ($P = 0,997$ и $P = 0,875$ соответственно). Сочетанная

активация $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha 12/13}$ приводила к увеличению этого показателя до $30,1 \pm 2,6$ мм ($P < 0,001$). Селективная активация $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ или $G_{\alpha 12/13}$ не вызывала статистически значимого изменения MCF ($P > 0,999$, $P = 0,974$ и $P > 0,999$ соответственно).

Таким образом, исследование возможностей коррекции формирования кровяного сгустка в модели ТГ путем дополнительной активации G-белков показало:

1. Сочетанная активация $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ и $G_{\alpha 12/13}$ тромбоцитов с помощью TRAP способствует формированию кровяного сгустка, что выражается в укорочении времени свертывания (времени, необходимого для генерации тромбина), увеличении угла альфа (ускорении начального этапа формирования сгустка) и увеличении максимальной плотности сгустка. Реализация этого эффекта существенно зависит от синтеза TXA_2 , поскольку ингибирование его синтеза полностью отменяет данный эффект.
2. Эффект сочетанной активации $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha i}$ с помощью АДФ схож с эффектом сочетанной активации $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ и $G_{\alpha 12/13}$ с помощью TRAP, однако эффект АДФ в меньшей степени зависит от синтеза TXA_2 , чем эффект TRAP. Ингибирование его синтеза препятствует ускорению начального этапа формирования сгустка и увеличению его плотности, но не отменяет сокращение времени, необходимого для генерации тромбина и старта формирования сгустка.
3. Эффект сочетанной активации $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha 12/13}$ с помощью стабильного аналога TXA_2 (U46619) схож с эффектом сочетанной активации $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ и $G_{\alpha 12/13}$ с помощью TRAP и эффектом сочетанной активации $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha i}$ с помощью АДФ.
4. Селективная активация $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ или $G_{\alpha 12/13}$ не вызывает существенной стимуляции формирования кровяного сгустка в модели ТГ.
5. Поскольку эффект усиления формирования кровяного сгустка, связанный с дополнительной стимуляцией рецепторов, сопряженных с G-белком, происходит в условиях блокады интегринов $\alpha IIb\beta 3$, реализация этого эффекта не требует сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha IIb\beta 3$.

Глава 6

Нарушение гемостатического потенциала крови при использовании препаратов для антитромбоцитарной терапии

Назначение ДАТТ является одним из ключевых направлений патогенетической терапии при артериальных тромбозах. Этот подход достоверно снижает сердечно-сосудистый риск, но в то же время повышает риск развития геморрагических событий (в т. ч. больших кровотечений). Последнее обусловлено избыточным угнетением функциональной активности тромбоцитов под влиянием антитромбоцитарных препаратов. Поскольку одним из необходимых условий для эффективной адгезии и агрегации тромбоцитов, а также для ретракции кровяного сгустка является формирование в них комплекса «лиганд–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет», можно предположить, что нарушение формирования этого комплекса является вероятным механизмом снижения гемостатического потенциала крови на фоне ДАТТ. В связи с вышеизложенным в настоящем разделе нашей работы мы изучили закономерности формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет», а также влияние на этот процесс ингибиторов функций тромбоцитов — АСК и антагонистов рецепторов P2Y_1 и P2Y_{12} .

6.1. Закономерности формирования комплекса

«фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» в тромбоцитах

Формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» в тромбоцитах исследовали в два этапа: сначала оценивали ассоциацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом, затем — с фибриногеном.

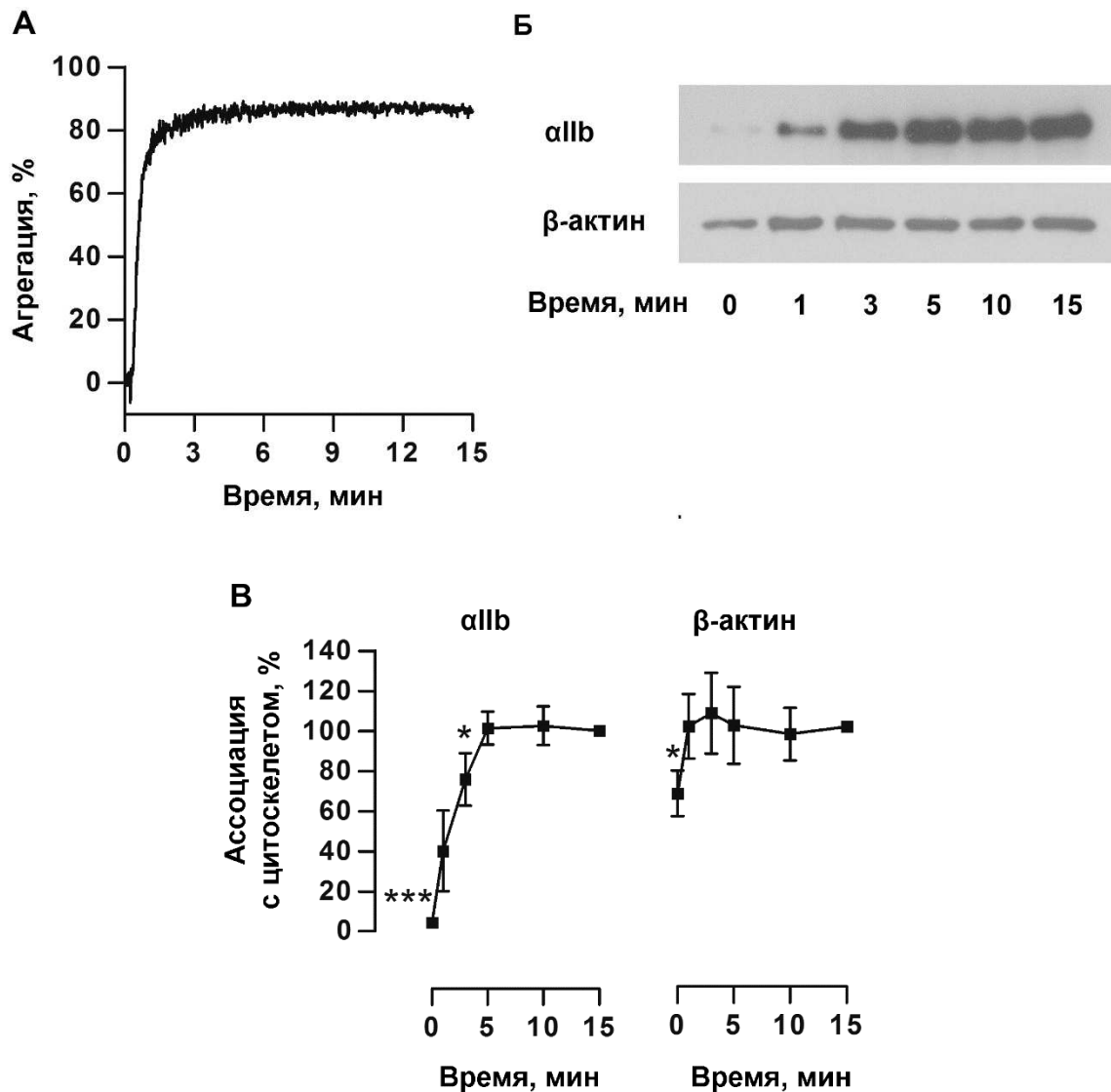
Для исследования ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом в образцы ОТП добавляли лизирующий буфер, содержащий детергент Тритон X-100. Этот детергент растворяет цитоплазматическую мембрану тромбоцитов, не влияя на структуры цитоскелета и ассоциированные с ним белки. Полученный лизат тромбоцитов путем центрифугирования разделяли на две фракции: осажденный материал, представляющий собой не растворимую в Тритоне X-100 фракцию,

содержащую цитоскелет и связанные с ним белки (в т. ч. β -актин и интегрины $\alpha\text{IIb}\beta 3$), и супернатант, представляющий собой растворимую в Тритоне X-100 фракцию, содержащую не связанные с цитоскелетом белки тромбоцитов (а также белки плазмы). Затем не растворимую в Тритоне X-100 фракцию (цитоскелетную фракцию) исследовали методом вестерн-блоттинга на предмет содержания β -актина (основного компонента цитоскелета тромбоцитов) и интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$.

Для исследования ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с фибриногеном мы использовали эптифибатид, который добавляли в ОТП после индукции агрегации тромбоцитов. Благодаря небольшому размеру молекулы и высокому сродству к интегрину $\alpha\text{IIb}\beta 3$ эптифибатид способен вытеснять фибриноген из связи с этим рецептором, вызывая тем самым дезагрегацию тромбоцитов. Поэтому о прочности связи между интегринными $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном судили по скорости эптифибатидиндуцированной дезагрегации тромбоцитов.

Временная динамика формирования комплекса «фибриноген– интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет»

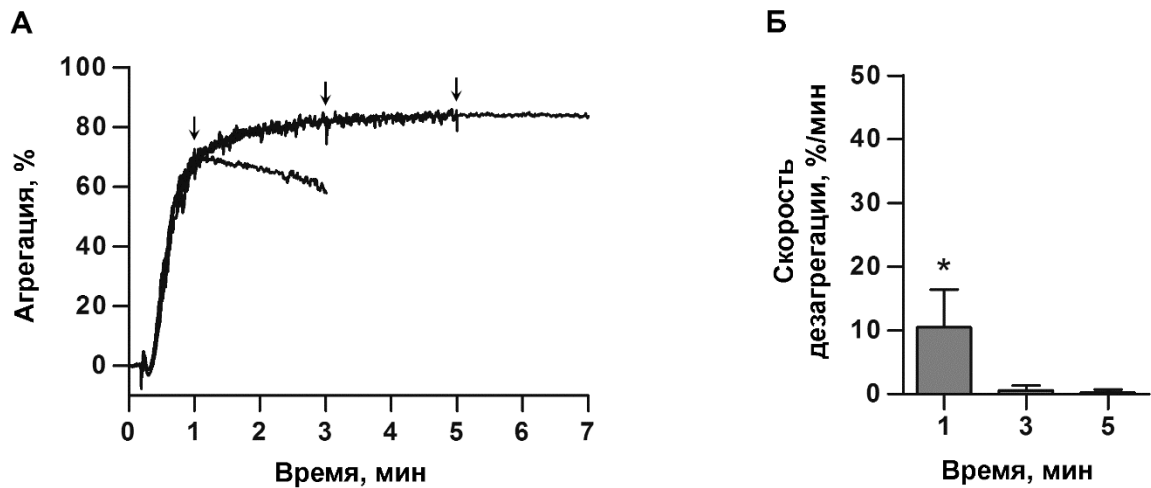
Для исследования временной динамики формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» агрегацию тромбоцитов индуцировали с помощью 25 мкМ TRAP. Добавление TRAP в ОТП вызывало агрегацию тромбоцитов, которую наблюдали в течение 15 мин. Максимальная амплитуда агрегации составила $84,1 \pm 7,2$ % (Рисунок 6.1, А). В параллельных экспериментах через 1, 3, 5, 10 и 15 мин после добавления TRAP агрегацию тромбоцитов останавливали добавлением лизирующего буфера с Тритоном X-100. В образцы покоящихся тромбоцитов (контроль) вместо TRAP добавляли соответствующее количество PBS, после чего содержащиеся в них тромбоциты лизировали добавлением того же буфера. Затем из полученного лизата выделяли цитоскелетную фракцию и методом вестерн-блоттинга исследовали содержание в ней β -актина и интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$. О содержании указанных белков судили по интенсивности соответствующих им полос на рентгеновской пленке, которую выражали в процентах от интенсивности аналогичных полос при 15-минутной агрегации тромбоцитов. Было установлено,



А. Тромбоциты стимулировали добавлением в ОТП 25 мкМ TRAP. Представлена агрегатограмма одного из четырех независимых экспериментов. Б. В параллельных экспериментах образцы лизировали через указанные промежутки времени добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимые фракции выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β -актина и αIIb . Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов. В. Ассоциацию β -актина и αIIb с цитоскелетом выражали в процентах от таковой на 15-й минуте агрегации тромбоцитов (100 %). Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 3$). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, сравнение с 100 %; одновыборочный двусторонний t -критерий Стьюдента.

Рисунок 6.1 — Временная динамика формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет»

что в состоянии покоя цитоскелетная фракция тромбоцитов содержала $63,5 \pm 9,9$ % β -актина и $4,3 \pm 2,6$ % αIIb (Рисунок 6.1). Агрегация тромбоцитов сопровождалась быстрым увеличением содержания β -актина в цитоскелетной фракции, которое достигало максимума уже через 1 мин после добавления TRAP и оставалось на этом уровне не менее 15 мин. Агрегация тромбоцитов сопровождалась также посте-



А. Тромбоциты стимулировали добавлением в ОТП 25 мкМ TRAP. Через 1, 3 или 5 мин после стимуляции добавляли 4,5 мкМ эптифибатид (указано стрелкой) и изменения светопропускания регистрировали еще в течение 2 мин. Приведены агрегатограммы одного из четырех независимых экспериментов. Б. Скорость дезагрегации тромбоцитов рассчитывали как снижение светопропускания за первые 15 с после добавления эптифибатид и выражали в %/мин. Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 4$). $*P < 0,05$, сравнение с нулем; одновыборочный двусторонний t -критерий Стьюдента.

Рисунок 6.2 — Стабильность тромбоцитарных агрегатов в динамике TRAP-индуцированной агрегации тромбоцитов

пенной ассоциацией интегринов $\alpha IIb\beta 3$ со структурами цитоскелета: через 1 мин после стимуляции тромбоцитов уровень αIIb в цитоскелетной фракции составлял $40,2 \pm 20,1$ %, через 3 мин — $75,8 \pm 13,2$ %, а через 5 и 10 мин был близок к 100 % и не отличался от уровня αIIb в цитоскелетной фракции спустя 15 мин после индукции агрегации тромбоцитов.

Для оценки стабильности связи между интегринами $\alpha IIb\beta 3$ и фибриногеном в динамике TRAP-индуцированной агрегации тромбоцитов спустя 1, 3 или 5 мин после индукции агрегации в ОТП добавляли эптифибатид и оценивали скорость вызываемой им дезагрегации (Рисунок 6.2). Добавление эптифибатида через 1 мин после стимуляции тромбоцитов вызывало их дезагрегацию со скоростью $9,3 \pm 6,9$ %/мин, а его добавление через 3 или 5 мин после стимуляции не вызывало дезагрегации тромбоцитов, что указывает на высокую стабильность агрегатов и прочность связи между интегринами $\alpha IIb\beta 3$ и фибриногеном.

Таким образом, анализ формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» в динамике TRAP-индуцированной агрегации показал, что

агрегация тромбоцитов сопровождается быстрым увеличением содержания β -актина (максимум через 1 мин) в цитоскелете и постепенной ассоциацией с цитоскелетом интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (максимум через 5 мин). Стабильность связи между интегрином $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном увеличивается со временем и достигает максимума не позднее чем через 3 мин после индукции агрегации тромбоцитов. Учитывая приведенные данные, в последующих сериях экспериментов, ассоциацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом оценивали через 5 мин после индукции агрегации, а прочность связи между интегрином $\alpha\text{IIb}\beta 3$ — через 3 мин после индукции агрегации.

***Вклад сигнализации от рецепторов, сопряженных с G-белком,
и сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ в формирование
комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет»***

Растворимые тромбоцитарные агонисты (тромбин, АДФ, ТХА2 и другие) реализуют свои эффекты через рецепторы, сопряженные с гетеротримерными гуанозинтрифосфатсвязывающими белками (G-белками). Передача сигналов от этих рецепторов приводит к конформационной перестройке и активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (сигнализация «изнутри наружу»), связыванию фибриногена и агрегации тромбоцитов, что в свою очередь приводит к включению дополнительных сигнальных путей от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ к различным внутриклеточным структурам тромбоцитов (сигнализация «снаружи внутрь») [26]. Мы проанализировали по отдельности вклад сигнализации от рецепторов, сопряженных с G-белками, и вклад сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ в формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет».

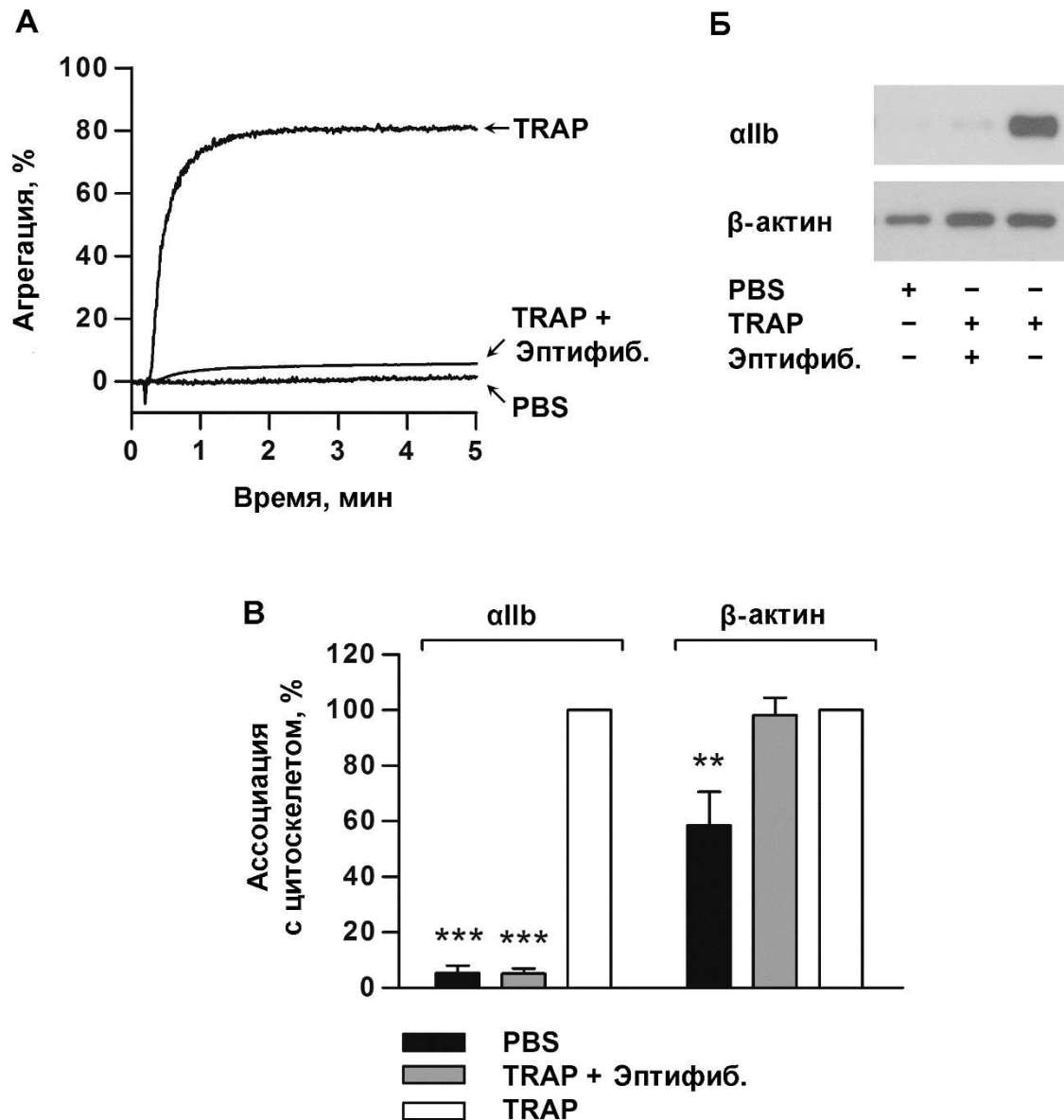
Вклад сигнализации от рецепторов, сопряженных с G-белками. Для исследования вклада сигнализации от рецепторов, сопряженных с G-белками, в формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» тромбоциты стимулировали с помощью TRAP. Действуя через рецепторы PAR-1 и PAR-4, этот агонист вызывает одновременную активацию представителей всех трех семейств G-белков (G_{aq} , G_{ai} и $G_{a12/13}$), с которыми могут быть сопряжены рецепторы

растворимых тромбоцитарных агонистов. Чтобы отделить эффекты активации тромбоцитов через рецепторы PAR-1 и PAR-4 от эффектов, обусловленных связыванием фибриногена, агрегацией тромбоцитов и последующей сигнализацией «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$, перед стимуляцией тромбоцитов образцы ОТП инкубировали с эптифибатидом — пептидом, препятствующим связыванию фибриногена с интегринными $\alpha\text{IIb}\beta_3$. В контрольные образцы ОТП вместо TRAP добавляли соответствующий объем PBS (покоящиеся тромбоциты).

Стимуляция интактных тромбоцитов с помощью TRAP вызывала их агрегацию с максимальной амплитудой $85,9 \pm 6,1$ %, тогда как аналогичная стимуляция тромбоцитов, предварительно проинкубированных с эптифибатидом, не вызывала агрегационного ответа (Рисунок 6.3, А).

Для исследования цитоскелета тромбоцитов через 5 мин после стимуляции образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100, после чего нерастворимый материал (цитоскелетную фракцию) выделяли и анализировали методом вестерн-блоттинга (Рисунок 6.3, Б). Анализ показал, что цитоскелет покоящихся (контрольных) тромбоцитов содержал $58,5 \pm 12,1$ % β -актина и $4,1 \pm 1,9$ % αIIb по отношению к их содержанию в агрегированных тромбоцитах (100 %). В образцах, проинкубированных с эптифибатидом, содержание β -актина в цитоскелете не отличалось от его содержания в агрегированных тромбоцитах, тогда как содержание αIIb не отличалось от такового в контроле (Рисунок 3, В). Иными словами, нарушение связывания фибриногена и последующей агрегации тромбоцитов не оказывало влияния на полимеризацию актина, но предотвращало ассоциацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ с цитоскелетом.

Обнаруженные в присутствии эптифибатида эффекты могли быть обусловлены как нарушением связывания фибриногена, так и нарушением установления через фибриноген физической связи между отдельными тромбоцитами, т. е. нарушением агрегации тромбоцитов *per se*. Как первое, так и второе могло стать причиной нарушения ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ с цитоскелетом в присутствии эптифибатида. Для выяснения этого вопроса мы провели дополнительный эксперимент, в котором интактные тромбоциты стимулировали с помощью TRAP



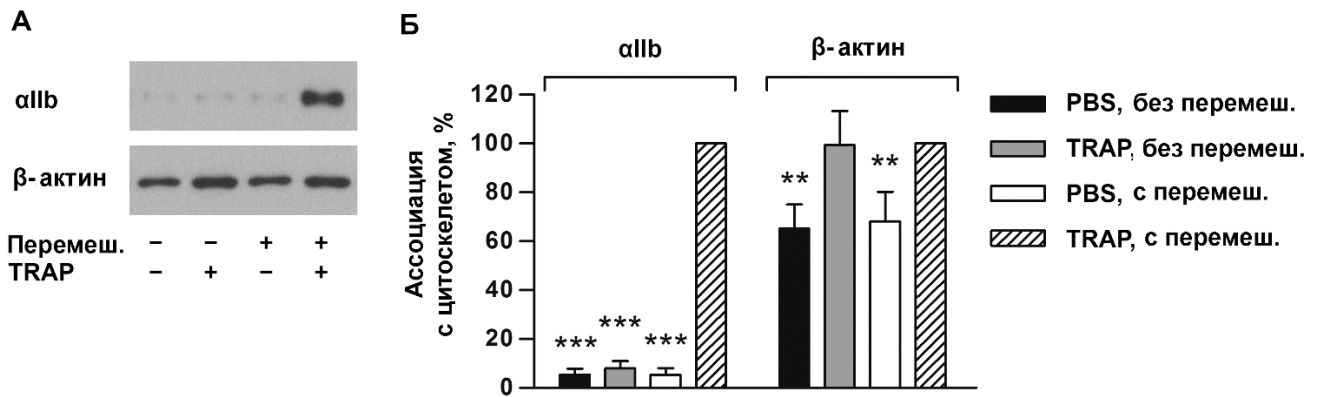
А. ОТП инкубировали с 4,5 мкМ эптифибатид (Эптифиб.) в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего индуцировали агрегацию тромбоцитов добавлением в ОТП 25 мкМ TRAP или PBS (контроль). Приведены агрегатограммы одного из четырех независимых экспериментов. Б. В параллельных экспериментах через 5 мин после стимуляции образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β -актина и αIIb . Приведены результаты одного из четырех независимых экспериментов. В. Содержание β -актина и αIIb в цитоскелете выражали в процентах от такового в агрегированных тромбоцитах (100%). Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 4$). $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, сравнение с 100%; одновыборочный двусторонний t -критерий Стьюдента.

Рисунок 6.3 — Влияние эптифибатид на TRAP-индуцированную агрегацию тромбоцитов

без перемешивания ОТП магнитной мешалкой. Поскольку для агрегации тромбоцитов необходимо их столкновение друг с другом, обеспечиваемое

перемешиванием плазмы магнитной мешалкой, стимуляция тромбоцитов без перемешивания ОТП приводит к связыванию фибриногена без последующей агрегации тромбоцитов. Образцы, в которых тромбоциты стимулировали с помощью TRAP в стандартных условиях (с перемешиванием ОТП) служили контролем. Стимуляция контрольных образцов вызывала агрегацию тромбоцитов с максимальной амплитудой $83,7 \pm 4,4 \%$, тогда как аналогичная стимуляция образцов без перемешивания магнитной мешалкой, равно как и добавление PBS (вне зависимости от перемешивания образцов), не вызывало агрегационного ответа. Через 5 мин после стимуляции образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100 и нерастворимый материал (цитоскелетную фракцию) анализировали методом вестерн-блоттинга (Рисунок 6.4, А). Анализ показал, что цитоскелетная фракция покоящихся тромбоцитов содержала $65,1 \pm 10,0\%$ β -актина и $5,4 \pm 2,4\%$ α IIb по отношению к их содержанию в агрегированных тромбоцитах (100 %). Цитоскелет тромбоцитов, стимулированных без перемешивания магнитной мешалкой, содержал $99,5 \pm 13,7\%$ β -актина, т.е. практически такое же количество, как и цитоскелет агрегированных тромбоцитов, и минимальное количество α IIb, как и цитоскелет покоящихся тромбоцитов (Рисунок 6.4, Б).

Таким образом, сигнализация от рецепторов, сопряженных с G-белками, приводит к активации интегринов α IIb β 3, связыванию ими фибриногена и агрегации тромбоцитов, сопровождающейся увеличением содержания β -актина в цитоскелете и ассоциации с цитоскелетом интегринов α IIb β 3. При этом сама по себе сигнализация от рецепторов, сопряженных с G-белками, и активация интегринов α IIb β 3 (без последующей агрегации тромбоцитов) приводит лишь к увеличению содержания β -актина в цитоскелете и не вызывает ассоциации с ним интегринов α IIb β 3. Более того, этот эффект обнаруживается вне зависимости от того, происходит ли связывание фибриногена интегринными α IIb β 3. Эти данные указывают на необходимость образования физической связи между активированными тромбоцитами (т. е. их агрегации) и, вероятно, последующей сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов α IIb β 3 для формирования комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет».



А. Тромбоциты стимулировали добавлением в ОТП 25 мкМ TRAP или PBS (контроль) с или без перемешивания магнитной мешалкой в течение 5 мин, после чего образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β-актина и αIIb. Представлены результаты одного из четырех независимых экспериментов. Б. Содержание β-актина и αIIb в цитоскелете выражали в процентах от такового в тромбоцитах, стимулированных TRAP в условиях перемешивания (агрегированных тромбоцитах). Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 4$). $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, сравнение с 100%; одновыборочный двусторонний *t*-критерий Стьюдента.

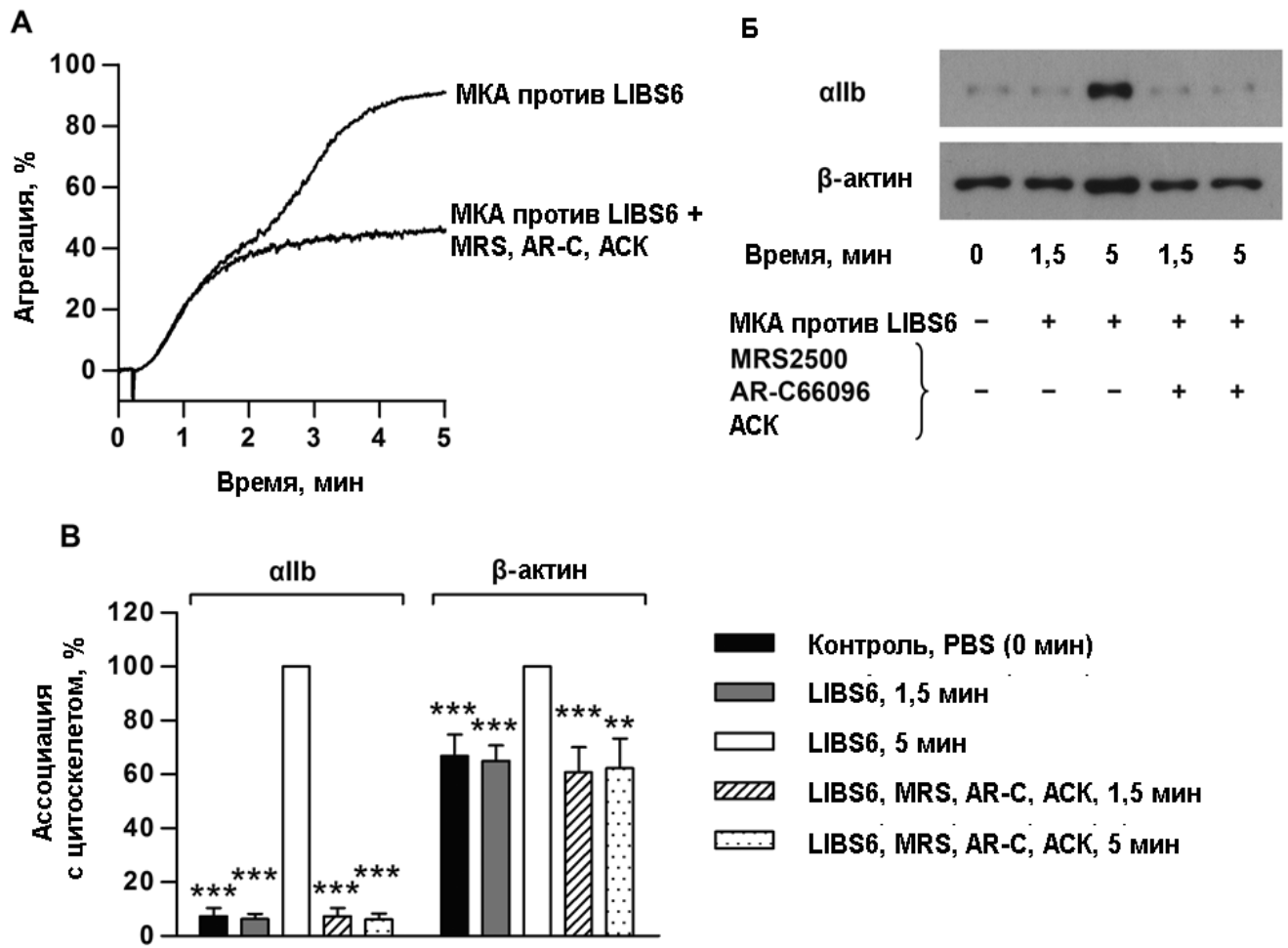
Рисунок 6.4 — Стимуляция тромбоцитов с помощью TRAP без перемешивания

Вклад сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов αIIbβ3. Для исследования вклада сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов αIIbβ3 в формирование комплекса «фибриноген–интегрин αIIbβ3–цитоскелет» мы использовали моноклональные антитела (МКА) против LIBS6 (ligand-induced binding site 6; индуцируемого лигандом сайта 6), расположенного на субъединице β3 интегринов αIIbβ3. Связывание указанных антител с LIBS6 сдвигает конформационное равновесие интегринов αIIbβ3 в сторону их активного состояния. Иными словами, применение МКА против LIBS6 вызывает активацию интегринов αIIbβ3 напрямую, без предварительной активации тромбоцитов какими-либо агонистами.

Добавление МКА против LIBS6 в ОТП индуцировало двухволновую агрегацию тромбоцитов. Первая волна достигала максимальной амплитуды в $41,8 \pm 5,9 \%$, которая регистрировалась спустя $1,6 \pm 0,2$ мин после добавления указанных антител. Затем начиналась вторая волна, максимальная амплитуда которой составила $82,6 \pm 5,2 \%$ (Рисунок 6.5, А). Мы предположили, что вторая волна агрегации тромбоцитов могла быть обусловлена действием АДФ, высвобождающегося из плотных гранул тромбоцитов, и TXA_2 , образующегося в

тромбоцитах благодаря активности циклооксигеназы-1, т. е. действием эндогенных агонистов, вызывающих дополнительную активацию тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с G-белками. Чтобы отделить эффекты сигнализации «снаружи внутрь», обусловленные активацией интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ с помощью МКА против LIBS6 и последующей агрегацией тромбоцитов, от эффектов, связанных с действием выделяемых тромбоцитами АДФ и TXA_2 на рецепторы, сопряженные с G-белками, мы проинкубировали ОТП с высокоселективными блокаторами рецепторов для АДФ (AR-C66096 и MRS2500 — антагонистами рецепторов P2Y_{12} и P2Y_1 соответственно) и неселективным ингибитором циклооксигеназы (ацетилсалициловой кислотой). Контрольные образцы проинкубировали с соответствующими растворителями. Инкубация ОТП с MRS2500, AR-C66096 и ацетилсалициловой кислотой отменяла возникновение второй волны агрегации тромбоцитов, индуцированной МКА против LIBS6, так что наблюдалась одноволновая агрегация тромбоцитов с максимальной амплитудой $49,5 \pm 8,6 \%$ (Рисунок 6.5, А). Данные результаты указывают на то, что первая волна агрегации представляла собой непосредственную реакцию тромбоцитов на действие МКА против LIBS6, тогда как вторая волна была действительно обусловлена дополнительной стимуляцией тромбоцитов эндогенным АДФ и/или TXA_2 , высвобождение или образование которых явилось результатом прямой активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$, агрегации тромбоцитов и передачи сигнала «снаружи внутрь».

Для исследования цитоскелета тромбоцитов в динамике агрегации, индуцированной МКА против LIBS6, в образцы ОТП добавляли лизирующий буфер с Тритоном X-100. Образцы лизировали через 1,5 мин (перед началом второй волны агрегации) и 5 мин после добавления в ОТП указанных антител. Из полученного лизата выделяли цитоскелетную фракцию, которую затем исследовали методом вестерн-блоттинга (Рисунок 6.5, Б). Интенсивность полос выражали в процентах от интенсивности полос, соответствующих 5-минутной (максимальной) агрегации контрольных (не обработанных ингибиторами) тромбоцитов, которую принимали за 100 %. Именно в этих образцах происходило максимальное накопление β -актина и αIIb в цитоскелетной фракции тромбоцитов (Рисунок 6.5, В).



А. ОТП инкубировали с 10 мкМ MRS2500, 10 мкМ AR-C66096 и 0,5 мМ ACK или с соответствующим растворителем (контроль) в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего тромбоциты стимулировали добавлением в ОТП МКА против LIBS6 (асцитная жидкость, конечное разведение 1:200). Представлены агрегатограммы одного из пяти независимых экспериментов. Б. В параллельных экспериментах образцы лизировали через указанные промежутки времени после стимуляции добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β -актина и α IIb. Представлены результаты одного из пяти независимых экспериментов. В. Содержание β -актина и α IIb в цитоскелете выражали в процентах от такового в контрольных тромбоцитах спустя 5 мин после стимуляции (100 %). Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 5$). $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, сравнение с 100%; одновыборочный двусторонний t -критерий Стьюдента.

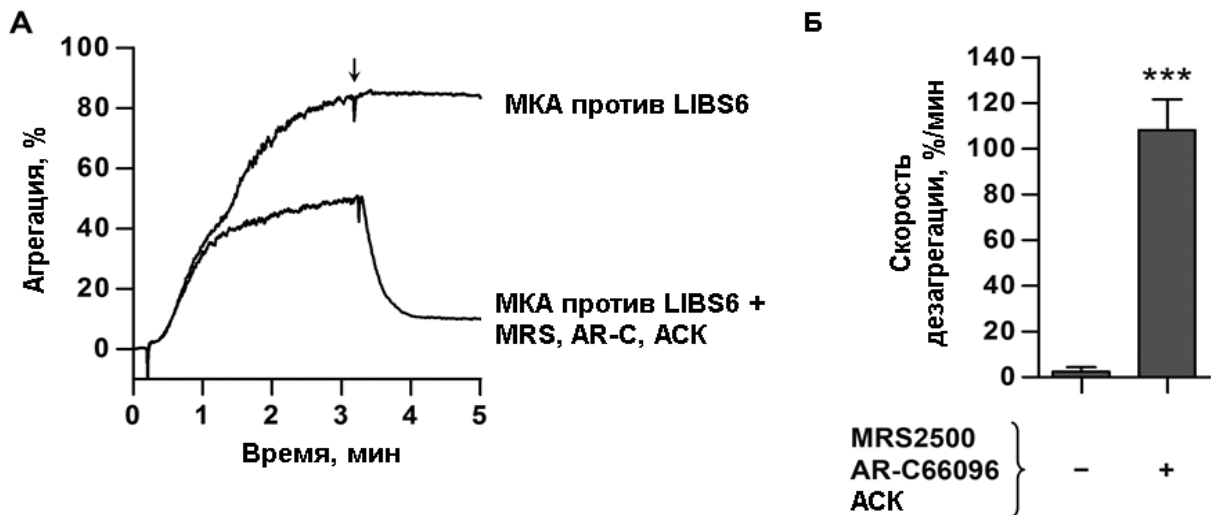
Рисунок 6.5 — Влияние агрегацию тромбоцитов, индуцированной моноклональными антителами против LIBS6, на образование цитоскелетного комплекса

В покоящихся тромбоцитах (0 мин) цитоскелетная фракция содержала $66,9 \pm 7,9$ % β -актина и $7,4 \pm 3,0$ % α IIb. Близкие значения были получены в контрольных образцах спустя 1,5 мин после стимуляции, а также в образцах, обработанных ингибиторами, спустя 1,5 и 5 мин после стимуляции (Рисунок 6.5, В).

Для того чтобы установить роль сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, а также сигнализации от рецепторов, сопряженных с G-белками, в обеспечении стабильности связи между интегринными $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном в динамике агрегации тромбоцитов в качестве индуктора агрегации мы снова использовали МКА против LIBS6. Агрегацию тромбоцитов индуцировали в контрольных образцах и в образцах, инкубированных с MRS2500, AR-C66096 и ацетилсалициловой кислотой. Как было показано выше, инкубация с указанными ингибиторами отменяет вторую волну агрегации, связанную с действием эндогенного АДФ и TXA_2 , и позволяет тем самым разделить эффекты сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ от эффектов сигнализации от рецепторов, сопряженных с G-белками.

Через 3 мин после индукции агрегации в ОТП добавляли эптифибатид и оценивали скорость возникающей при этом дезагрегации тромбоцитов (Рисунок 6.6). Добавление эптифибатида на плато второй волны агрегации контрольных тромбоцитов не вызывало изменений в динамике агрегации, что свидетельствует о высокой стабильности связи между интегрином $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном. В отличие от этого добавление эптифибатида в ОТП, проинкубированную с MRS2500, AR-C66096 и ацетилсалициловой кислотой, вызывало резкую дезагрегацию тромбоцитов, скорость которой составила $108,0 \pm 13,5 \text{ \%}/\text{мин}$, что указывает на низкую стабильность связи между интегрином $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном.

Таким образом, исследования показали, что первая волна агрегации, индуцированной МКА против LIBS6, обусловлена непосредственным активирующим действием указанных антител на интегрины $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и связыванием ими фибриногена, тогда как вторая волна агрегации обусловлена дополнительной стимуляцией тромбоцитов эндогенными агонистами (АДФ, TXA_2), высвобождающимися или образующимися тромбоцитами в результате сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ во время первой волны агрегации и действующими через рецепторы, сопряженные с G-белком. Непосредственная активация интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с помощью МКА против LIBS6 и возникающая при этом агрегация тромбоцитов и сигнализация «снаружи внутрь», в отсутствие сигнализации от рецепторов,



А. ОТП инкубировали с 10 мкМ MRS2500, 10 мкМ AR-C66096 и 0,5 мМ АСК или с соответствующим растворителем (контроль) в течение 10 мин при комнатной температуре и тромбоциты стимулировали добавлением в ОТП МКА против LIBS6 (асцитная жидкость, конечное разведение 1:200). Через 3 мин после стимуляции добавляли 4,5 мкМ эпitifибатида (указано стрелкой) и изменения светопропускания регистрировали еще в течение 2 мин. Приведены агрегатограммы одного из четырех независимых экспериментов. Б. Скорость дезагрегации тромбоцитов рассчитывали как снижение светопропускания за первые 15 с после добавления эпitifибатида и выражали в %/мин. Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 4$). *** $P < 0,001$, сравнение с нулем; одновыборочный двусторонний t -критерий Стьюдента.

Рисунок 6.6 — Стабильность тромбоцитарных агрегатов в динамике агрегации тромбоцитов, индуцированной МАК против LIBS6

сопряженных с G-белком, недостаточны для индукции полимеризации β -актина и ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом, а также для обеспечения стабильности связи между интегринами $\alpha IIb\beta 3$ и фибриногеном. Все эти события требуют дополнительной стимуляции тромбоцитов с помощью эндогенных растворимых агонистов, действующих через рецепторы, сопряженные с G-белком.

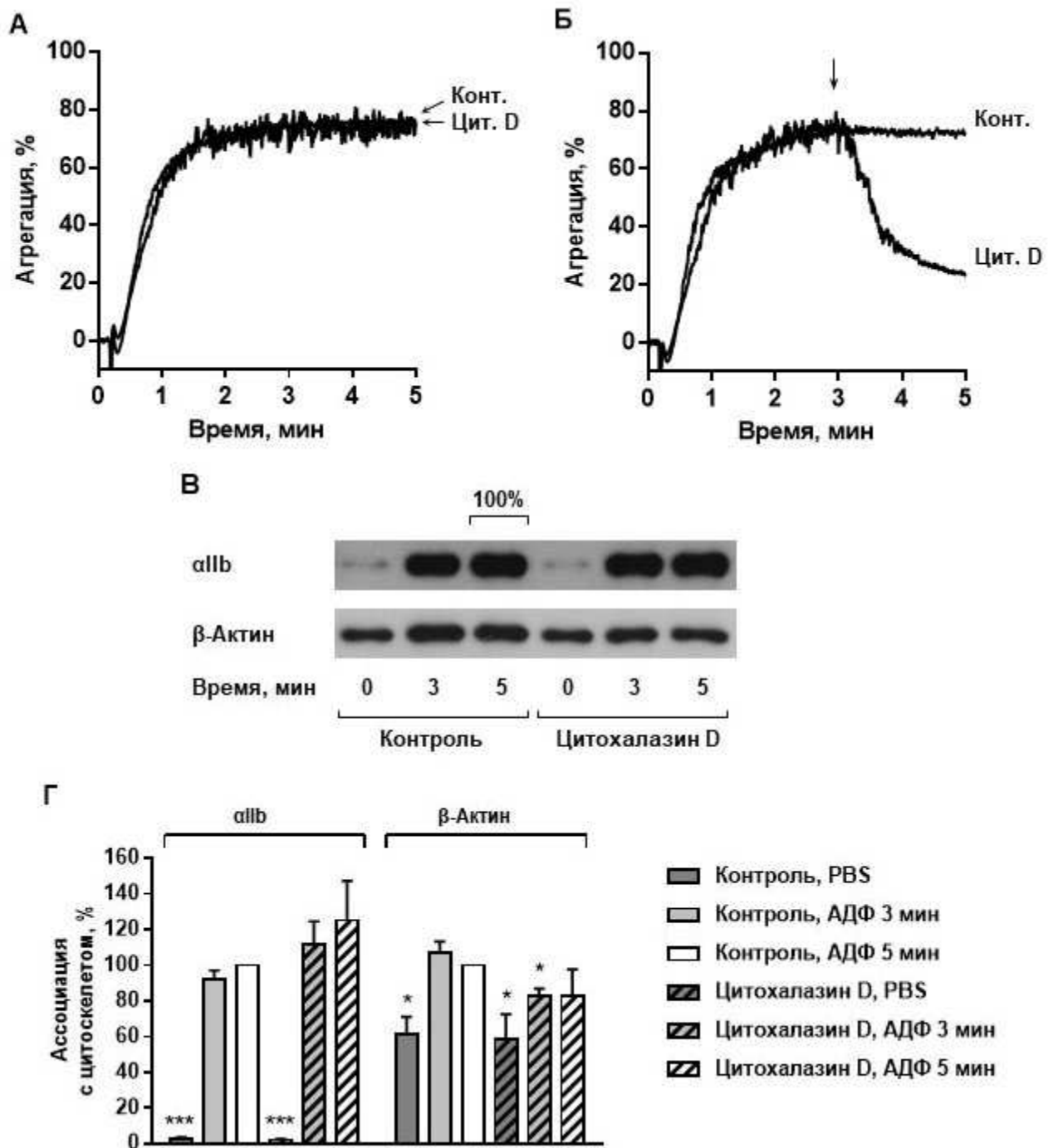
Вклад полимеризации β -актина в формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет»

Тромбоциты отличаются высокой динамикой актинового цитоскелета. Так, при действии агонистов на покоящиеся тромбоциты существующие микрофиламенты разрываются на множество коротких фрагментов, а затем к «оперенным» (быстрорастущим) концам этих фрагментов последовательно присоединяются мономеры актина, т. е. происходит полимеризация актина, результатом которой

является образование множество новых микрофиламентов. В предыдущих сериях экспериментов мы установили, что полимеризация актина происходит независимо от ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом и агрегации тромбоцитов. Настоящий раздел нашего исследования посвящен изучению вопроса о том, оказывает ли полимеризация актина влияние на формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет». Для ответа на поставленный вопрос мы исследовали формирование указанного комплекса в динамике агрегации тромбоцитов, обработанных цитохалазином D — одним из наиболее изученных и мощных ингибиторов актинового цитоскелета. Подобно кэпирующим белкам, цитохалазин D связывается с «оперенным» концом микрофиламента и блокирует присоединение к нему мономеров актина, что нарушает элонгацию этого микрофиламента. Кроме того, показано, что цитохалазин D стимулирует АТФазную активность мономеров актина. Это приводит к уменьшению доли АТФ-актина и увеличению доли АДФ-актина, неспособного присоединяться к свободным «оперенным» концам микрофиламентов.

Образцы ОТП инкубировали с 10 мкМ цитохалазина D или соответствующим растворителем (контроль), после чего индуцировали агрегацию тромбоцитов с помощью АДФ. Стимуляция контрольных тромбоцитов вызывала их агрегацию с максимальной амплитудой $77,6 \pm 5,3 \%$. Схожая по амплитуде агрегация наблюдалась и в образцах, проинкубированных с цитохалазином D (Рисунок 6.7, А).

Чтобы оценить стабильность образующихся тромбоцитарных агрегатов, спустя 3 мин после стимуляции тромбоцитов в ОТП добавляли эптифибатид. В контрольных образцах это не отражалось на динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, что свидетельствует о высокой стабильности агрегатов и связи между интегринными $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном. В отличие от этого в образцах, проинкубированных с цитохалазином D, добавление эптифибатида вызывало стремительную дезагрегацию тромбоцитов, скорость которой составила $51,7 \pm 10,2 \%/мин$ (Рисунок 6.7, Б), что указывает на низкую стабильность тромбоцитарных агрегатов и недостаточную прочность связи между интегринными $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном.



А. ОТП инкубировали с 10 мкМ цитохалазина D или 0,25 % диметилсульфоксидом (контроль) в течение 5 мин при комнатной температуре, затем тромбоциты стимулировали добавлением в ОТП 10 мкМ АДФ. Б. В параллельных экспериментах спустя 3 мин после стимуляции тромбоцитов в ОТП добавляли 4,5 мкМ эптифибатида (отмечено стрелкой). В. В параллельных экспериментах через указанные промежутки времени тромбоциты лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100, нерастворимую фракцию выделяли и исследовали методом вестерн-блоттинга. Г. Содержание β -актина и α IIb в цитоскелете выражали в процентах от такового в контрольных образцах, стимулированных АДФ в течение 5 мин (100 %). Результаты представлены как $M \pm SD$ ($n = 4$). $*P < 0,05$, $***P < 0,001$, сравнение с 100%; одновыборочный двусторонний t -критерий Стьюдента.

Рисунок 6.7 — Влияние цитохалазина D на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов и формирование комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет»

Для оценки влияния цитохалазина D на ассоциацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, спустя 3 и 5 мин после стимуляции тромбоцитов образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100, после чего нерастворимый материал (цитоскелетную фракцию) выделяли и анализировали методом вестерн-блоттинга с использованием МКА против β -актина и αIIb . Интенсивность полос, зарегистрированных в контроле спустя 5 мин после стимуляции тромбоцитов, принимали за 100 %. Анализ показал, что в контроле цитоскелет покоящихся тромбоцитов содержал $61,2 \pm 9,9\%$ β -актина и $2,7 \pm 1,0\%$ αIIb , а спустя 3 мин после стимуляции с помощью АДФ количество этих белков в цитоскелете статистически значимо не отличалось от такового спустя 5 мин после стимуляции тромбоцитов (100 %) (Рисунок 6.7, В и Г). Цитоскелет покоящихся тромбоцитов, обработанных цитохалазином D, содержал $58,4 \pm 14,1\%$ β -актина и $2,2 \pm 0,5\%$ αIIb . Спустя 3 мин после стимуляции их цитоскелет содержал $82,7 \pm 4,3\%$ β -актина, что было статистически значимо меньше по сравнению со 100 % в контроле ($P < 0,05$), а также содержал максимальное (близкое к 100 %) количество αIIb . Схожие результаты были получены и в образцах, обработанных цитохалазином D, спустя 5 мин после стимуляции.

Следовательно, нарушение полимеризации β -актина не влияет на амплитуду агрегации тромбоцитов и не отражается на способности интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ассоциироваться с цитоскелетом тромбоцитов, но приводит к значительному снижению стабильности образующихся тромбоцитарных агрегатов, свидетельствующему о недостаточной прочности связи между интегрином $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном.

Таким образом, исследование общих закономерностей формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов показало:

1. Активация тромбоцитов через рецепторы растворимых тромбоцитарных агонистов, сопряженные с G-белком, и связывание фибриногена с интегринными $\alpha\text{IIb}\beta 3$ без последующей агрегации тромбоцитов и сигнализации «снаружи внутрь» вызывает полимеризацию актина, но не приводит к ассоциации

интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом. Следовательно, для ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом необходимо не только связывание ими фибриногена, но и образование через фибриноген физической связи между тромбоцитами (т. е. агрегация тромбоцитов *per se*).

2. Агрегация тромбоцитов, индуцированная активацией интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ напрямую с помощью МКА против LIBS6, и возникающая при этом сигнализация «снаружи внутрь» недостаточна ни для полимеризации актина, ни для ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом, ни для обеспечения прочности их связи с фибриногеном. Следовательно, все это требует дополнительной сигнализации от рецепторов растворимых тромбоцитарных агонистов, сопряженных с G-белком.
3. Возникающая в динамике агрегации тромбоцитов полимеризация актина не является обязательной для агрегации тромбоцитов и ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом, но необходима для обеспечения прочности связи между интегринными $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном. Амплитуда агрегации тромбоцитов не может служить для оценки прочности связи между интегринными $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном.
4. Ассоциация интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом с одной стороны и формирование стабильной связи между интегринными $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном с другой стороны, т. е. формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет», является результатом сочетанного действия сигнализации от рецепторов растворимых тромбоцитарных агонистов, сопряженных с G-белком, полимеризации актина, физического соединения тромбоцитов друг с другом через фибриноген (собственно агрегации тромбоцитов) и сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$.

6.2. Формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» в присутствии ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов P2Y_{12} и P2Y_1 тромбоцитов

Настоящий раздел нашей работы посвящен изучению влияния АСК и антагонистов рецепторов P2Y_{12} и P2Y_1 на формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ и арахидоновой кислотой (АК).

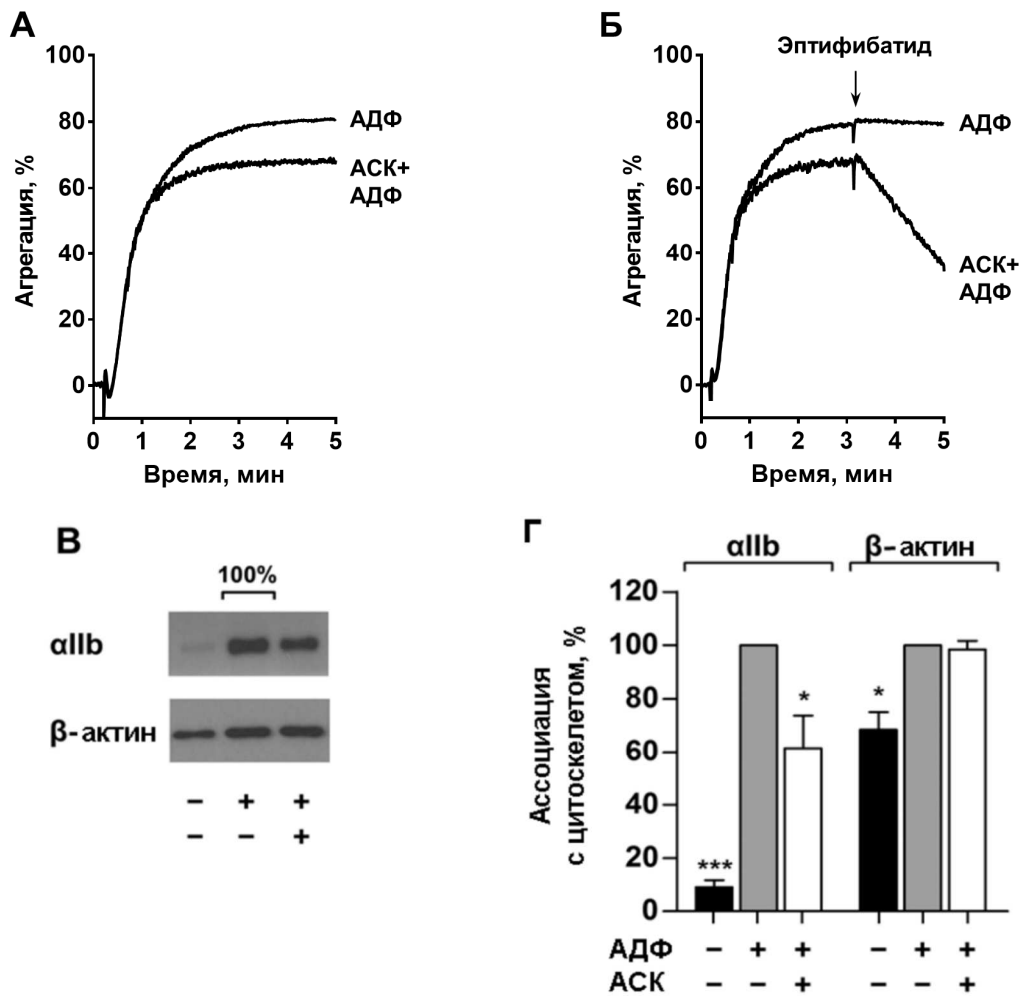
Влияние АСК и антагонистов рецепторов P2Y_{12} и P2Y_1 на формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

АСК. Ингибируя циклооксигеназу-1, АСК предотвращает генерацию TXA_2 , а следовательно, и стимуляцию рецепторов TP , сопряженных с Ga_q и $\text{Ga}_{12/13}$. При этом АДФ будет вызывать активацию как рецептора P2Y_1 , сопряженного с Ga_q , так и рецептора P2Y_{12} , сопряженного с Ga_{i2} .

Образцы ОТП инкубировали с 0,5 мМ АСК или соответствующим растворителем (контроль), после чего добавлением АДФ индуцировали агрегацию тромбоцитов. В контроле отмечалась устойчивая агрегация тромбоцитов, степень которой составила $84,7 \pm 6,1 \%$. В образцах, проинкубированных с АСК, также отмечалась устойчивая, но менее выраженная агрегация тромбоцитов, степень которой составила $69,0 \pm 5,8 \%$ ($P < 0,001$) (Рисунок 6.8, А).

Добавление в ОТП эптифибатиды спустя 3 мин после индукции агрегации тромбоцитов в контроле не вызывало дезагрегации, а в образцах, проинкубированных с АСК, вызывало дезагрегацию тромбоцитов со скоростью $21,6 \pm 4,9 \%$ /мин, что свидетельствует о пониженной стабильности тромбоцитарных агрегатов и прочности связи между интегринами $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном (Рисунок 6.8, Б).

Анализ цитоскелетных фракций показал, что максимальное количество β -актина и αIIb (100 %) содержалось в цитоскелете контрольных агрегированных тромбоцитов. Цитоскелет покоящихся тромбоцитов содержал $68,4 \pm 6,6 \%$ β -актина



А. Тромбоциты ОТП инкубировали с 0,5 мМ АСК или с 0,2 % этиловым спиртом в качестве растворителя в течение 10 мин при комнатной температуре и стимулировали 10 мкМ АДФ в течение 5 мин при 37 °С. Приведены агрегатограммы одного из четырех независимых экспериментов. **Б.** В параллельных экспериментах образцы стимулировали, как указано в А. Через 3 мин после стимуляции добавляли 4,5 мкМ эптифибатид (отмечено стрелкой) и агрегатограмму регистрировали еще в течение 2 мин. **В.** Образцы лизировали через 5 мин после стимуляции тромбоцитов добавлением буфера с Тритоном Х-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β-актина и αIIb. Представлены результаты одного из четырех независимых экспериментов. **Г.** Содержание β-актина и αIIb в цитоскелете выражали в процентах от такового в тромбоцитах, инкубированных с растворителем и стимулированных АДФ (100 %). Результаты четырех независимых экспериментов представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, сравнение с 100 %; одновыборочный двусторонний t -критерий Стьюдента.

Рисунок 6.8 — Влияние АСК на формирование комплекса «фибриноген–интегрин αIIbβ3–цитоскелет» в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

и следы αIIb. Цитоскелет тромбоцитов, проинкубированных с АСК и стимулированных АДФ, содержал максимальное количества β-актина и $61,5 \pm 12,2$ % αIIb, что было статистически значимо меньше по сравнению с содержанием αIIb в контрольных агрегированных тромбоцитах (Рисунок 6.8, В, Г).

Антагонист рецептора P2Y₁₂. В присутствии антагониста рецептора P2Y₁₂, сопряженного с Gα_{i2}, действие АДФ реализуется только через рецептор P2Y₁, сопряженный с Gα_q.

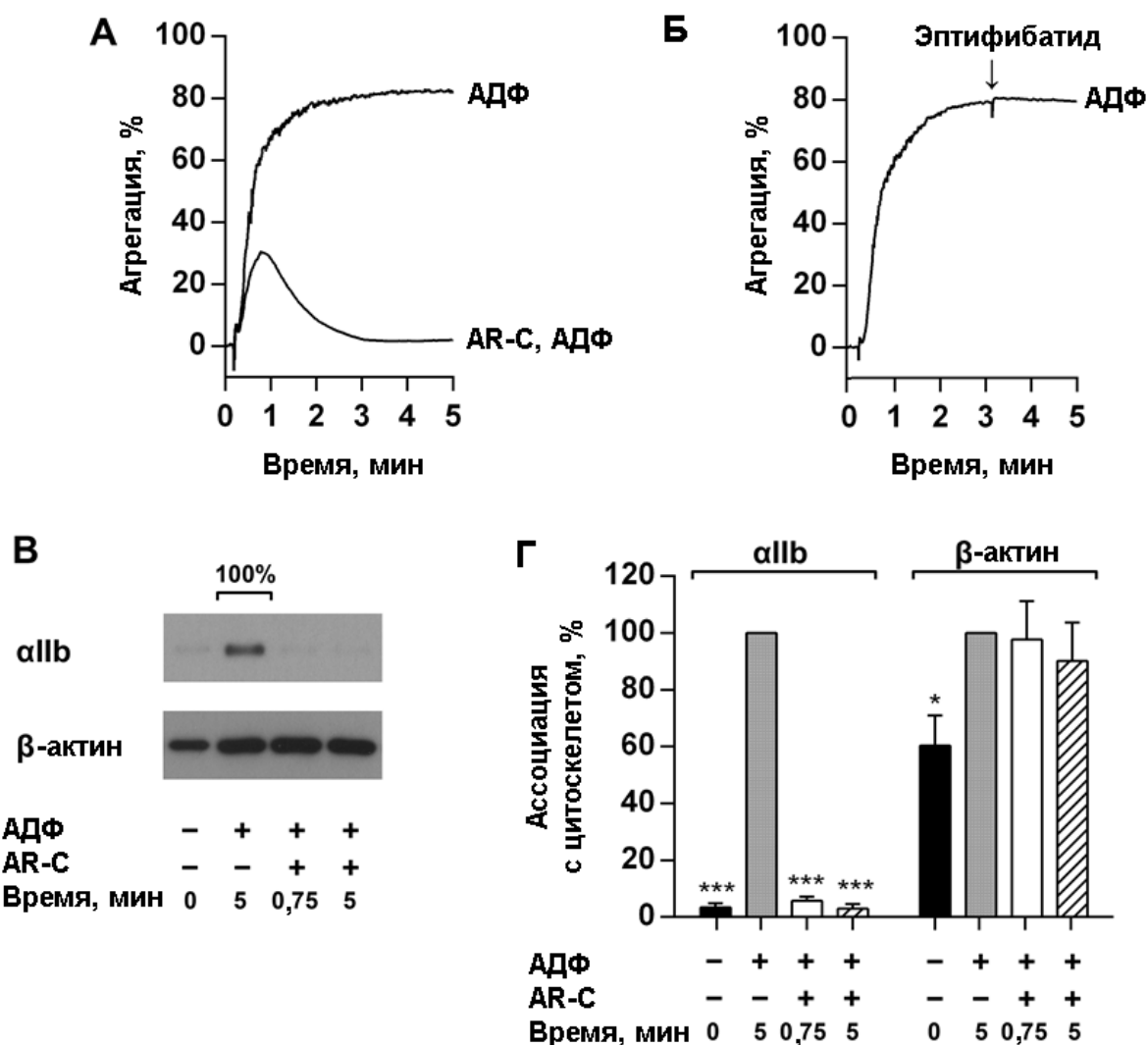
Образцы ОТП инкубировали с 10 мкМ AR-C66096 или соответствующим растворителем (контроль), после чего добавлением АДФ индуцировали агрегацию тромбоцитов. В контроле отмечалась устойчивая агрегация тромбоцитов, степень которой составила $79,5 \pm 4,2 \%$. В образцах, проинкубированных с AR-C66096, имела место транзиторная (спонтанно обратимая) агрегация тромбоцитов с максимальной амплитудой $34,6 \pm 5,0 \%$, которая отмечалась спустя $0,75 \pm 0,11$ мин после стимуляции тромбоцитов (Рисунок 6.9, А).

Добавление эптифибатиды спустя 3 мин после стимуляции контрольных тромбоцитов с помощью АДФ не отражалось на динамике агрегации тромбоцитов, что свидетельствует о высокой стабильности образовавшихся тромбоцитарных агрегатов и прочности связи между интегринами αIIbβ3 и фибриногеном (Рисунок 6.9, Б). Добавление эптифибатиды в образцы с ОТП, проинкубированной с AR-C66096 было нецелесообразным ввиду транзиторного характера агрегации тромбоцитов.

Анализ цитоскелетных фракций показал, что максимальное количество β-актина и αIIb содержалось в цитоскелете контрольных тромбоцитов, стимулированных АДФ, которое было принято за 100 %. Цитоскелет покоящихся тромбоцитов содержал $60,4 \pm 10,5 \%$ актина и следы αIIb. Цитоскелет тромбоцитов, проинкубированных с AR-C66096 и стимулированных АДФ, спустя 0,75 и 5 мин после стимуляции содержал максимально количество β-актина и следы αIIb (Рисунок 6.9, В, Г).

Антагонист рецептора P2Y₁. В присутствии антагониста рецептора P2Y₁, сопряженного с Gα_q, действие АДФ реализуется только через рецептор P2Y₁₂, сопряженный с Gα_{i2}.

Образцы ОТП инкубировали с 10 мкМ MRS2500 или соответствующим растворителем (контроль), после чего добавлением АДФ индуцировали агрегацию тромбоцитов. В контроле отмечалась устойчивая агрегация тромбоцитов, степень



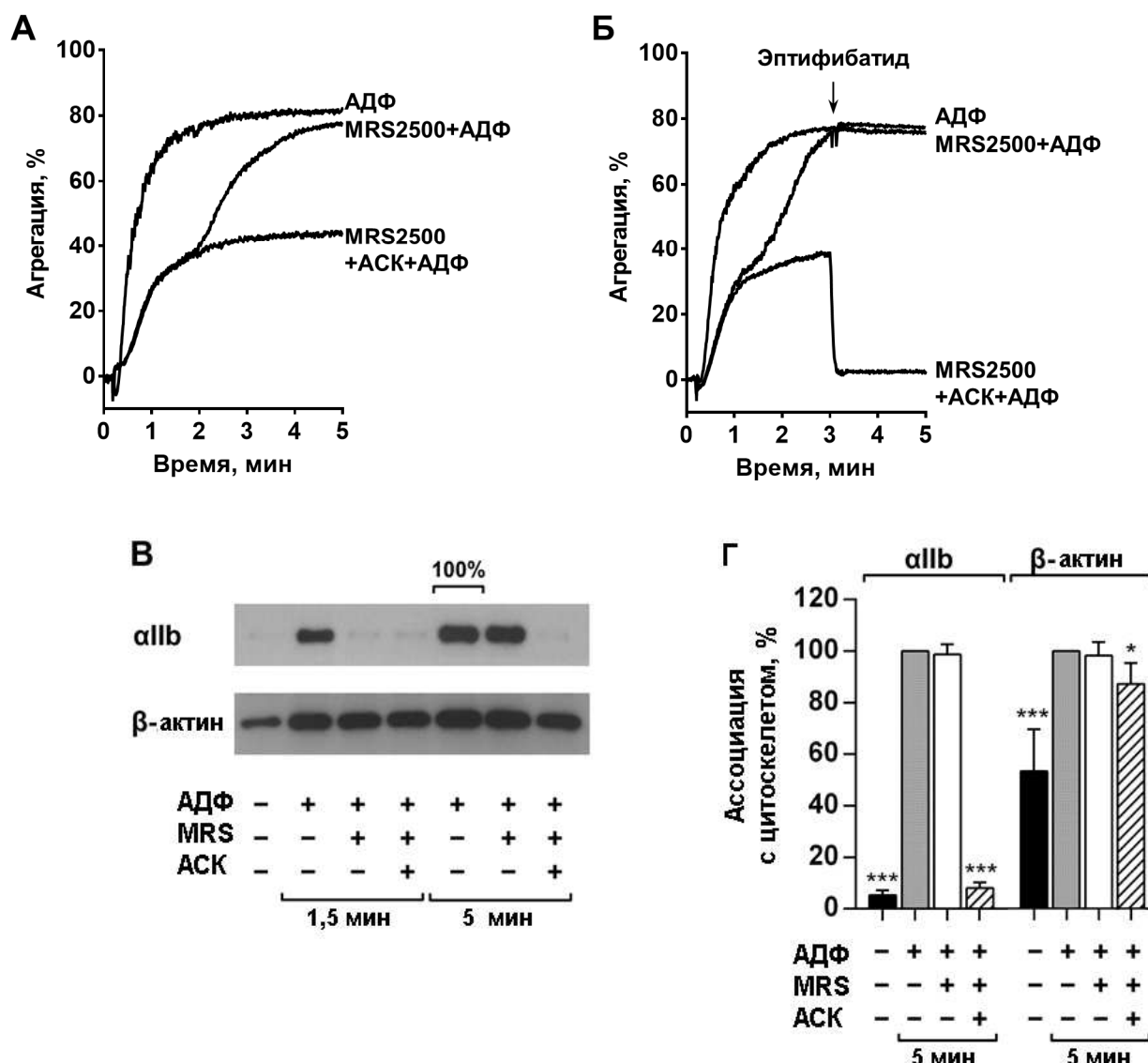
А. Тромбоциты ОТП инкубировали с 10 мкМ AR-C66096 или с PBS (контроль) в течение 10 мин при комнатной температуре и стимулировали 10 мкМ АДФ в течение 5 мин при 37 °С. **Б.** В параллельных экспериментах тромбоциты стимулировали 10 мкМ АДФ и через 3 мин после стимуляции добавляли 4,5 мкМ эптифибатид (отмечено стрелкой), после чего агрегатограмму регистрировали еще в течение 2 мин. Приведены агрегатограммы одного из четырех независимых экспериментов. **В.** В параллельных экспериментах образцы стимулировали, как указано в А, и через указанные промежутки времени после стимуляции образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β-актина и αIIb. Представлены результаты одного из четырех независимых экспериментов. **Г.** Содержание β-актина и αIIb в цитоскелете выражали в процентах от такового в контрольных тромбоцитах спустя 5 мин после стимуляции (100%). Результаты пяти независимых экспериментов представлены как $M \pm SD$. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, сравнение с 100 %; одновыборочный двусторонний t -критерий Стьюдента.

Рисунок 6.9 — Влияние антагониста рецептора P2Y₁₂ на формирование комплекса «фибриноген–интегрин αIIbβ₃–цитоскелет» в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

которой составила $84,9 \pm 7,9 \%$. В образцах, проинкубированных с MRS2500, имела место двухволновую агрегация тромбоцитов. Первая волна продолжалась $1,6 \pm 0,2$ мин и достигала максимальной амплитуды $37,4 \pm 5,6\%$, затем начиналась вторая волна, максимальная амплитуда которой составила $79,4 \pm 8,2\%$. Учитывая, что вторая волна агрегации обусловлена синтезом в тромбоцитах TXA_2 , вызывающего их дополнительную стимуляцию через рецепторы TP , сопряженные с Ga_q и $\text{Ga}_{12/13}$, мы провели дополнительный эксперимент, в котором образцы ОТП, проинкубированные с MRS2500, были также проинкубированы с АСК. Контрольные образцы при этом были также проинкубированы с соответствующими растворителями. Стимуляция тромбоцитов, проинкубированных одновременно с обоими ингибиторами, вызывала устойчивую одноволновую агрегацию тромбоцитов с максимальной амплитудой $41,4 \pm 7,6\%$ (Рисунок 6.10, А).

Добавление эптифибатида в контрольные образцы, а также в образцы, проинкубированные с MRS2500, спустя 3 мин после индукции агрегации тромбоцитов не отражалось на динамике агрегатограммы, тогда как добавление эптифибатида в образцы, проинкубированные одновременно с MRS2500 и АСК, спустя 3 мин после индукции агрегации вызывало стремительную дезагрегацию тромбоцитов со скоростью $122,3 \pm 15,6 \%/ \text{мин}$, что свидетельствует о низкой стабильности образовавшихся агрегатов и низкой прочности связи интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ с фибриногеном (Рисунок 6.10, Б).

Анализ цитоскелетных фракций показал, что цитоскелет контрольных тромбоцитов, стимулированных с помощью АДФ в течение 5 мин, содержал максимальное количество β -актина и αIIb , которое принимали за 100 %. Цитоскелет покоящихся контрольных тромбоцитов содержал $53,3 \pm 16,4\%$ β -актина и следы αIIb . Стимуляция контрольных тромбоцитов в течение 1,5 мин приводила к максимальному накоплению в цитоскелете β -актина и частичному накоплению αIIb , содержание которого составило $70,7 \pm 12,3 \%$. Стимуляция тромбоцитов, проинкубированных с MRS2500, в течение 1,5 мин также приводила к максимальному накоплению в цитоскелете β -актина, но не приводила к ассоциации с цитоскелетом αIIb , тогда как стимуляция этих тромбоцитов в течение 5 мин сопровождалась



А. Тромбоциты ОТП инкубировали с 10 мкМ MRS2500, 0,5 мМ АСК или соответствующими растворителями (фосфатным буфером и 0,2 % этанолом) в течение 10 мин при комнатной температуре и стимулировали 10 мкМ АДФ в течение 5 мин при 37 °С. **Б.** В параллельных экспериментах тромбоциты стимулировали, как указано в А, и через 3 мин после стимуляции добавляли 4,5 мкМ эптифибатид (отмечено стрелкой), после чего агрегатограмму регистрировали еще в течение 2 мин. Приведены агрегатограммы одного из четырех независимых экспериментов. **В.** В параллельных экспериментах образцы стимулировали, как указано в А, и через указанные промежутки времени после стимуляции образцы лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β -актина и αIIb . Представлены результаты одного из четырех независимых экспериментов. **Г.** Содержание β -актина и αIIb в цитоскелете выражали в процентах от такового в тромбоцитах, инкубированных с растворителем и стимулированных АДФ (100 %). Результаты четырех независимых экспериментов представлены как $M \pm SD$. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, сравнение с 100 %; одновыборочный двусторонний t -критерий Стьюдента.

Рисунок 6.10 — Влияние антагониста рецептора P2Y₁ на формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

максимальным накоплением в цитоскелете и β -актина, и $\alpha\Pi\beta$. Стимуляция тромбоцитов, проинкубированных одновременно с MRS2500 и АСК, в течение как 1,5 мин, так и 5 мин приводила к максимальной полимеризации β -актина, но не вызывала ассоциации $\alpha\Pi\beta$ с цитоскелетом (Рисунок 6.10, В, Г).

Таким образом, АСК и антагонисты рецепторов $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ угнетают формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\Pi\beta\beta_3$ –цитоскелет» в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, однако выраженность их угнетающего действия различается. Наименьшее угнетающее действие оказывает антагонист рецептора $P2Y_1$, что выражается лишь в замедлении формирования указанного комплекса. Более существенное угнетение отмечается при использовании АСК, выражающееся в снижении прочности связи между интегринными $\alpha\Pi\beta\beta_3$ и фибриногеном и снижении ассоциации интегринов $\alpha\Pi\beta\beta_3$ с цитоскелетом тромбоцитов. Еще большее угнетение формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\Pi\beta\beta_3$ –цитоскелет» отмечается при одновременном использовании антагониста рецептора $P2Y_1$ и АСК, что выражается в еще большем ослаблении связи между интегринными $\alpha\Pi\beta\beta_3$ и фибриногеном и полном нарушении ассоциации интегринов $\alpha\Pi\beta\beta_3$ с цитоскелетом. Применение антагониста рецептора $P2Y_{12}$ вызывает максимальное угнетение формирования указанного комплекса, о чем свидетельствует спонтанно обратимый характер связи между интегринными $\alpha\Pi\beta\beta_3$ и фибриногеном и отсутствие связи между интегринными $\alpha\Pi\beta\beta_3$ и цитоскелетом.

***Влияние антагониста рецептора $P2Y_{12}$ на формирование комплекса
«фибриноген–интегрин $\alpha\Pi\beta\beta_3$ –цитоскелет» в динамике
АК-индуцированной агрегации тромбоцитов***

Благодаря активности циклооксигеназы-1 тромбоцитов АК, добавляемая в ОТП в качестве индуктора агрегации, быстро превращается в TXA_2 , который и вызывает активацию и агрегацию тромбоцитов, действуя через рецепторы TP , сопряженные с $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha 12/13}$. Активация тромбоцитов сопровождается высвобождением содержимого их гранул. Высвободившийся АДФ вызывает дополнительное усиление

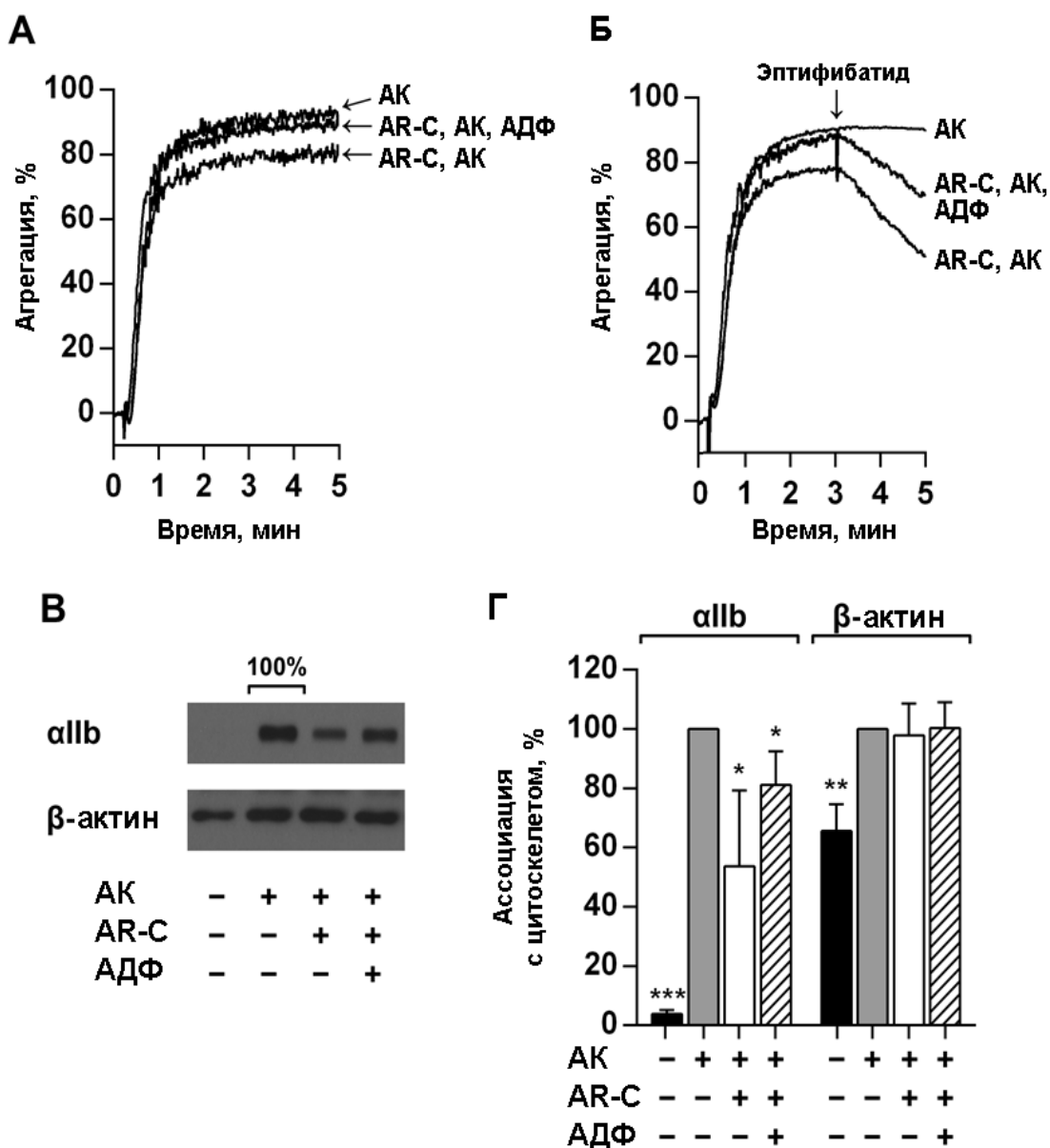
агрегации тромбоцитов через рецептор $P2Y_1$, сопряженный с $G_{\alpha q}$, и рецептор $P2Y_{12}$, сопряженный с $G_{\alpha i_2}$. Следовательно, при использовании АК в качестве индуктора агрегации тромбоцитов, применение антагониста рецептора $P2Y_1$ не предотвратит активацию $G_{\alpha q}$, поскольку активация этого G-белка все равно будет обеспечена действием TXA_2 на рецепторы TP. В отличие от этого применение антагониста рецептора $P2Y_{12}$ предотвратит активацию $G_{\alpha i_2}$, поскольку это G-белок ассоциирован только с этим рецептором тромбоцитов. В связи с этим при индукции агрегации тромбоцитов АК мы исследовали эффекты только антагониста $P2Y_{12}$.

Образцы ОТП инкубировали с 10 мкМ с AR-C66096 или соответствующим растворителем (контроль), после чего добавлением АК индуцировали агрегацию тромбоцитов. В контроле агрегация тромбоцитов составила $89,7 \pm 2,1 \%$. В образцах, проинкубированных с AR-C66096, отмечалась менее выраженная агрегация тромбоцитов, составившая $79,6 \pm 6,9 \%$ (Рисунок 6.11, А).

Добавление эптифибатиды в контрольные образцы спустя 3 мин после стимуляции тромбоцитов не вызывало дезагрегации, тогда как добавление эптифибатиды в образцы, проинкубированные с AR-C66096, вызывало их дезагрегацию со скоростью $14,9 \pm 2,5 \%$ /мин, что свидетельствует о снижении стабильности тромбоцитарных агрегатов и меньшей прочности связи между интегринами $\alpha IIb\beta_3$ и фибриногеном (Рисунок 6.11, Б).

Анализ цитоскелетных фракций показал, что цитоскелет контрольных тромбоцитов, стимулированных АК, содержал максимальное количество β -актина и αIIb , которое принимали за 100 %. Цитоскелет покоящихся тромбоцитов содержал $68,4 \pm 6,6 \%$ β -актина и следы αIIb , а цитоскелет тромбоцитов, проинкубированных с AR-C66096 и стимулированных добавлением АК, содержал максимальное количество β -актина и $53,7 \pm 25,6 \%$ αIIb (Рисунок 6.11, В, Г).

Далее мы исследовали, с чем было связано снижение ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta_3$ с цитоскелетом и снижение прочности их связи с фибриногеном, обнаруженное в присутствии AR-C66096 — с отсутствием сигнализации именно от рецептора $P2Y_{12}$, сопряженного с $G_{\alpha i_2}$, или просто с недостаточной стимуляцией тромбоцитов и снижением их агрегации. Для этого проинкубированные с AR-C66096



А. Тромбоциты ОТП инкубировали с 10 мкМ AR-C66096 или соответствующим растворителем (PBS) в течение 10 мин при комнатной температуре и стимулировали 1,5 мМ арахидоновой кислотой (АК) или смесью 1,5 мМ АК и 10 мкМ АДФ в течение 5 мин при 37 °С. **Б.** В параллельных экспериментах тромбоциты стимулировали, как указано в А, и через 3 мин после стимуляции добавляли 4,5 мкМ эптифибатид (отмечено стрелкой) и агрегатограмму регистрировали еще в течение 2 мин. Приведены агрегатограммы одного из четырех независимых экспериментов. **В.** В параллельных экспериментах образцы стимулировали, как указано в А, и через указанные промежутки времени после стимуляции лизировали добавлением буфера с Тритоном X-100. Нерастворимый материал выделяли и подвергали вестерн-блоттингу с использованием антител против β-актина и αIIb. Представлены результаты одного из четырех независимых экспериментов. **Г.** Содержание β-актина и αIIb в цитоскелете выражали в процентах от такового в тромбоцитах, инкубированных с растворителем и стимулированных АК (100 %). Результаты четырех независимых экспериментов представлены как $M \pm SD$. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, сравнение с 100 %; одновыборочный двусторонний t -критерий Стьюдента.

Рисунок 6.11 — Влияние антагониста рецептора P2Y₁₂ на формирование комплекса «фибриноген–интегрин αIIbβ3–цитоскелет» в динамике АК-индуцированной агрегации тромбоцитов

тромбоциты стимулировали смесью АК и АДФ. В этих условиях помимо стимуляции $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha 12/13}$ через рецепторы TP происходит дополнительная стимуляция $G_{\alpha q}$ через рецептор $P2Y_1$. Двойная стимуляция тромбоцитов, проинкубированных с AR-C66096, приводила к увеличению степени агрегации тромбоцитов до $87,2 \pm 5,2 \%$, что статистически значимо не отличалось от ее значения в контрольных образцах. Несмотря на это, добавление эптифибатида через 3 мин после двойной стимуляции тромбоцитов, проинкубированных с AR-C66096, вызывало дезагрегацию тромбоцитов со скоростью $13,2 \pm 3,6 \%/мин$, что не отличалось от таковой при индукции дезагрегации тромбоцитов, проинкубированных с AR-C66096 и стимулированных только АК. Исследование цитоскелетной фракции тромбоцитов, проинкубированных с AR-C66096 и стимулированных смесью АК и АДФ, показало, что содержание αIIb в цитоскелете увеличивалось на $27,5 \pm 16,8 \%$ по сравнению с таковым в аналогичных образцах, стимулированных только АК, однако это значение было по-прежнему меньше 100% ($P < 0,05$). Следовательно, снижение ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом и снижение прочности связи между $\alpha IIb\beta 3$ и фибриногеном, обнаруженное при стимуляции тромбоцитов АК в присутствии AR-C66096, специфически обусловлено дефицитом сигнализации от рецептора $P2Y_{12}$, сопряженного с $G_{\alpha i_2}$, и не является простым следствием снижения агрегации тромбоцитов.

Следовательно, действие антагониста рецептора $P2Y_{12}$, сопряженного с $G_{\alpha i_2}$, приводит к снижению степени агрегации тромбоцитов, индуцированной АК, снижению прочности связи между интегринными $\alpha IIb\beta 3$ и фибриногеном и снижению ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом. Усиленная стимуляция тромбоцитов смесью АК и АДФ в присутствии антагониста рецептора $P2Y_{12}$ приводит к увеличению степени агрегации тромбоцитов, что, однако, не сопровождается ни увеличением прочности связи между интегринными $\alpha IIb\beta 3$ и фибриногеном, ни значимым увеличением ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом тромбоцитов. Полученные результаты указывают на особую роль сигнализации от рецептора $P2Y_{12}$, сопряженного с $G_{\alpha i_2}$, в формировании комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет».

Резюмируя результаты исследования влияния АСК и антагонистов рецепторов $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ на формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов можно прийти к следующему:

1. Механизм подавления функциональной активности тромбоцитов при использовании АСК и/или антагонистов рецепторов $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ включает нарушение формирования в тромбоцитах комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет», что выражается в снижении прочности связи интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с фибриногеном и снижении их ассоциации с цитоскелетом.
2. Применение антагониста рецептора $P2Y_1$ вызывает меньшее угнетение формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет», чем применение АСК, а одновременное применение АСК и антагониста рецептора $P2Y_1$ вызывает меньшее угнетение формирования указанного комплекса, чем применение антагониста рецептора $P2Y_{12}$ в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Это дает основание полагать, что применение ингибиторов $P2Y_1$ будет связано с меньшим риском геморрагических осложнений, чем применение ингибиторов $P2Y_{12}$.
3. Подавляя агрегацию тромбоцитов в одинаковой мере, разные антитромбоцитарные препараты могут в разной степени угнетать формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет». Поэтому амплитуда агрегации тромбоцитов не всегда дает адекватное представление о степени угнетения функциональной активности тромбоцитов при использовании антитромбоцитарных препаратов. Анализ формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» дает дополнительную информацию о степени подавления функциональной активности тромбоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вклад гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушение гемостатического потенциала крови

В настоящее время в патогенезе травматической коагулопатии выделяют несколько ключевых патогенетических факторов: гемодилюцию, гиперфибринолиз, гипотермию и ацидоз. Поскольку у пациента с тяжелой травмой все эти факторы действуют одновременно, определить вклад каждого из них в развитие травматической коагулопатии крайне сложно. Кроме того, на момент поступления в стационар эффекты, вызываемые разными патогенетическими факторами, оказываются замаскированными вследствие начала реанимационных мероприятий на догоспитальном этапе. Тем не менее знать о том, каково влияние гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза на гемостатический потенциал крови необходимо для понимания патогенеза травматической коагулопатии и разработки патогенетически обоснованных методов его коррекции.

Чтобы выделить эффекты, производимые вышеуказанными патогенетическими факторами на систему гемостаза, а также оценить их взаимодействие, мы создали модель травматической коагулопатии *in vitro*. Для этого мы использовали кровь здоровых добровольцев, которую разводили Трис-буферизированным 0,9 % раствором хлорида натрия (рН 7,4). Гиперфибринолиз, гипотермию и ацидоз моделировали в разведенной крови. Решение об использовании гемодилюции как базового компонента нашей модели было принято исходя из того, что острая массивная кровопотеря всегда требует скорейшего возмещения объема потерянной крови с целью поддержания сердечного выброса и органно-тканевого кровотока, а следовательно, гемодилюция в той или иной мере обязательно присутствует у каждого пациента с тяжелой травмой. Поскольку в большинстве случаев в качестве объемзамещающего раствора используют 0,9 % раствор хлорида натрия [212], именно он и был выбран для моделирования гемодилюции. В различных сериях экспериментов гемодилюция составляла 30, 40 или 60 %. Такая гемодилюция возникает в результате коррекции волемии с помощью указанного раствора у

взрослого пациента, потерявшего около 1,5, 2 или 3 л крови соответственно [80]. Несмотря на то что согласно тактике *damage control resuscitation*¹, принятой на сегодняшний день в мировом сообществе, объем инфузии кристаллоидов при тяжелых травмах рекомендуется ограничить 1–1,5 л, в отечественной клинической практике эта тактика соблюдается далеко не всегда, и объем инфузии кристаллоидов нередко достигает 5 л, а в некоторых случаях — 7–8 л и более [5, 24, 25]. Хотя волемический эффект кристаллоидных растворов непродолжителен, их введение с большой скоростью и в столь большом объеме приводит к значительной гемодилюции, близкой к таковой в нашей модели [80].

Прежде всего мы проанализировали влияние гемодилюции на показатели скрининговой коагулограммы, генерацию тромбина и формирование кровяного сгустка. Проведенные исследования показали, что 30 % гемодилюция не оказывает влияния на ПВ и АЧТВ, а 60 % гемодилюция вызывает их увеличение. Эти данные хорошо согласуются с результатами других авторов, которые в аналогичных экспериментах *in vitro* показали, что статистически значимое увеличение ПВ наступает при разведении крови на 70 % и более, а увеличение АЧТВ — на 80 % и более [108], а также с результатами авторов, которые в экспериментах на свиньях показали, что замещение 35 % ОЦК кристаллоидным раствором не отражается на продолжительности ПВ и АЧТВ [238]. Для интерпретации полученных результатов отметим, что при определении ПВ и АЧТВ в исследуемую плазму добавляют индуктор соответствующего пути свертывания, что приводит к генерации тромбина и образованию сгустка. При этом важной особенностью этих тестов является то, что их значения считываются уже тогда, когда образуется лишь около 5 % от общего количества тромбина [235], а также то, что снижение концентрации фибриногена в плазме до 1,0–1,5 г/л не оказывает влияния на их значения [379]. Иными словами, ПВ и АЧТВ, прежде всего, отражают время, необходимое для начала генерации тромбина, и свидетельствуют о скорости реакций, катализируемых теназными и протромбиназным комплексами. Следовательно, отсутствие значи-

¹ Основанная на доказательствах надлежащая тактика оказания реаниматологической помощи при тяжелых травмах.

мых изменений ПВ и АЧТВ при 30 % гемодилюции косвенно указывает на нормальную ферментативную активность указанных комплексов, а увеличение ПВ и АЧТВ при 60 % гемодилюции — на некоторое ее снижение.

Мы также показали, что 30 % разведение крови не отражается на ключевых показателях теста генерации тромбина, а 60 % разведение приводит к небольшому снижению пиковой концентрации тромбина и замедлению последующего ингибирования генерации тромбина, так что в итоге эндогенный тромбиновый потенциал не претерпевает существенных изменений. Иными словами, имеет место некоторое изменение временной динамики генерации тромбина без изменения суммарного количества образующегося тромбина. Схожие изменения динамики генерации тромбина при разведении крови *in vitro* различными кристаллоидными растворами были показаны и другими авторами [70, 80, 147]. Полученные нами результаты также согласуются с данными о сохранении генерации тромбина на высоком и даже повышенном уровне при тяжелой травме [117] и гемодилюции [17, 48].

При исследовании формирования кровяного сгустка методом ротационной тромбоэластометрии мы установили, что разведение крови на 30, 40 и 60 % не отражается на продолжительности времени свертывания, т. е. на времени, необходимом для генерации тромбина и начала конверсии фибриногена в фибрин. Полученные нами результаты согласуются с результатами других авторов, которые показали, что разведение крови *in vitro* с помощью 0,9 % раствора хлорида натрия и других кристаллоидов на 30, 60 и даже на 80 % [107, 108], а также замещение 35 % ОЦК свиней кристаллоидным раствором не отражается на продолжительности аналогичного показателя тромбоэластограммы [238]. Однако другие исследователи отмечали, что разведение крови кристаллоидами на 60 % приводит к увеличению времени свертывания [70, 147]. В то же время наблюдения этих авторов согласуются с полученными нами данными о некотором увеличении ПВ и АЧТВ при 60 % гемодилюции, а также с данными других авторов о наличии корреляционной связи между показателем времени свертывания тэмограммы и ПВ или АЧТВ [315].

В целом анализ результатов скрининговых тестов (ПВ и АЧТВ), показателей теста генерации тромбина и показателя времени свертывания при ротационной

тромбоэластометрии свидетельствует о том, что в условиях гемодилюции генерация тромбина поддерживается на достаточно высоком уровне. Это может быть обусловлено рядом причин. Во-первых, несмотря на то что при гемодилюции уровень всех плазменных компонентов системы гемостаза снижается пропорционально, эффект от снижения уровня антитромбина (антитромбина III) превышает эффект от снижения уровня факторов свертывания. Это приводит к увеличению продолжительности полужизни тромбина и FXa и способствует поддержанию гемостатического потенциала крови [117, 342]. Во-вторых, при обширных операциях и травмах в крови пациентов повышается уровень различных прокоагулянтов, высвобождаемых поврежденными и активированными клетками. Например, отмечается повышение в плазме уровня тканевого фактора [322], прокоагулянтных микрочастиц тромбоцитарного, моноцитарного и эндотелиального происхождения [243]. В-третьих, для нормальной генерации тромбина достаточно 30 % от нормальной активности факторов свертывания [308]. Следовательно, при умеренной гемодилюции уровень факторов свертывания остается достаточным для полноценной генерации тромбина. В-четвертых, при гемодилюции снижается концентрация фибриногена, а следовательно, уменьшается и количество фибрина, содержащего несубстратные сайты (антитромбин I) для связывания тромбина и FXa [373]. Это приводит к уменьшению секвестрации тромбина в кровяном сгустке и повышению его концентрации в системном кровотоке.

Дальнейший анализ тэмограмм показал, что гемодилюция приводит к замедлению роста кровяного сгустка и снижению его максимальной плотности. Аналогичные изменения в формировании кровяного сгустка при гемодилюции были показаны и другими исследователями в экспериментах *in vitro* [70, 147, 308], в экспериментах на животных *in vivo* [238], а также у пациентов с дилуционной коагулопатией в различных клинических исследованиях [267]. Наиболее вероятно, указанные изменения в формировании кровяного сгустка были обусловлены снижением концентрации фибриногена в плазме, поскольку при гемодилюции уровень фибриногена достигает критически низкого значения раньше других факторов свертывания [165] и поскольку концентрация фибриногена является одним из

основных факторов, определяющих скорость образования фибрина и плотность фибриновой сети. Установлено, что снижение концентрации фибриногена приводит к формированию более рыхлой фибриновой сети, состоящей из толстых, мало переплетенных нитей фибрина [203, 317], что неизбежно отражается на свойствах кровяного сгустка.

Кроме концентрации фибриногена, на процесс формирования и свойства кровяного сгустка могут оказывать влияние концентрация тромбина, активность FXIII и содержание тромбоцитов в единице объема крови. Однако, как мы уже отметили выше, даже 60 % гемодилюция не вызывает значимого снижения генерации тромбина. Поскольку разведение крови *in vitro* приводит к пропорциональному снижению концентрации всех компонентов плазмы, при 60 % гемодилюции концентрация FXIII должна была быть около 40 %, что считается достаточным для «сшивания» нитей фибрина друг с другом и обеспечения плотности сгустка [247]. Содержание тромбоцитов при 30 % гемодилюции было в пределах нормальных значений, а при 60 % гемодилюции — превышало $100 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, что считается клинически не значимым снижением. Таким образом, влияние этих факторов в исследуемой модели, скорее всего, было незначительным, а следовательно, главную роль в снижении скорости формирования и плотности сгустка сыграло именно снижение концентрации фибриногена в разведенной крови.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что гемодилюция, прежде всего, приводит снижению скорости формирования и плотности кровяного сгустка, что обусловлено снижением концентрации фибриногена в крови, и в меньшей степени влияет на ферментативную активность теназных и протромбиназного комплексов и генерацию тромбина.

Как известно, острая массивная кровопотеря приводит к возникновению условий, способствующих генерации плазмина [2, 70]. При этом одни из главных механизмов развития гиперфибринолиза является высвобождение большого количества tPA из активированных эндотелиальных клеток [83, 91]. Гиперфибринолиз обнаруживается у 7–20 % пациентов с тяжелыми травмами еще до начала интенсивной терапии [231]. Гемодилюция, обусловленная введением больших объемов

кристаллоидных растворов, способствует усилению фибринолитической активности плазмы [71]. В связи с этим мы изучили влияние tPA-индуцированного гиперфибринолиза на формирование кровяного сгустка и функции тромбоцитов в условиях гемодилюции. Проведенные исследования показали, что добавление в разведенную кровь tPA не только вызывает лизис кровяного сгустка, но и приводит к дополнительному снижению максимальной плотности сгустка. Последнее обусловлено, вероятно, тем, что формирование сгустка происходило на фоне нарастающей генерации плазмина, а следовательно, лизис кровяного сгустка начинался еще до окончания его формирования, так что сгусток не успевал достичь своей потенциальной максимальной плотности. Поскольку генерация плазмина не препятствует генерации тромбина и превращению фибриногена в фибрин, добавление в разведенную кровь tPA не влияло на время свертывания и начальную скорость формирования сгустка.

На момент госпитализации гипотермия обнаруживается у 10–66 % пациентов с политравмой [161, 377]. Для изучения влияния гипотермии на формирование и лизис кровяного сгустка температуру разведенной крови при проведении тромбоэластометрии снижали до 31 °С. Исследования показали, что гипотермия в условиях гемодилюции вызывает снижение скорости формирования сгустка, не оказывая при этом влияния на его итоговую максимальную плотность. Замедление формирования кровяного сгустка при гипотермии было показано и в ряде других исследований [113, 195, 303, 316]. Одной из наиболее вероятных причин этого является снижение активности факторов свертывания, поскольку известно, что снижение температуры реакционной смеси на 1 °С приводит к снижению скорости ферментативных реакций на 10 % [377]. О снижении активности факторов свертывания при гипотермии свидетельствуют многочисленные исследования *in vitro*, в которых показано, что снижение температуры крови приводит к увеличению АЧТВ [310], снижению активности теназного комплекса внешнего пути [248] и снижению генерации тромбина [391]. Кроме того, в модели травматической коагулопатии на животных было показано, что гипотермия вызывает увеличение ПВ и АЧТВ [238] и задержку генерации тромбина [237]. При этом отметим, что концентрация

тромбина является одним из важнейших факторов, влияющих на кинетику превращения фибриногена в фибрин, образование фибриновых протофибрилл и их латеральную агрегацию, что отражается на процессе формирования кровяного сгустка [390]. В тоже время данные о влиянии гипотермии на плотность сгустка несколько противоречивы. Если в одних исследованиях показано, что снижение температуры крови до 31 °С [316] и 32 °С [195] не приводит к изменению плотности сгустка, что согласуется с нашими результатами, то в других — что снижение температуры крови до 32 °С, наоборот, увеличивает плотность сгустка [303].

Проведенные нами исследования также показали, что в условиях гемодилюции и гиперфибринолиза гипотермия замедляет не только формирование, но и лизис сгустка. И то, и другое, вероятно, обусловлено снижением скорости ферментативных реакций коагуляционного и фибринолитического звеньев системы гемостаза при снижении температуры крови. В пользу этого предположения свидетельствует усиление фибринолиза в условиях гипертермии [330]. Мы также показали, что активация фибринолиза в условиях гемодилюции и гипотермии потенцирует снижение максимальной плотности кровяного сгустка, что объясняется началом его лизиса еще до окончания формирования. В то же время показано, что гипотермия не оказывает существенного влияния на выраженность фибринолиза у пациентов с травмой [384], однако отметим, что температура тела пациентов с гипотермией, включенных в это исследование, была не менее 33 °С, тогда как в наших экспериментах температура крови во всех образцах составляла 31 °С, т. е. влияние гипотермии в наших условиях было более выраженным. Учитывая, что показатели ротационной тромбоэластометрии существенно зависят от температуры образца крови, для адекватной оценки формирования, плотности и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка у пациента, а также эффективности применения гемостатических средств указанный тест целесообразно проводить при температуре, равной реальной температуре тела пациента.

Метаболический ацидоз встречается у 40–89 % пациентов с тяжелыми травмами [93, 341, 353]. Несмотря на то что ацидоз считается важным патогенетическим фактором травматической коагулопатии, в настоящем исследовании мы

не обнаружили изменений скорости формирования и плотности кровяного сгустка, а также его фибринолитической устойчивости при снижении рН разведенной крови до 7,0–7,1 вне зависимости от температуры и фибринолитической активности крови. Полученные результаты частично согласуются с данными других авторов, показавших, что снижение рН крови *in vitro* до такого же уровня само по себе не влияет на формирование и плотность кровяного сгустка, но потенцирует эффекты гипотермии, заключающиеся в снижении скорости формирования и плотности сгустка [113]. В другом исследовании установлено, что снижение рН крови *in vitro* до 7,0–7,2 приводит к снижению скорости формирования сгустка, но не вызывает изменений его максимальной плотности. Отмечается также наличие сильной прямой корреляционной связи между рН крови и скоростью формирования кровяного сгустка [119]. В модели травматической коагулопатии на свиньях было показано, что снижение рН крови *in vivo* до 7,1 приводит к снижению скорости формирования сгустка, но не отражается на его максимальной плотности и скорости лизиса [237]. В отличие от этого другие исследователи в опытах *in vitro* показали, что снижение рН до 6,95 вызывает не только замедление формирования сгустка, но и снижает его максимальную плотность [303]. Неполное совпадение полученных нами результатов с результатами других авторов может быть обусловлено использованием различных экспериментальных моделей, различными способами индукции формирования кровяного сгустка, различной степенью снижения рН. Кроме того, определенную роль могло сыграть использование различных реагентов для создания ацидоза (молочная кислота, соляная кислота, натрий-фосфатный буфер и др.). По мнению некоторых авторов, гиперхлоремический ацидоз, вызываемый инфузией раствора хлорида натрия, иначе влияет на генерацию тромбина, по сравнению с лактат-ацидозом, обусловленным гипоперфузией тканей [339].

Таким образом, анализ эффектов, вызываемых гиперфибринолизом, гипотермией и ацидозом по отдельности и в сочетании друг с другом в условиях гемодилюции, позволил установить, что индукция фибринолиза потенцирует вызванное гемодилюцией снижение плотности кровяного сгустка и вызывает его лизис.

Гипотермия потенцирует вызванное гемодилюцией снижение скорости формирования кровяного сгустка, а при сочетании гемодилюции с гиперфибринолизом гипотермия потенцирует еще и снижение плотности кровяного сгустка, но в то же время замедляет его лизис. Ацидоз при этом не оказывает влияния на формирование и лизис кровяного сгустка.

Экстраполяция полученных результатов на клиническую ситуацию, безусловно, требует осторожности. В частности, если в условиях *in vitro* гемодилюция приводит к пропорциональному изменению концентрации всех компонентов крови [70, 333], то *in vivo* изменения их концентрации не столь предсказуемы. Так, например, при небольшой гемодилюции концентрация FVIII и VWF может оставаться какое-то время на достаточно высоком уровне вследствие их дополнительного высвобождения эндотелиальными клетками под влиянием адреналина, вазопрессина и других гормонов, выделяющихся в кровь при стрессе [380]. Кроме того, наша модель не учитывает возможного влияния на систему гемостаза различных лекарственных препаратов, используемых во время оперативного вмешательства.

В целом полученные нами результаты позволяют не только лучше понять вклад гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза в нарушение гемостатического потенциала крови при травматической коагулопатии, но и указывают на целесообразность дифференцированного подхода к гемостатической терапии в зависимости от того, какие именно из вышеуказанных патогенетических факторов участвуют в развитии кровотечения. В частности, в условиях гемодилюции терапия должна быть направлена, прежде всего, на коррекцию скорости формирования и плотности кровяного сгустка, а при наличии гиперфибринолиза — еще и на подавление избыточной фибринолитической активности плазмы и повышение фибринолитической устойчивости кровяного сгустка.

***Возможности коррекции гемостатического потенциала крови
в условиях гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза***

Европейские рекомендации по ведению пациентов с большим кровотечением и коагулопатией в результате травмы предусматривают возможность применения ТКК, концентрата фибриногена и КПК для экстренной коррекции гемостатического потенциала крови [346], однако их клиническая эффективность показана не во всех исследованиях. Одной из возможных причин неэффективности указанных препаратов в ряде случаев является их использование в небольших дозах, что объясняется стремлением не допустить значительного увеличения риска тромботических осложнений, особенно у пациентов с предрасположенностью к тромбозам [226]. Это обуславливает необходимость поиска оптимальных доз и схем применения указанных препаратов, при которых они обеспечили бы необходимый терапевтический эффект и в то же время не вызвали бы значимого увеличения риска нежелательных побочных эффектов. В настоящем исследовании мы предположили, что это может быть достигнуто путем комбинированного применения ТКК, концентрата фибриногена и АКПК в малых дозах, в которых по отдельности они не вызывают заметного терапевтического эффекта. Данное предположение было основано на возможности синергетического взаимодействия препаратов с разным механизмом действия. В связи с этим мы изучили влияние комбинаций ТКК, концентрата фибриногена и АКПК в субэффективных конечных концентрациях на формирование кровяного сгустка в модели травматической коагулопатии *in vitro*, включающей гемодилюцию, tPA-индуцированный гиперфибринолиз, гипотермию и ацидоз.

Чтобы определить субэффективные концентрации гемостатических препаратов, мы исследовали зависимость вызываемых ими эффектов от их конечной концентрации. Поскольку болюсное внутривенное введение 1 г ТКК взрослому человеку теоретически должно создавать начальную концентрацию этого препарата в плазме около 400 мкг/мл с последующим снижением в течение часа до 28,7 мкг/мл [145], мы изучили влияние ТКК на формирование и лизис сгустка в диапазоне ее концентраций в плазме от 47,5 до 380 мкг/мл. Проведенные

исследования показали, что применение ТКК во всем диапазоне концентраций вызывает прогрессирующее угнетение фибринолиза и, начиная с концентрации 95 мкг/мл, — увеличение плотности кровяного сгустка. Последнее, вероятно, объясняется тем, что в нашей модели свертывание крови и фибринолиз индуцировались практически одновременно, так что формирование сгустка происходило на фоне нарастающей фибринолитической активности плазмы. В этих условиях добавление в кровь ТКК препятствовало генерации плазмина, в результате чего равновесие между процессами формирования и лизиса сгустка смещалось в сторону его формирования. При этом в качестве субэффективной концентрации ТКК были выбрана концентрация 47,5 мкг/мл.

Рекомендованная доза концентрата фибриногена для взрослого человека с тяжелой травмой составляет 3–4 г [346]. Это обеспечивает увеличение концентрации фибриногена в плазме на 0,73–0,97 мг/мл¹. В связи с этим мы изучили влияние этого препарата на формирование и лизис кровяного сгустка, добавляя его в кровь так, чтобы концентрация добавленного фибриногена в плазме составила от 0,375 до 1,5 мг/мл. Исследования показали, что начиная с концентрации 0,75 мг/мл повышение концентрации фибриногена приводило к увеличению максимальной плотности сгустка, что объясняется формированием более плотной фибриновой сети, состоящей из тонких и сильно переплетенных нитей фибрина [203]. При этом отсутствовали значимые изменения фибринолитической устойчивости кровяного сгустка. Последнее, вероятно, объясняется тем, что увеличение количества нитей фибрина сопровождается пропорциональным увеличением в нем количества остатков лизина, служащих для связывания tPA и плазминогена и способствующих их более эффективному взаимодействию [374]. Иными словами, эффект уплотнения сгустка компенсировался усилением генерации плазмина на поверхности фибриновых нитей, в результате чего время начала лизиса сгустка не изменилось. По результатам проведенного эксперимента в качестве субэффективной концентрации добавленного фибриногена была выбрана концентрации 0,375 мг/мл.

¹ Согласно инструкции к препарату прирост концентрации фибриногена в плазме (в мг/дл) = доза (в мг/кг) × 1,7.

АКПК у пациентов с травмой в настоящее время не применяется из-за вероятного повышения риска тромботических осложнений. Неактивированные КПК при тяжелых травмах используются для реверсии эффектов оральных антикоагулянтов в дозе 25–50 ЕД/кг. Исходя из того, что введение АКПК в дозе 50 ЕД/кг создает его концентрацию в плазме около 1,4 ЕД/мл, мы изучили влияние этого препарата на формирование и лизис сгустка в диапазоне конечных концентраций в плазме от 0,33 до 2,64 ЕД/мл. Исследования показали, что применение АКПК, начиная с концентрации 1,32 ЕД/мл, вызывает прогрессирующее увеличение плотности сгустка и, начиная с концентрации 0,66 ЕД/мл, — угнетение его лизиса, что могло быть обусловлено усилением генерации тромбина на мембране тромбоцитов и, как следствие, образованием более плотной фибриновой сети [168, 371]. По результатам проведенного эксперимента в качестве субэффективной концентрации АКПК были выбраны концентрации 0,33 ЕД/мл.

Дальнейшие исследования показали, что комбинированное применение ТКК и концентрата фибриногена в субэффективных концентрациях, в которых по отдельности они не вызывали изменений плотности кровяного сгустка, приводило к статистически значимому увеличению этого показателя, что свидетельствует о синергетическом взаимодействии препаратов. При этом время начала лизиса сгустка уменьшалось по сравнению с таковым при использовании ТКК отдельно, что указывает на ослабление ее антифибринолитического эффекта при повышении концентрации фибриногена в плазме и свидетельствует, наоборот, об антагонистическом взаимодействии этих препаратов. Мы также показали, что дальнейшее увеличение концентрации фибриногена приводило к еще большему ослаблению антифибринолитического действия ТКК, тогда как увеличение концентрации ТКК позволяло нивелировать указанный эффект фибриногена.

Наиболее вероятно, в основе этого феномена лежит конкуренция между ТКК и фибрином за связывание плазминогена и tPA. Добавление фибриногена приводит к увеличению количества фибрина в сгустке, а следовательно, и количества остатков лизина на поверхности фибриновых нитей, служащих сайтами для связывания плазминогена и tPA. В результате больше плазминогена и tPA связывается с

фибрином и меньше — с ТКК, в итоге ее антифибринолитическое действие становится менее выраженным. И наоборот, увеличение концентрации ТКК, являющейся синтетическим аналогом лизина, приводит к увеличению количества альтернативных сайтов для связывания плазминогена и tPA. Чем больше концентрация ТКК в крови, тем больше плазминогена и tPA связывается с ТКК и меньше — с фибрином и тем меньше плазмينا в итоге образуется в сгустке [171, 245, 360]. При этом необходимо отметить, что несмотря на ослабление антифибринолитического эффекта ТКК в присутствии концентрата фибриногена, в целом он оставался достаточно выраженным и статистически значимым. При анализе литературы по данному вопросу мы обнаружили только одно исследование, в котором изучалось влияние ТКК и концентрата фибриногена на качества кровяного сгустка при травме. В этом исследовании было показано, что введение животным ТКК вне зависимости от последующего введения концентрата фибриногена вызывало угнетение лизиса сгустка. При этом не отмечается, были ли различия в выраженности этого эффекта при использовании ТКК отдельно и в комбинации с концентратом фибриногена [395].

Одновременное добавление в кровь АКПК и ТКК в субэффективных концентрациях вызывало синергетическое увеличение плотности кровяного сгустка, однако степень угнетения лизиса сгустка не отличалась от таковой при использовании ТКК отдельно. Увеличение плотности сгустка в данном случае, вероятно, было обусловлено тем, что АКПК усиливал генерацию тромбина, а чем больше концентрация тромбина, тем тоньше нити фибрина, тем больше степени их переплетения и тем плотнее сгусток, а ТКК препятствовала генерации плазмينا на нитях фибрина, в результате чего равновесие между процессами их образования и лизиса смещалось в сторону образования фибрина.

При одновременном добавлении в кровь концентрата фибриногена и АКПК в субэффективных концентрациях, в которых по отдельности они какого-либо эффекта не вызывали, отмечалось увеличение и максимальной плотности сгустка, и его фибринолитической устойчивости, что свидетельствует о синергетическом взаимодействии указанных препаратов. Синергизм в действии этих гемостатиков

можно объяснить тем, что добавлении в кровь АКПК приводило к усилению генерации тромбина и увеличению скорости конверсии фибриногена в фибрин, тогда как повышение концентрации фибриногена (основного субстрата тромбина) — к дополнительному увеличению скорости этой ферментативной реакции.

Наибольшая коррекция формирования кровяного сгустка отмечалась при одновременном использовании всех трех гемостатических препаратов, при этом значения максимальной плотности сгустка приближались к таковым в нормальной интактной крови. Необходимо, однако, отметить, что вопрос о том, какие именно значения показателей формирования и лизиса сгустка должны быть достигнуты при проведении целенаправленной гемостатической терапии у пациентов с травмой, по-прежнему остается открытым. Те значения, которые используются сегодня в различных алгоритмах, основываются на ретроспективных данных и экспертных мнениях и варьируют от клиники к клинике.

Таким образом, коррекция формирования кровяного сгустка в условиях гемодилюции, гиперфибринолиза, гипотермии и ацидоза может быть достигнута путем комбинированного применения ТКК, концентрата фибриногена и АКПК в субэффективных концентрациях. При этом наибольший антифибринолитический эффект вызывает ТКК, однако выраженность этого эффекта снижается по мере увеличения концентрации фибриногена в плазме, что необходимо учитывать при определении дозы этих препаратов. В целом полученные данные дают основания полагать, что необходимая эффективность гемостатической терапии может быть достигнута при одновременном использовании вышеуказанных препаратов даже в небольших дозах, в которых по отдельности они не вызывают заметного корригирующего эффекта. В свою очередь снижение дозы гемостатиков может привести к снижению риска тромботических и других осложнений.

Несмотря на то что применение концентратов факторов свертывания для купирования кровотечений у пациентов с травмой возрастает, клиническая эффективность этих препаратов показана не во всех исследованиях. Одной из возможных причин их невысокой эффективности в ряде случаев является недостаточный учет степени гемодилюции и уровня фибринолитической активности плазмы у

пациента. В связи с этим мы исследовали влияние концентрата фибриногена, концентрата FXIII и TAFI (как потенциального антифибринолитика) на формирование и лизис кровяного сгустка зависимости от степени гемодилюции и наличия гиперфибринолиза.

Проведенные исследования показали, что в условиях гемодилюции повышение концентрации фибриногена в плазме на 3 мг/мл не отражается на продолжительности ПВ и АЧТВ, что объясняется их низкой чувствительностью к изменению концентрации фибриногена, особенно к ее повышению. Показатели теста генерации тромбина также не претерпевали значимых изменений, что было ожидаемо также ввиду нечувствительности теста к изменению концентрации фибриногена в плазме. В отличие от этого имела место существенная коррекция ТВ, а также коррекция скорости формирования и плотности кровяного сгустка. При сочетании гемодилюции с tPA-индуцированным гиперфибринолизом добавление фибриногена вызывало умеренный антифибринолитический эффект, а также полную коррекцию скорости формирования сгустка и частичную коррекцию его максимальной плотности.

Коррекция ТВ и скорости формирования сгустка, наиболее вероятно, объясняется увеличением скорости катализируемой тромбином реакции превращения фибриногена в фибрин вследствие повышения концентрации субстрата данной ферментативной реакции — фибриногена [301]. Увеличение максимальной плотности сгустка при этом могло быть обусловлено образованием более плотной фибриновой сети, состоящей из тонких и в большей степени переплетенные нити фибрина. Менее выраженная коррекция плотности сгустка в условиях индуцированного гиперфибринолиза, вероятно, объясняется тем, что процессу уплотнения кровяного сгустка препятствовал параллельно развивающийся процесс его лизиса, в результате чего лизис сгустка начинался еще до того, как была достигнута его потенциальная максимальная плотность. Наши исследования подтверждают необходимость поддержания концентрации фибриногена в крови на высоком уровне для коррекции гемостатического потенциала крови в условиях гемодилюции. При сочетании гемодилюции с гиперфибринолизом применения концентрата фибрино-

гена недостаточно для максимальной коррекции гемостатического потенциала крови.

Проведенные исследования показали, что в условиях гемодилюции повышение концентрации FXIII в плазме на 2 МЕ/мл не отражается на показателях коагулограммы (ПВ, АЧТВ и ТВ) и теста генерации тромбина, что было вполне ожидаемо, поскольку эти тесты не зависят от уровня FXIII в плазме. Добавление FXIII в разведенную кровь не отражалось и на формировании кровяного сгустка, что было показано и в других аналогичных моделях травматической и гемодилюционной коагулопатии [152, 329]. В отличие от этого при сочетании гемодилюции с tPA-индуцированным гиперфибринолизом добавление FXIII вызывало частичную коррекцию плотности сгустка и оказывало отчетливый антифибринолитический эффект, более выраженный, чем при добавлении фибриногена. По данным других авторов, коррекция плотности сгустка отмечалась и при добавлении FXIII в кровь, полученную от пациентов после завершения кардиохирургической операции, у которых отмечалось снижение FXIII с одновременным повышением фибринолитической активности плазмы [361]. Эти данные, позволяют сделать вывод о том, что необходимой предпосылкой для реализации терапевтического эффекта FXIII в условиях гемодилюции является развитие гиперфибринолиза.

Результаты исследования эффектов FXIII при гемодилюции также дают основания полагать, что для реализации двух основных функций FXIII — уплотнение кровяного сгустка, достигаемое «сшиванием» молекул фибрина друг с другом, и повышение фибринолитической устойчивости сгустка, достигаемое связыванием естественных антифибринолитиков с нитями фибрина, — необходим разный уровень активности FXIII в крови. В частности, для максимального «сшивания» молекул фибрина достаточно той активности FXIII, которая сохраняется даже при 60 % гемодилюции, поскольку добавление FXIII в разведенную кровь (в отсутствие индуцированного фибринолиза) не оказывает заметного влияния на плотность сгустка. В отличие от этого для полноценной реализации антифибринолитической функции необходима большая активность FXIII по

сравнению с той, которая остается при гемодилюции, поскольку в условиях индуцированного фибринолиза добавление FXIII увеличивало плотность сгустка и замедляло его лизис. Возможно, что недостаточно высокая фибринолитическая активность и является одной из причин недостаточной эффективности применения концентрата FXIII в виде монотерапии в клинических исследованиях [188]. Следовательно, при принятии решения о назначении концентрата FXIII необходимо учитывать не только уровень FXIII в плазме пациента, но и степень фибринолитической активности.

Исследования также показали, что одновременное применение концентратов фибриногена и FXIII в условиях гемодилюции при отсутствии гиперфибринолиза не имеет смысла, поскольку эффект комбинации этих препаратов не отличается от эффекта концентрата фибриногена. Эти результаты еще раз подчеркивают, что гемостатический эффект FXIII в условиях гемодилюции сводится прежде всего к увеличению фибринолитической устойчивости кровяного сгустка.

ТАFI (карбоксипептидаза B2, карбоксипептидаза U, карбоксипептидаза R, активируемый тромбином ингибитор фибринолиза) является одним из важнейших естественных антифибринолитических факторов. Под влиянием комплекса тромбин–тромбомодулин (и в меньшей степени под влиянием свободного тромбина и пламина) ТАFI превращается в активную форму (ТАFIa) и отщепляет С-концевые остатки лизина от молекул фибрина, что ограничивает возможность взаимодействия tPA и пламиногена на поверхности фибриновых нитей и, как следствие, снижает генерацию пламина [229]. Активации всего 1–2 % содержащегося в плазме ТАFI достаточно для полумаксимального ингибирования tPA-индуцируемой активации пламиногена, в связи с чем ТАFI признается главным регулятором этого процесса в организме [124]. Показано, что снижение уровня ТАFI в плазме ассоциировано с повышением чувствительности кровяного сгустка к tPA-индуцированному фибринолизу [100] и увеличенным объемом кровопотери при проведении хирургических операций [271]. В качестве гемостатического средства ТАFI в настоящее время в клинической практике не применяется. У здорового человека концентрация ТАFI в плазме составляет в среднем 1 ЕД/мл [149].

В нашем исследовании ТАФИ добавляли в разведенную кровь так, чтобы конечная концентрация в плазме добавленного ТАФИ была 2 ЕД/мл. Проведенные исследования показали, что добавление ТАФИ в разведенную кровь не оказывало какого-либо влияния на генерацию тромбина, что было вполне ожидаемо, поскольку ТАФИ не оказывает влияния на формирование теназных или протромбиназного комплексов. При отсутствии индуцированного фибринолиза ТАФИ не оказывает какого-либо заметного влияния на формирование кровяного сгустка, однако при tPA-индуцированном фибринолизе вызывает частичную коррекцию плотности сгустка и оказывает отчетливый антифибринолитический эффект, более выраженный, чем при добавлении в кровь фибриногена или FXIII. Неэффективность ТАФИ при отсутствии фибринолиза объясняется, тем, что механизм действия ТАФИ направлен, прежде всего, на снижение tPA-индуцированного превращения плазминогена в плазмин. Увеличение плотности кровяного сгустка при добавлении ТАФИ, вероятно, было обусловлено уменьшением генерации плазмينا на фибриновых нитях в процессе формирования сгустка.

Одновременное добавление в разведенную кровь концентрата FXIII и ТАФИ при отсутствии индуцированного фибринолиза не оказывало заметного влияния на формирование кровяного сгустка, а при индукции фибринолиза с помощью tPA приводило к частичной коррекции скорости формирования сгустка и более выраженной коррекции плотности сгустка (чем при их использовании по отдельности), однако антифибринолитический эффект комбинации этих препаратов не отличался от эффекта ТАФИ при его использовании отдельно. Иными словами, эффект комбинации этих препаратов зависел от наличия фибринолиза, что хорошо согласуется с данными о том, что ТКК повышает плотность кровяного сгустка только у пациентов гиперфибринолизом и не оказывает влияния на этот показатель у пациентов с умеренным или «выключенным» фибринолизом (fibrinolysis shutdown) [261].

Таким образом, проведенное исследование показало, что возможность коррекции гемостатического потенциала крови с помощью концентрата фибриногена, концентрата FXIII и ТАФИ при гемодилюции во многом зависит от уровня

фибринолитической активности плазмы. В условиях гемодилюции, не осложненной гиперфибринолизом, использование концентрата фибриногена позволяет достичь существенной коррекции гемостатического потенциала крови, выражающейся, главным образом, в ускорении формирования и повышении плотности кровяного сгустка, тогда как использование концентрата FXIII и TAFI в этих же условиях не вызывает какого-либо корректирующего эффекта. При сочетании гемодилюции с гиперфибринолизом, наоборот, наибольшая коррекция гемостатического потенциала крови достигается при использовании комбинации концентрата FXIII и TAFI, что выражается и в увеличении плотности сгустка и в повышении его фибринолитической устойчивости. Использование комбинации концентратов фибриногена и FXIII в этих условиях позволяет достичь такой же коррекции плотности сгустка, как и использование предыдущей комбинации препаратов, но менее выраженной коррекции фибринолитической устойчивости сгустка, а использование каждого из этих препаратов по отдельности вызывает умеренную коррекцию максимальной плотности сгустка, но различную коррекцию фибринолитической устойчивости, так что наиболее выраженный эффект вызывает TAFI, менее выраженный — концентрат FXIII, еще менее выраженный — концентрат фибриногена. В целом наши результаты свидетельствуют о необходимости применения дифференцированного подхода к назначению гемостатических средств, который учитывал бы уровень фибринолитической активности плазмы у пациентов с травмами.

Как известно, ведущую роль в развитии гиперфибринолиза при тяжелой травме играет высвобождение в плазму значительного количества tPA из активированных эндотелиальных клеток [83, 91]. Однако недавно было показано, что спустя три часа после травмы имеет место значительное повышение уровня uPA, который также вносит существенный вклад в повышение фибринолитической активности при травме [166, 244]. Несмотря на то что оба активатора плазминогена выполняют одну и ту же основную каталитическую функцию (превращение плазминогена в плазмин), молекулярная структура и механизм их действия существенно отличаются [32]. Так, благодаря наличию пальцевидного домена и лизин-

связывающего сайта во 2-м крингл-домене, tPA может связываться с фибрином. Это связывание приводит к многократному увеличению ферментативной активности tPA и активации связанного с фибрином плазминогена, что определяет высокую фибринселективность данного активатора. Напротив, в структуре uPA отсутствуют домены для связывания с фибрином. Тем не менее uPA является хорошим активатором как свободного, так и связанного с фибрином плазминогена, что свидетельствует о его низкой фибринселективности [205]. Более того, показано, что для uPA, в отличие от tPA, характерна выраженная фибринолитическая активность [386]. Эти и другие различия в действии tPA и uPA могут оказывать существенное влияние на эффективность применения гемостатических препаратов в условиях гиперфибринолиза.

В связи с вышеизложенным мы провели сравнительный анализ возможностей коррекции формирования и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка с помощью ТКК, концентрата фибриногена и концентрата FXIII в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза. Для корректного сравнения эффектов от применения указанных гемостатических препаратов в условиях гиперфибринолиза, индуцированного разными активаторами плазминогена, последние были использованы в соответствующих полумаксимальных эффективных концентрациях (EC50). Примечательно, что в EC50 для uPA оказалась в три раза ниже таковой для tPA (33 и 90 МЕ/мл соответственно). Это указывает на более высокую активность uPA в крови по сравнению с его активностью в искусственной среде, используемой производителями активаторов плазминогена для определения их активности. Возможным объяснением более выраженной профибринолитической активности uPA в цельной крови является прямое протеолитическое действие uPA в отношении фибриногена [386], а также усиление активности введенного в кровь uPA при его связывании с эндогенным tPA, присутствующим в плазме [150, 334].

Добавление в кровь как tPA, так и uPA в соответствующих EC50 не только индуцировало лизис кровяного сгустка, но и вызывало снижение его максимальной плотности (амплитуды тэмограммы). По-видимому, данный эффект обусловлен

тем, что при активации свертывания крови в присутствии активатора плазминогена формирование кровяного сгустка происходило на фоне нарастающей генерации плазмина, в результате чего лизис сгустка начинается еще до достижения им максимальной плотности.

Проведенные исследования показали, что добавление в кровь ТКК способствует увеличению плотности кровяного сгустка в присутствии добавленного tPA и оказывает выраженный антифибринолитический эффект в присутствии как добавленного tPA, так и uPA, что согласуется с результатами экспериментов *in vitro* других авторов [105] и рядом клинических наблюдений [8, 51, 204, 298]. Угнетение лизиса кровяного сгустка в присутствии ТКК объясняется тем, что этот препарат, являясь синтетическим аналогом лизина, конкурирует с фибрином за лизин-связывающие сайты крингл-доменов плазмина и плазминогена, образуя с ними обратимую связь. Иными словами, связывание плазмина с ТКК препятствует его связыванию с фибрином, что необходимо для реализации его фибринолитического действия. Важно отметить, что этот механизм антифибринолитического действия аналогов лизина не зависит от того, какой активатор плазминогена индуцировал генерацию плазмина.

В то же время имеются данные о том, что связывание плазминогена с ТКК по-разному отражается на скорости его активации (генерации плазмина) в зависимости от вида действующего активатора. Так, большинство авторов указывают на уменьшение скорости tPA-индуцированной активации плазминогена и фибринолиза в присутствии ТКК и ϵ -аминокапроновой кислоты (АКК) [213, 337], поскольку связывание плазминогена с аналогами лизина препятствует его связыванию с фибрином и тем самым нарушает образование тройного комплекса с tPA, необходимого для реализации его каталитической функции. Показано также, что АКК может связывать и сам tPA, препятствуя его связыванию с фибрином [352]. Напротив, в присутствии uPA аналоги лизина вызывают увеличение скорости активации плазминогена, поскольку при взаимодействии с этими препаратами молекулы плазминогена стабилизируются в «открытой» конформации [337, 355, 356]. Несмотря на это, мы и другие авторы [337, 355] наблюдали

угнетение uPA-индуцированного фибринолиза в присутствии аналогов лизина. Наиболее вероятно, это объясняется тем, что плазмин, образующийся из связанного с ТКК плазминогена, оставаясь связанным с данным препаратом, не может реализовать свое фибринолитическое действие — вне зависимости от действующего активатора плазминогена [57, 337].

Сведения о применении концентрата FXIII у пациентов с гиперфибринолизом весьма малочисленны. В ранних работах было показано, что в «чистых» фибринолитических средах FXIII в физиологической концентрации не оказывает существенного влияния на скорость лизиса фибрина [141], но снижает ее при использовании в более высоких концентрациях [129]. Позднее было установлено, что добавление FXIII в цельную кровь также вызывает угнетение tPA-индуцированного гиперфибринолиза [105]. Влияние FXIII на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях uPA-индуцированного фибринолиза практически не изучено. В настоящей работе мы показали, что добавление в кровь FXIII в условиях как tPA-, так и uPA-индуцированного гиперфибринолиза способствует увеличению плотности кровяного сгустка и повышает его фибринолитическую устойчивость, что выражается в более позднем начале и меньшей скорости лизиса. Эти данные свидетельствуют о потенциальной эффективности концентрата FXIII в качестве гемостатика в условиях гиперфибринолиза независимо от действующего активатора плазминогена.

Известно, что увеличение уровня фибриногена в плазме обеспечивает формирование более плотного кровяного сгустка [317]. При этом сравнительный анализ влияния концентрата фибриногена на формирование сгустка в условиях гиперфибринолиза, индуцированного различными активаторами плазминогена, до настоящего времени не проводился. В данной работе мы показали, что в условиях tPA-индуцированного фибринолиза увеличение концентрации фибриногена в плазме обеспечивало повышение плотности и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка. Принципиально иной — профибринолитический — эффект концентрата фибриногена мы обнаружили при индукции фибринолиза с помощью uPA. Причем данный эффект не зависел от способа приготовления и наличия в

растворе фибриногена определенных вспомогательных веществ или компонентов плазмы, не зависел от способа активации свертывания крови и не требовал участия форменных элементов крови для его реализации. При анализе литературы нам не удалось обнаружить исследований, в которых описывалось бы применение концентрата фибриногена у пациентов с uPA-индуцированным гиперфибринолизом.

Механизм профибринолитического действия концентрата фибриногена в присутствии uPA требует специального изучения. Возможно, обнаруженный нами феномен связан с выраженной фибриногенолитической активностью uPA. Показано, что под влиянием данного активатора сначала от молекулы фибриногена отщепляется фибринопептид В, а затем С-концевые участки А α - и В β -цепей [386]. С одной стороны, это делает фибриноген неподходящим субстратом для тромбина и тем самым замедляет образование фибрина, а с другой, вероятно, приводит к изменению конформации молекул фибриногена и экспонированию до этого скрытых остатков лизина [222, 386]. Мы полагаем, что это приводит к связыванию плазминогена с экспонированными остатками лизина и его стабилизации в «открытой» конформации, что в свою очередь приводит к увеличению скорости его активации под действием uPA. Чем больше фибриногена содержится в крови, тем больше остатков лизина экспонируется в результате uPA-индуцированного фибриногенолиза и тем больше плазминогена затем активируется под влиянием uPA. Таким образом, увеличение концентрации фибриногена в присутствии uPA, по-видимому, приводит к увеличению генерации плазмина и, как следствие, усилению фибриногенолиза и гиперфибринолізу.

Это исследование имеет некоторые ограничения. Используемая в работе модель гиперфибринолиза *in vitro* не позволяет оценить влияние эндотелия сосудистой стенки и гемодинамики на формирование и лизис кровяного сгустка, что требует осторожности при экстраполяции полученных данных на клиническую ситуацию. Поскольку гиперфибринолиз индуцировали в крови, полученной от здоровых доноров, данная модель не учитывает модифицирующее действие других факторов, характерных для той формы патологии, с которой гиперфибринолиз ассоциирован. Несмотря на то что гемостатические препараты были использованы

в конечных концентрациях, близких к тем, которые наблюдаются в крови пациентов при их внутривенном введении, эффект от применения этих препаратов зависит от дозы.

Таким образом, с помощью метода ротационной тромбоэластометрии мы показали, что в условиях гиперфибринолиза эффект от применения гемостатических препаратов может существенно различаться в зависимости от вида действующего активатора плазминогена. В случае tPA-индуцированного гиперфибринолиза и ТКК, и концентрат FXIII, и концентрат фибриногена способствуют увеличению плотности кровяного сгустка и оказывают отчетливый антифибринолитический эффект. В случае uPA-индуцированного гиперфибринолиза ТКК и концентрат FXIII вызывают аналогичный эффект, а концентрат фибриногена вызывает противоположный — профибринолитический эффект. Полученные данные указывают на необходимость анализа механизмов индукции гиперфибринолиза при выборе средств для коррекции гемостатического потенциала крови у пациентов и могут служить ориентиром при планировании клинических исследований.

Оценка функциональной активности тромбоцитов и возможности коррекции гемостатического потенциала крови в условиях тромбоцитопении

Первичная ИТП является самой часто встречающейся формой изолированной тромбоцитопении. Для этой патологии характерно отсутствие четкой связи между содержанием тромбоцитов, особенно в диапазоне ниже $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, и тяжестью кровотечений, что затрудняет их прогнозирование и выбор оптимальной стратегии для их профилактики. Возможно, это обусловлено нарушением функции тромбоцитов у некоторых пациентов под влиянием антитромбоцитарных аутоантител. Однако оценка функций тромбоцитов в условиях тромбоцитопении, представляет собой сложную задачу, поскольку содержание тромбоцитов в крови существенно влияет на значения показателей большинства методов исследования тромбоцитарного звена системы гемостаза, а также методов глобальной оценки гемостатического потенциала крови.

В настоящей работе мы предложили оригинальный подход к исследованию функций тромбоцитов в условиях тромбоцитопении, в основу которого положена идея сравнения показателей функциональной активности тромбоцитов у пациента с тромбоцитопенией с диапазоном нормальных значений для соответствующего содержания тромбоцитов. В частности, мы разработали модель изолированной тромбоцитопении *in vitro*, в которой содержание тромбоцитов может быть задано исследователем произвольно. С помощью этой модели мы определили 95 % предсказательный интервал для показателей адгезии и агрегации тромбоцитов в условиях кровотока (метод Impact-R) и формирования кровяного сгустка (метод ROTEM) в зависимости от содержания тромбоцитов в крови. Поскольку для создания этой модели мы использовали кровь здоровых добровольцев, указанные интервалы охватывают 95 % значений, характерных для нормальных (функционально полноценных) тромбоцитов с учетом их содержания в исследуемом образце, а следовательно, выпадение значения за границы этих интервалов будет указывать на нарушение той или иной функции тромбоцитов (с вероятностью ошибки менее 5 %). Этот подход был использован нами для оценки функций тромбоцитов у пациентов с первичной хронической ИТП.

Проведенные исследования показали, что у большинства пациентов с хронической первичной ИТП, включенных в настоящее исследование, значения показателей адгезии и агрегации тромбоцитов при высокой скорости сдвига, а также показателей формирования кровяного сгустка не выходят за пределы 95 % предсказательных интервалов для соответствующего содержания тромбоцитов в крови. Это свидетельствует о том, что исследованные функции тромбоцитов при первичной хронической ИТП не нарушены, а следовательно, причину различной кровоточивости пациентов со схожим содержанием тромбоцитов в крови, вероятно, следует искать в иных аспектах физиологии этих форменных элементов (например, в продукции микрочастиц, прокоагулянтной функции и др.) или других компонентах системы гемостаза. В то же время необходимо отметить, что оценка функций тромбоцитов у пациентов проводилась в период отсутствия у них геморрагического синдрома. Нельзя исключить, что если бы кровь для исследования

была взята у пациентов во время возникновения у них геморрагического синдрома, то дисфункция тромбоцитов была бы выявлена.

Описанный в данной работе способ оценки функциональной активности тромбоцитов в условиях тромбоцитопении, основанный на установлении 95 % предсказательных интервалов для показателей тестов Impact-R и ROTEM, может быть перенесен и на другие методы исследования тромбоцитарного звена системы гемостаза и методы глобальной оценки гемостатического потенциала крови, чувствительные к содержанию тромбоцитов в исследуемом образце. Это позволит дать более полную оценку функций тромбоцитов при первичной иммунной и других формах тромбоцитопении и уточнить представления о патогенезе геморрагического синдрома при этих формах патологии. Более того, поскольку предложенный нами способ оценки функций тромбоцитов не требует проведения каких-либо дополнительных манипуляций с образцом крови, он может быть легко внедрен в клиническую практику. Это позволит быстро выявлять дисфункцию тромбоцитов у пациентов с тромбоцитопенией различного генеза, с большей точностью прогнозировать вероятность развития у них кровотечений в динамике заболевания, а также выбирать наиболее выгодные для пациента терапевтические стратегии, которые будут учитывать не только содержание тромбоцитов в крови, но и их функциональную активность.

Как было показано ранее, нарастание тяжести тромбоцитопении сопровождается снижением показателей адгезии и агрегации тромбоцитов в условиях кровотока. Следовательно, стимуляция указанных функций тромбоцитов может быть одним из подходов к коррекции гемостатического потенциала крови при тромбоцитопении. Важную роль в адгезии и агрегации тромбоцитов при высокой скорости сдвига играет VWF. В частности, при повреждении сосудистой стенки циркулирующий в плазме VWF прикрепляется к поверхности обнаженного субэндотелиального матрикса и служит лигандом для рецепторного комплекса GPIb-IX-V на мембране тромбоцитов, опосредующего начальные этапы их адгезии. В связи с этим мы изучили возможность усиления адгезии и агрегации тромбоцитов при высокой скорости сдвига в условиях тромбоцитопении с помощью

концентрата VWF. Указанный препарат добавляли в кровь так, чтобы конечная концентрация добавленного VWF в плазме составила 2 МЕ/мл, что приблизительно соответствует дозе 100 МЕ/кг VWF. Поскольку для создания модели изолированной тромбоцитопении *in vitro* мы использовали кровь здоровых добровольцев, у которых концентрация VWF в плазме была в пределах нормальных значений (около 1,0 МЕ/мл), добавление препарата в конечной концентрации 2 МЕ/мл приводило к повышению концентрации VWF в плазме приблизительно в три раза.

Проведенные исследования показали, что увеличение концентрации VWF приводило к усилению адгезии и агрегации тромбоцитов при высокой скорости сдвига, однако этот эффект обнаруживался при содержании тромбоцитов $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ и более. При содержании тромбоцитов $10 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ отмечалось лишь небольшое увеличение агрегации, а при содержании тромбоцитов $5 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ какого-либо изменения адгезии или агрегации не наблюдалось вообще. Схожая закономерность обнаруживалась и при использовании крови пациентов с первичной ИТП: чем больше было содержание тромбоцитов в крови, тем больший эффект вызывало добавление в кровь концентрата VWF. Действительно, поскольку действие данного препарата направлено на усиление адгезии и агрегации тромбоцитов, для реализации его эффекта необходимо достаточное содержание тромбоцитов в крови, и поэтому в условиях тяжелой тромбоцитопении эффект VWF не мог быть реализован в полной мере. Добавление в кровь 1 или 3 мг/мл фибриногена не оказывало влияния на адгезию и агрегацию тромбоцитов, что, по-видимому, объясняется изначально достаточным для реализации этих функций тромбоцитов содержанием фибриногена в крови.

Снижение содержания тромбоцитов в крови сопровождалось также замедлением формирования сгустка и снижением его плотности. Это объясняется, во-первых, тем, что в условиях тромбоцитопении уменьшается суммарная площадь прокоагулянтной поверхности, что приводит к снижению генерации тромбина и, как следствие, к формированию рыхлой фибриновой сети, состоящей из толстых, слабо переплетенных и мало разветвленных нитей фибрина. Эти изменения в архитектуре фибриновой сети делают сгусток менее плотным и более подвер-

женным лизису. Во-вторых, при тромбоцитопении уменьшается общее количество производимой тромбоцитами сократительной силы, что приводит к нарушению процесса ретракции сгустка и делает его еще более пористым, проницаемым и подверженным лизису. В связи с этим перспективным подходом к экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при тромбоцитопении представляется повышение уровня фибриногена в плазме, поскольку известно, что это способствует увеличению степени переплетения нитей фибрина и повышает плотность сгустка.

Для проверки этого предположения мы изучили влияние концентрата фибриногена на формирование кровяного сгустка в модели тромбоцитопении *in vitro* различной тяжести. При этом конечная концентрация добавленного фибриногена в плазме составила 3 мг/мл. Поскольку для создания указанной модели мы использовали кровь здоровых добровольцев, у которых концентрация фибриногена в плазме была в пределах нормальных значений (1,5–4,5 мг/мл), добавление препарата в конечной концентрации 3,0 мг/мл приводило практически к удвоению его концентрации в плазме. Проведенные исследования показали, что увеличение концентрации фибриногена приводило к сокращению времени формирования сгустка и увеличению его максимальной плотности. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями [217, 378]. Сокращение времени формирования сгустка могло быть обусловлено увеличением скорости катализируемой тромбином реакции превращения фибриногена в фибрин вследствие увеличения концентрации субстрата данной ферментативной реакции — фибриногена. Однако необходимо отметить, что увеличение скорости формирования сгустка наблюдалось не во всем диапазоне содержания тромбоцитов, а только в интервале $5\text{--}40 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, причем по мере увеличения содержания тромбоцитов в пределах указанного интервала выраженность этого эффекта уменьшалась, а при содержании тромбоцитов $80 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ и более этот эффект не наблюдался. Схожие результаты были получены и при использовании крови пациентов с первичной ИТП: чем больше было содержание тромбоцитов в крови, тем меньше было влияние фибриногена на этот показатель. Такая зависимость

выраженности корректирующего эффекта фибриногена от содержания тромбоцитов в крови, наиболее вероятно, обусловлена тем, что по мере увеличения содержания тромбоцитов увеличивается изначальная скорость формирования сгустка, а чем она больше, тем меньше возможности для ее дополнительного увеличения — вероятно, по причине быстрого достижения предельной скорости превращения фибриногена в фибрин и/или скорости полимеризации последнего. В свою очередь зависимость скорости формирования сгустка от содержания тромбоцитов в крови объясняется тем, что при увеличении содержания тромбоцитов усиливается генерация тромбина, а чем больше образуется тромбина в системе, тем больше скорость превращения фибриногена в фибрин и, следовательно, скорость формирования кровяного сгустка. В то же время увеличение плотности кровяного сгустка при добавлении в кровь фибриногена обнаруживалось вне зависимости от содержания тромбоцитов в крови — как в модели изолированной тромбоцитопении *in vitro*, так и в крови пациентов с первичной ИТП. Эта закономерность обнаруживается как в крови, так и в искусственных средах, не содержащих форменных элементов [203, 318, 347].

Еще одним фактором, влияющим на свойства кровяного сгустка, является концентрация FXIII [78, 189, 340]. Показано, что снижение содержания тромбоцитов в крови сопровождается снижением концентрации FXIII в плазме, поскольку тромбоциты служат одним из важных источников этого фактора свертывания в плазме [173, 297] (хотя эта функция тромбоцитов оспаривается [102]) и дополнительным источником FXIII в формирующемся кровяном сгустке или тромбе [192, 253]. Известно, что FXIII-A составляет 3 % от общего количества белка в тромбоцитах, а концентрация его в цитоплазме тромбоцитов в 150 раз выше, чем его концентрация в плазме [192]. Нельзя исключить, что, накладываясь на тромбоцитопению, даже умеренный дефицит FXIII, может оказать значимый вклад в снижение гемостатического потенциала крови при этой патологии. Следовательно, повышение концентрации FXIII при тромбоцитопении представляется патогенетически обоснованным методом коррекции гемостатического потенциала крови.

В связи с вышеизложенным мы изучили влияние концентрата FXIII на формирование кровяного сгустка в условиях тромбоцитопении. Указанный препарат добавляли в восстановленную тромбоцитопеническую кровь, так чтобы конечная концентрация добавленного FXIII в плазме составила 2 МЕ/мл, что приблизительно соответствует дозе 70 МЕ/кг. Поскольку для создания модели изолированной тяжелой тромбоцитопении *in vitro* мы использовали кровь здоровых добровольцев, у которых концентрация FXIII в плазме была в пределах нормальных значений (0,7–1,4 МЕ/мл), добавление препарата в конечной концентрации 2 МЕ/мл приводило к повышению концентрации FXIII приблизительно в три раза.

Проведенные исследования показали, что увеличение концентрации FXIII при изолированной тяжелой тромбоцитопении сопровождалось увеличением плотности кровяного сгустка, хотя и не отражалось на скорости его формирования. Схожие результаты были получены и в экспериментах *ex vivo* при добавлении рекомбинантного FXIII-A2 в кровь пациентов с тромбоцитопенией [183], а также пациентов с дефицитом FXIII, возникшим в результате проведения большой сердечно-сосудистой или иной хирургической операции [361]. Данный эффект может объяснить тем, что добавление FXIII приводило к более эффективному «сшиванию» нитей фибрина друг с другом и повышению жесткости фибриновой сети, а также «сшиванию» нитей фибрина с интегринами $\alpha IIb\beta 3$ на мембране тромбоцитов, что обеспечивало более эффективную трансмиссию генерируемой тромбоцитами контрактильной силы на нити фибрина и, как следствие, большую ретракцию сгустка. Дефицит интегринов $\alpha IIb\beta 3$ на мембране тромбоцитов при тромбастении Гланцмана, по-видимому, является причиной отсутствия корректирующего эффекта концентрата FXIII при его добавлении в кровь пациентов с этой патологией (см. раздел 5.3).

Добавление в тромбоцитопеническую кровь концентрата FXIII в комбинации с концентратом фибриногена приводило к дополнительному приросту максимальной плотности кровяного сгустка, но не вызывало дополнительного увеличения скорости его формирования (что было имело место при использовании

концентрата фибриногена отдельно). Обнаруженный синергизм в действии указанных препаратов, вероятно, объясняется тем, что добавление фибриногена приводит к увеличению количества нитей фибрина, что делает фибриновую сеть более плотной, тогда как добавление FXIII способствует большему «сшиванию» нитей фибрина друг с другом и с интегринами $\alpha IIb\beta 3$ на мембране тромбоцитов, что повышает эффективность ретракции. В целом это способствует дополнительному приросту плотности сгустка. Отсутствие дополнительного увеличения скорости формирования сгустка при одновременном добавлении в кровь концентратов фибриногена и FXIII обусловлено тем, что FXIII действует на уже сформировавшиеся нити фибрина и не влияет на превращение фибриногена в фибрин.

Как мы уже отметили ранее, снижение плотности кровяного сгустка при тяжелой тромбоцитопении может быть обусловлено снижением генерации тромбина на мембране тромбоцитов. В связи с этим патогенетически обоснованным представляется подход к коррекции гемостатического потенциала крови при тромбоцитопении, основанный на применении препаратов, усиливающих генерацию тромбина, например АКПК. Данный препарат содержит протромбин (FII), FIX и FX преимущественно в неактивированной форме и FVII в преимущественно активированной форме (FVIIa). При этом основными действующими компонентами препарата являются FII и FXa, синергетическое взаимодействие которых на мембране активированных тромбоцитов обеспечивает мощный тромбиновый «взрыв» [168, 371]. Возможность применения этого препарата в условиях тяжелой тромбоцитопении до настоящего времени оставалась неисследованной.

В связи с вышеизложенным мы изучили влияние АКПК на формирование кровяного сгустка в модели тяжелой изолированной тромбоцитопении *in vitro*. Указанный препарат добавляли в кровь так, чтобы его конечная концентрация в плазме составила 2 ЕД/мл, что приблизительно соответствует дозе 70 ЕД/кг. Проведенные исследования показали, что в условиях изолированной тяжелой тромбоцитопении добавление в кровь АКПК приводит к увеличению скорости формирования сгустка без существенного изменения его максимальной плотности. Этот эффект, вероятно, обусловлен тем, что увеличение концентрации тромбина

приводило к увеличению скорости превращения фибриногена в фибрин и скорость формирования сгустка. Несмотря на то что концентрация тромбина и кинетика превращения фибриногена в фибрин является одним из факторов определяющих плотность фибриновой сети [118, 365, 390], в данном случае изменения плотности сгустка не наблюдалось. Возможно, это связано с недостаточным для достижения этого эффекта увеличением генерации тромбина. Возможно также и то, что данного увеличения генерации тромбина было недостаточно для значимого повышения активности FXIII в крови, оказывающего большое влияние на плотность сгустка. Исследование структуры фибриновой сети и активности FXIII после добавления в тромбоцитопеническую кровь АКПК позволило бы проверить эти предположения. Кроме того, увеличение генерации тромбина, которое имело место в данном случае, могло не вызвать необходимого для уплотнения сгустка прироста генерируемой тромбоцитами контрактильной силы.

Одновременное добавление в тромбоцитопеническую кровь концентрата фибриногена и АКПК приводило к дополнительному приросту скорости формирования кровяного сгустка, хотя и не вызвало дополнительного прироста его максимальной плотности, которая не отличалась от таковой при использовании концентрата фибриногена отдельно. Синергизм в действии указанных препаратов в отношении скорости формирования сгустка мог быть обусловлен тем, что при одновременном их использовании в крови одновременно усиливается генерация тромбина и повышается концентрация его основного субстрата — фибриногена. В целом это приводит к более быстрому превращению фибриногена в фибрин, суммарное количество которого тем не менее остается таким же, как и при использовании концентрата фибриногена отдельно. Отсутствие дополнительного прироста максимальной плотности сгустка могло быть также обусловлено невозможностью дополнительного увеличения генерируемой тромбоцитами контрактильной силы в условиях тромбоцитопении.

Как мы уже отмечали ранее, потеря большого количества крови приводит к гипоперфузии тканей, активацию эндотелия и высвобождения в плазму большого количества tPA, что приводит к развитию гиперфибринолиза [172, 184]. При этом

необходимо отметить, что тромбоциты являются важным источником антифибринолитических факторов, включая FXIII-A, α_2 -антиплазмин, PAI-1, TAFI и другие, которые высвобождаются ими в процессе агрегации и формирования кровяного сгустка. В условиях тяжелой тромбоцитопении возникает дефицит указанных факторов, что потенцирует фибринолитическую активность плазмы при данной патологии. Кроме того, большая кровопотеря требует незамедлительного введения объемзамещающих кристаллоидных растворов, что приводит к разведению крови и дальнейшему нарушению баланса между про- и антикоагулянтами, а также про- и антифибринолитиками плазмы и, как следствие, к развитию дилуционной коагулопатии, накладывающейся на тромбоцитопению и гиперфибринолиз. Исходя из этих соображений, мы исследовали влияние концентратов фибриногена, FXIII, АКПК, а также TAFI (как потенциального антифибринолитика) в модели тяжелой тромбоцитопении *in vitro*, осложненной tPA-индуцированным гиперфибринолизом и 40 % гемодилуцией.

Исследование показало, что добавление tPA в кровь при тяжелой тромбоцитопении не только индуцировало лизис кровяного сгустка, но и вызывало снижение скорости его формирования и максимальной плотности, что было еще более выражено при сопутствующей гемодилуции. Наиболее вероятным объяснением этого феномена является то, что при проведении настоящего эксперимента tPA добавляли в тромбоцитопеническую кровь непосредственно перед индукцией свертывания. Следовательно, формирование кровяного сгустка в исследуемой системе происходило на фоне нарастающей генерации плазмина, а значит, лизис сгустка начинался еще до достижения им максимальной плотности.

В условиях гиперфибринолиза, добавление в тромбоцитопеническую кровь концентрата фибриногена приводило к коррекции скорости формирования и максимальной плотности сгустка, не оказывая при этом влияния на время начала лизиса сгустка. Указанные эффекты фибриногена наблюдались вне зависимости от наличия сопутствующей гемодилуции и были аналогичны тем, что наблюдались и в отсутствие гиперфибринолиза. Как мы отмечали ранее, ускорение формирования сгустка при добавлении фибриногена могло быть обусловлено увеличением

скорости катализируемой тромбином реакции превращения фибриногена в фибрин вследствие увеличения концентрации фибриногена — субстрата данной реакции. Увеличение плотности кровяного сгустка могло быть обусловлено образованием большего количества тонких, более плотно переплетенных фибриновых нитей. Отсутствие антифибринолитического эффекта могло быть обусловлено тем, что увеличение количества нитей фибрина в сгустке сопровождалось пропорциональным увеличением в нем количества остатков лизина, служащих для связывания tPA и плазминогена и способствующих их более эффективному взаимодействию. Иными словами, эффект уплотнения сгустка компенсировался увеличением генерации плазмина на поверхности фибриновых нитей.

Добавление в тромбоцитопеническую кровь концентрата FXIII в условиях гиперфибринолиза не влияло на скорость формирования сгустка, но вызывало прирост его максимальной плотности и защищало от раннего начала лизиса, что имело место как в неразведенной, так и разведенной крови. В основе этих эффектов, скорее всего, лежит антифибринолитическое действие FXIII, заключающееся в увеличении связывания α_2 -антиплазмина и других антифибринолитических факторов плазмы с остатками лизина на фибриновых нитях. Это, с одной стороны, способствует инактивации непосредственно на нитях фибрина уже образовавшегося плазмина, а с другой — уменьшает количество оставшихся остатков лизина, служащих для связывания tPA и плазминогена, что приводит к снижению генерации нового плазмина на нитях фибрина. И то, и другое снижает активность плазмина в процессе формирования сгустка и тем самым способствует повышению его плотности и отдалению времени начала лизиса. Кроме того, определенную роль в увеличении плотности сгустка могло сыграть увеличение «сшивания» фибрина с интегринами $\alpha IIb\beta 3$ тромбоцитов и, как следствие, увеличение эффективности ретракции сгустка.

В условиях гиперфибринолиза (вне зависимости от наличия гемодилюции) одновременное добавление в тромбоцитопеническую кровь концентратов фибриногена и FXIII приводило к увеличению скорости формирования сгустка, повышению плотности сгустка и повышению его устойчивости к лизису. Хотя

выраженность этих эффектов и не превышала таковую при использовании этих гемостатиков по отдельности, тем не менее их одновременное применение, как видно, позволяло достичь наибольшего корригирующего эффекта в условиях гиперфибринолиза.

В условиях гиперфибринолиза (вне зависимости от наличия гемодилюции) добавление в тромбоцитопеническую кровь АКПК вызывало увеличение скорости формирования и максимальной плотности сгустка, но не влияло на время начала лизиса. Данный эффект, вероятно, объясняется тем, что усиление генерации тромбина, вызываемое действием АКПК, не только способствует ускорению превращения фибриногена в фибрин, но и вызывает активацию TAFI и FXIII, которые защищают формирующийся сгусток от действия плазмина и тем самым способствуют его росту в присутствии tPA. (Примечательно, что в отсутствие гиперфибринолиза АКПК вызывал только увеличение скорости формирования сгустка, что, скорее всего, обусловлено тем, что при отсутствии избытка плазмина возможности для реализации антифибринолитического действия TAFI и FXIII не было и кровяной сгусток уже формировался максимально плотным, насколько это было возможным в условиях тромбоцитопении.)

Использование АКПК вместе с концентратом фибриногена вызывало синергетический эффект, выражавшийся в дополнительном приросте скорости формирования и максимальной плотности сгустка (по сравнению с таковым при использовании каждого из них по отдельности), а также в повышении фибринолитической устойчивости сгустка, чего при использовании этих препаратов по отдельности не наблюдалось. Более того, антифибринолитический эффект этой комбинации препаратов превышал таковой при использовании комбинации концентратов фибриногена и FXIII как в неразведенной, так и разведенной крови. Указанные эффекты одновременного применения АКПК и концентрата фибриногена обнаруживались в условиях гиперфибринолиза вне зависимости от наличия сопутствующей гемодилюции. Наиболее вероятным объяснением синергетического действия АКПК и концентрата фибриногена в условиях гиперфибринолиза является то, что в результате повышения уровня фибриногена в крови

фибриновая сеть становится более плотной, а в результате усиления генерации тромбина в связи с добавлением АКПК увеличивается скорость превращения фибриногена в фибрин, а также активируется больше TAFI и FXIII, которые защищают уплотненный сгусток от лизиса. Кроме того, как мы уже отмечали ранее, активированный FXIII вызывает «сшивание» нитей фибрина с интегринами $\alpha IIb\beta 3$ тромбоцитов, что в итоге приводит и к повышению эффективности ретракции сгустка. Все вместе это позволяет не только ускорить формирование сгустка и увеличить его плотность, но и повысить его устойчивость к лизису в условиях гиперфибринолиза.

TAFI является одним из важнейших естественных антифибринолитических факторов. Под влиянием комплекса тромбин-тромбомодулин (и в меньшей степени под влиянием свободного тромбина и плазмина) TAFI превращается в активную форму (TAFIa) и отщепляет С-концевые остатки лизина от молекул фибрина, что ограничивает возможность взаимодействия tPA и плазминогена на поверхности фибриновых нитей и, как следствие, снижает генерацию плазмина [229]. Основное количество присутствующего в плазме TAFI продуцируется в печени [63]. Дополнительным его источником являются тромбоциты. Хотя на долю тромбоцитов приходится всего около 0,1 % содержащегося в плазме TAFI [264], его концентрация в тромбоцитах составляет около 40 нмоль/л, что всего в два раза меньше, чем в плазме [64, 273]. При действии агонистов тромбоциты активируются и высвобождают TAFI вместе с другими компонентами α -гранул непосредственно в месте формирования кровяного сгустка (или тромба) [326], что обеспечивает его защиту от фибринолиза. Следовательно, дефицит тромбоцитов может привести к снижению содержанию TAFI в формирующемся сгустке и повышению его подверженности лизису. В связи с этим мы посчитали целесообразным изучить возможность коррекции формирования кровяного сгустка с помощью TAFI.

В данной серии экспериментов TAFI добавляли в цельную кровь так, чтобы конечная концентрация добавленного TAFI в плазме была 0,25 ЕД/мл. Проведенные исследования показали, что добавление TAFI в тромбоцитопеническую кровь в условиях гиперфибринолиза не влияет на скорость формирования сгустка,

но увеличивает его максимальную плотность и особенно время начала лизиса, причем антифибринолитический эффект TAFI был более выраженным, чем таковой концентрата FXIII в этих же условиях. Аналогичная разница в силе эффектов TAFI и FXIII была установлена и другими исследователями [278]. Отсутствие влияния TAFI на скорость формирования сгустка, вероятно, обусловлено тем, что TAFI не оказывает влияния на превращение фибриногена в фибрин. Поскольку в нашем эксперименте формирование сгустка происходило на фоне генерации плазмина, т. е. лизис сгустка начинался еще до окончательного его формирования, повышение уровня TAFI в крови препятствовало преждевременному лизису сгустка и тем самым приводило к повышению его максимальной плотности и отдалению времени начала лизиса. Более выраженный, по сравнению с концентратом FXIII, антифибринолитический эффект TAFI, по-видимому, объясняется тем, что TAFI прежде всего блокирует генерацию плазмина на фибриновых нитях, тогда как FXIII повышает их резистентность к уже образовавшемуся плазмину.

Использование TAFI в комбинации с концентратом фибриногена в условиях гиперфибринолиза при отсутствии сопутствующей гемодилюции приводит к дополнительному увеличению плотности сгустка, а при наличии гемодилюции — еще и к дополнительному увеличению скорости формирования сгустка. Это объясняется тем, что добавление фибриногена приводит к повышению количества фибрина и увеличению плотности фибриновой сети, тогда как TAFI подавляет генерацию плазмина на их поверхности, что в итоге и обеспечивает вышеуказанный синергетический эффект.

Эффект от одновременного добавления TAFI и концентрата FXIII в условиях тромбоцитопении и гиперфибринолиза практически не отличался от такого при использовании TAFI отдельно за исключением небольшого прироста скорости формирования сгустка при наличии сопутствующей гемодилюции. Отсутствие заметного синергизма в действии этих препаратов, очевидно, объясняется тем, что действие и первого, и второго фактически направлено на повышение устойчивости нитей фибрина к лизису: TAFI препятствует генерации плазмина на их поверхности

путем отщепления остатков лизина, тогда как FXIII способствует инаktivации уже образовавшегося плазмина путем связывания с фибрином α_2 -антиплазмина и других антифибринолитических факторов. Кроме того, связывание последних с фибрином происходит по остаткам лизина, что также приводит к уменьшению сайтов для связывания плазминогена и tPA. В итоге генерация плазмина еще больше снижается.

Определенным ограничением этого исследования является то, что эффекты гемостатических препаратов были изучены в условиях тяжелой тромбоцитопении при нормальной функциональной активности тромбоцитов, тогда как вполне возможно, что возникновение спонтанных кровотечений при тяжелой тромбоцитопении связано с преходящими нарушениями их функциональной активности. Изучение эффективности указанных гемостатических препаратов у пациентов с сочетанной тромбоцитопенией и тромбоцитопатией может стать предметом отдельного исследования. Остается также открытым вопрос о безопасности исследованных гемостатиков при их одновременном использовании.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в условиях тяжелой тромбоцитопении, не осложненной гиперфибринолизом, использование концентрата фибриногена позволяет достичь большей коррекции формирования кровяного сгустка, выражающейся в увеличении скорости его формирования и максимальной плотности, тогда как использование АКПК вызывает увеличение только скорости формирования сгустка, а использование концентрата FXIII — только максимальной его плотности. Использование фибриногена в комбинации с АКПК или концентратом FXIII оказывает синергетический эффект, выражающийся в еще большей коррекции скорости формирования или максимальной плотности сгустка соответственно, по сравнению с таковыми при использовании указанных препаратов по отдельности.

В условиях тяжелой тромбоцитопении, осложненной гиперфибринолизом (в том числе в сочетании с гемодилюцией), применение концентрата фибриногена и АКПК ускоряют формирование и повышают плотность кровяного сгустка, но не защищают его от лизиса, тогда как применение концентрата FXIII и в особенности

ТАФИ повышает плотность сгустка и защищает его от лизиса, но не влияет на скорость формирования сгустка. Это обстоятельство определяет целесообразность комбинированного применения этих препаратов для достижения наибольшего корригирующего эффекта. Действительно, применение концентрата фибриногена в комбинации с АКПК или ТАФИ позволяет достичь максимальной коррекции и скорости формирования сгустка, и его плотности, и устойчивости к лизису. Корригирующий эффект применения концентрата FXIII в комбинации с концентратом фибриногена или ТАФИ уступает таковому при использовании двух предыдущих комбинаций гемостатиков.

***Возможности коррекции гемостатического потенциала крови
при тромбастении Гланцмана***

Различная выраженность геморрагического синдрома, характерная для пациентов с тромбастенией Гланцмана (ТГ), дает основание полагать, что кровоточивость при этой патологии обусловлена не только нарушением способности тромбоцитов взаимодействовать с компонентами внеклеточного матрикса, т. е. функций, напрямую зависящих от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, но и нарушением других функций тромбоцитов, обеспечивающих формирование гемостатического потенциала крови, например нарушением прокоагулянтной активности тромбоцитов. В настоящей работе, используя тест генерации тромбина, мы показали, что у пациентов с ТГ в среднем отмечается пониженная генерация тромбина по сравнению со здоровыми добровольцами. В то же время при рассмотрении показателей данного теста у каждого обследованного пациента в отдельности была обнаружена выраженная вариация значений исследованных показателей, так что наименьшее значение отличалось от наибольшего более чем в 2,5 раза. Кроме того, несмотря на то что у всех пациентов, включенных в настоящее исследование, был установлен 1-й тип ТГ (уровень экспрессии интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ близок к нулю), примерно у трети из них (22–46 %) значения показателей теста генерации тромбина не выходили за пределы соответствующего межквартильного размаха, зарегистрированного у здоровых добровольцев, не страдающих кровоточивостью. Иными

словами, у каждого 3–4-го обследованного пациента показатели генерации тромбина были не хуже, чем у 75 % здоровых лиц. Эти данные указывают на существенные различия в степени нарушения генерации тромбина и снижения гемостатического потенциала крови у пациентов с ТГ.

Обнаруженная нами вариабельность нарушения генерации тромбина у пациентов с ТГ типа 1, вероятно, является одним из факторов, определяющих различную склонность к кровоточивости и тяжесть геморрагического синдрома при этой патологии, несмотря на одинаково низкий (близкий к нулю) уровень экспрессии интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ на мембране тромбоцитов. Ввиду того что в настоящем исследовании взятие крови проводилось в тот момент, когда у пациентов не было кровотечения, проверить данное предположение в рамках этой работы не представляется возможным. Проведение аналогичного исследования, в которое пациенты с ТГ будут включаться при возникновении у них кровотечения, позволит ответить на вопрос о наличии связи между степенью снижения генерации тромбина и тяжестью геморрагического синдрома при этой патологии.

Обнаруженное нами снижение генерации тромбина у пациентов с ТГ согласуется с результатами, полученными другими авторами [196, 307]. Снижение генерации тромбина отмечается также при блокаде интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с помощью моноклональных антител или синтетических антагонистов [77, 246], что свидетельствует о большой роли этих рецепторов в реализации прокоагулянтной активности тромбоцитов. Одним из возможных механизмов снижения генерации тромбина при дефиците или блокаде интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ является отсутствие сигнализации «снаружи внутрь» от этих рецепторов, играющей большую роль в регуляции экспрессии фосфатидилсерина на мембране тромбоцитов и шеддинга тромбоцитарных микрочастиц [38, 246]. Благодаря высокой плотности фосфатидилсерина их мембрана отличается в 50–100 раз большей прокоагулянтной активностью по сравнению с мембраной активированных тромбоцитов [338]. Отсутствие сигнализации от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ приводит, таким образом, к снижению суммарной площади прокоагулянтной поверхности и, как следствие, к снижению генерации тромбина [79, 287]. Кроме того, интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ служат

сайтом для связывания протромбина на мембране тромбоцитов и способствуют его взаимодействию с FXa [79]. Учитывая, что интегрины $\alpha\text{IIb}\beta 3$ — одни из самых многочисленных рецепторов тромбоцитов, их отсутствие, характерное для ТГ типа 1, может оказать существенное влияние на способность тромбоцитов связывать протромбин и превращать его в активную форму.

Еще одним возможным механизмом снижения генерации тромбина при ТГ является снижение содержания в тромбоцитах тканевого фактора. Недавно было показано, что тромбоциты могут самостоятельно синтезировать тканевой фактор и накапливать его в составе α -гранул [73, 228]. Причем большую роль в этом процессе играет образование тромбоцитами TXA_2 [137]. В то же время известно, что для синтеза последнего требуется участие сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [66, 182], что объясняет снижение синтеза TXA_2 у пациентов с ТГ [234]. Следовательно, дефицит интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ в тромбоцитах может оказать влияние на экспрессию в них тканевого фактора. Необходимо, однако, отметить, что способность тромбоцитов синтезировать тканевой фактор удалось подтвердить не во всех исследованиях [73].

С целью экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при ТГ в последнее время все чаще используется концентрат rFVIIa. Рекомендованная доза этого препарата составляет 90 мкг/кг, которую вводят с интервалом в 2–3 часа. При этом в плазме достигается концентрация rFVIIa, которая в 250 раз превышает концентрацию физиологического FVIIa, что определяет особый механизм действия этого препарата. Установлено, что в столь высокой концентрации rFVIIa напрямую («в обход» FVIII и FIX) вызывает активацию такого количества FX, которое достаточно для индукции тромбинового «взрыва». При этом различают зависимый и не зависимый от тканевого фактора (TF) механизмы rFVIIa-индуцированной активации FX [139]. TF-зависимый механизм предполагает, что присутствующий в избытке rFVIIa вытесняет естественный FVII из связи с TF на мембране клеток сосудистой стенки и форменных элементов крови [306]. Образующийся при этом комплекс rFVIIa–TF, вызывает выраженную активацию FX [139]. TF-независимый механизм действия заключается в том, что присутствующий в избытке rFVIIa

образует низкоаффинную связь с отрицательно заряженными фосфолипидами на мембране активированных тромбоцитов [257] и при участии рецепторного комплекса GPIb-IX-V [385] напрямую вызывает выраженную активацию FX. Накопленные данные свидетельствуют о большей значимости TF-независимого механизма действия rFVIIa при этой патологии [295].

Согласно информации, представленной в международном регистре пациентов с ТГ, для купирования кровотечений во время больших хирургических операций — в дозе 25,0–240,0 мкг/кг, что позволяло достичь остановки кровотечения в 100 % случаев, и для купирования нехирургических кровотечений — в дозе 28–450 мкг/кг, что позволяло достичь остановки кровотечения в 91 % случаев (эффективность при использовании rFVIIa в виде монотерапии) [13, 250, 294]. С одной стороны, это свидетельствует о достаточно высокой гемостатической эффективности rFVIIa, а с другой — говорит о том, что у части пациентов достичь остановки кровотечения с помощью этого препарата не удастся. В то же время у некоторых пациентов применение rFVIIa было ассоциировано с развитием артериальных и венозных тромботических событий, ставших причиной смерти 18 % пациентов с этим осложнением [274]. В целом эти данные указывают на значительную вариабельность индивидуальной реакции пациентов на этот препарат — от полного ее отсутствия (неэффективности препарата) до чрезмерной реакции (тромбоз).

Учитывая механизм действия rFVIIa, мы предположили, что в основе столь различной индивидуальной эффективности этого препарата может лежать различная степень коррекции генерации тромбина у разных пациентов с ТГ. Для исследования этого предположения мы проанализировали изменения генерации тромбина при добавлении rFVIIa в обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП), полученную от 24 пациентов с ТГ типа 1. Исследования показали, что статистически значимая коррекция генерации тромбина наступает при использовании rFVIIa уже в концентрации 0,7 и 1,4 мкг/мл, что эквивалентно дозам 25 и 50 мкг/кг соответственно. Однако детальный анализ тромбограмм каждого отдельно взятого пациента показал, что коррекция генерации тромбина носят ярко выраженный

индивидуальный характер: если у одних пациентов применение rFVIIa в конечной концентрации 0,7 мкг/мл (эквивалентно дозе 25 мкг/кг) уже позволяет достичь максимальной коррекции всех изученных показателей генерации тромбина (пациенты с «сильным» ответом), то у других — применение этого препарата в конечной концентрации 3,5 и даже 7,0 мкг/мл (эквивалентно дозам 125 и 250 мкг/кг соответственно) не вызывало коррекции ни одного из изученных показателей (пациенты со «слабым» ответом). У некоторых пациентов добавление rFVIIa в ОТП вызывало коррекцию какого-либо одного показателя генерации тромбина (пациенты со «средним» ответом).

Обнаруженная нами вариабельность ответа показателей теста генерации тромбина на добавление rFVIIa в ОТП согласуется с клиническими данными о различной эффективности этого препарата у пациентов с ТГ. Полученные данные дают основание полагать, что для остановки кровотечения у пациентов, у которых максимальная коррекция генерации тромбина была достигнута при использовании rFVIIa в минимальных концентрациях, будет достаточно небольшой дозы этого препарата, что позволит минимизировать риск тромботических осложнений. В то же время у пациентов, у которых коррекция генерации тромбина не наступала ни при одной из использованных концентраций rFVIIa, введение этого препарата даже в высоких дозах, скорее всего, не позволит достичь необходимого гемостатического эффекта. В этом случае будет необходимо выбирать альтернативную терапевтическую стратегию. Следовательно, пациенты могли бы получить выгоду от предварительной оценки влияния различных концентраций rFVIIa на генерацию тромбина *in vitro*. Для проверки этих предположений требуется проведение специального клинического исследования, в котором доза rFVIIa будет определяться индивидуально для каждого пациента на основании предварительного тестирования возможности коррекции генерации тромбина с помощью этого препарата *ex vivo*, как это было сделано в настоящей работе.

Чтобы понять, связаны ли различия в степени коррекции генерации тромбина, обнаруженные при добавлении в ОТП концентрата rFVIIa, с мутациями, лежащими в основе ТГ, мы проанализировали информацию о генотипе пациентов,

вошедших в настоящее исследование. Оказалось, что у 23 из 25 пациентов выявляется одна из двух мутаций: 13-bp del в гене *ITGA2B* (у 8 пациентов) или 11-bp del в гене *ITGB3* (у 15 пациентов). Главным отличием между этими пациентами является то, что у пациентов с мутацией в гене *ITGB3* отсутствуют одновременно и интегрины $\alpha\text{IIb}\beta 3$, и интегрины $\alpha\nu\beta 3$, тогда как у пациентов с мутацией в гене *ITGA2B* отсутствуют только интегрины $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и при этом имеется дополнительная экспрессия (оверэкспрессия) интегринов $\alpha\nu\beta 3$. Сравнение показателей теста генерации тромбина у пациентов с этими мутациями показало, что у пациентов с мутацией в гене *ITGA2B* пиковая концентрация тромбина в среднем была выше, чем у пациентов с мутацией в гене *ITGB3*, однако различий в степени коррекции генерации тромбина при добавлении в ОТП концентрата rFVIIa между этими подгруппами пациентов выявлено не было. Это позволяет сделать предположение о том, что тип мутации, лежащей в основе ТГ и, следовательно, различный уровень экспрессии интегринов $\alpha\nu\beta 3$ не является фактором, определяющим выраженность корригирующего эффекта при использовании rFVIIa при данной патологии. Для верификации этого предположения требуется проведение дополнительного исследования, в котором будут набраны разные группы пациентов достаточного объема, отличающиеся по типу мутации, что представляется затруднительным ввиду большого разнообразия мутаций, лежащих в основе данного заболевания.

Остается также открытым вопрос о том, имеется ли взаимосвязь между исходным значением показателей генерации тромбина и степенью его коррекции после добавления в кровь rFVIIa. Ввиду того что эти показатели являются математически связанными (степень коррекции показателя выражается в процентах от его исходного значения), вычисление для них коэффициента корреляции Пирсона может привести к ошибочному выводу. Оценка корреляционной связи между математически связанными показателями является предметом дискуссии среди специалистов по статистике в настоящее время [370].

Таким образом, проведенное исследование показало, что у пациентов с ТГ в среднем имеет место пониженная генерация тромбина, что может быть скорри-

гировано путем применения концентрата rFVIIa. При этом установлено, что степень коррекции генерации тромбина носит ярко выраженный индивидуальный характер: если в одних образцах ОТП добавление rFVIIa в конечной концентрации 0,7 мкг/мл (соответствует дозе 25 мкг/кг) уже вызывает максимальное увеличение генерации тромбина, то в других — добавление этого препарата даже в 10 раз большей концентрации не вызывает заметного изменения генерации тромбина. Предварительное тестирование возможности коррекции генерации тромбина путем добавления в ОТП пациентов rFVIIa в различных концентрациях может стать основанием для разработки метода персонализированного определения наименьшей эффективной дозы этого препарата, что позволит, с одной стороны, минимизировать риск развития тромботических осложнений, а с другой — выявить пациентов, назначение rFVIIa которым даже в высокой дозе не вызовет желаемого терапевтического эффекта.

Как было отмечено ранее, на сегодняшний день rFVIIa — это единственный препарат, рекомендованный в качестве альтернативы трансфузии тромбоцитарного концентрата для купирования и профилактики больших кровотечений у пациентов с ТГ. Влияние других препаратов на гемостатический потенциал крови при указанной патологии во многом остается неизученным. Одной из причин этого является невысокая распространенность ТГ, что определяет потребность в разработке экспериментальных моделей этого заболевания.

В настоящем исследовании мы разработали модель ТГ, полностью отвечающую вышеуказанным требованиям. Для создания такой модели мы инкубировали ОТП с эптифибатидом — высокоселективным низкомолекулярным антагонистом интегрина $\alpha IIb\beta 3$, конкурирующим с фибриногеном и другими лигандами за связывание с этим рецептором тромбоцитов. Для верификации этой модели мы провели три серии экспериментов, в которых сравнили поведение тромбоцитов, полученных от пациентов с ТГ (типа 1), с поведением тромбоцитов в нашей модели.

Во-первых, мы исследовали адгезию тромбоцитов к полистирену в цельной крови при высокой скорости сдвига. Ранее было показано, что при помещении

цельной крови в полистиреновую ячейку происходит иммобилизация содержащихся в ней фибриногена и VWF на полистиреновой поверхности, что делает ее адгезивной для тромбоцитов. Адгезия тромбоцитов в условиях высокой скорости сдвига инициируется взаимодействием рецепторного комплекса GPIb-IX-V с иммобилизованным VWF и далее стабилизируется взаимодействием интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с тем же VWF и фибриногеном, также иммобилизованным на полистирене. Ранее было установлено, что у пациентов с ТГ типа 1 ввиду отсутствия интегринов $\alpha IIb\beta 3$ адгезия тромбоцитов к полистирену в условиях высокой скорости сдвига является невозможной [332]. Проведенные нами исследования показали, что как у пациентов с ТГ, так и при обработке нормальных тромбоцитов эптифибатидом отсутствовала адгезия и агрегация тромбоцитов на полистирене при высокой скорости сдвига, что согласуется с ранее полученными результатами [332], а также с данными об увеличении «времени закрытия» при исследовании функций тромбоцитов у пациентов с ТГ с помощью анализатора PFA-100 [344]. Кроме того, показано, что нарушение адгезии тромбоцитов при ТГ обусловлено их неспособностью распластываться на поверхности внеклеточного матрикса и образовывать фокальные адгезионные контакты, что делает их адгезию неустойчивой [153].

Во-вторых, мы исследовали агрегацию тромбоцитов, используя в качестве индукторов агрегации TRAP и ристоцетин. TRAP реализует свое действие через рецептор PAR-1, сопряженный с G_{aq} , G_{ai} и $G_{a12/13}$, и рецептор PAR-4, сопряженный с G_{aq} и $G_{a12/13}$. Активация указанных G-белков приводит к индукции множества сигнальных путей, вызывающих активацию интегринов $\alpha IIb\beta 3$ «изнутри наружу». Активация интегринов проявляется в изменении их конформации, приводящем к повышению их аффинности к лигандам. Это приводит к связыванию фибриногена интегринными $\alpha IIb\beta 3$ и агрегации тромбоцитов. Исследование показало, что как у пациентов с ТГ, так и у здоровых добровольцев после обработки их тромбоцитов эптифибатидом, добавление TRAP в ОТП не приводит к их агрегации.

Ристоцетин представляет собой антибиотик, который при добавлении в плазму вызывает модификацию растворенных в ней молекул VWF, так что это приводит к экспозиции сайтов, служащих для взаимодействия с рецепторным

комплексом GPIb-IX-V тромбоцитов. После этой модификации молекулы VWF соединяются с комплексом GPIb-IX-V и служат мостиками между тромбоцитами. Агрегация тромбоцитов в данном случае не требует обязательного участия интегринов $\alpha IIb\beta 3$ (на начальных этапах агрегации) и поэтому сохраняется даже у пациентов с ТГ. Наличие ристоцетининдуцированной агрегации тромбоцитов при отсутствии агрегации, индуцируемой другими агонистами (АДФ, адреналин, арахидоновая кислота, тромбин, TRAP, коллаген и др.), является одним из главных диагностических критериев ТГ [29]. Проведенные исследования показали, что как у пациентов с ТГ, так и при инкубации тромбоцитов с эптифибатидом ристоцетин индуцировал агрегацию. При этом обращал внимание спонтанно обратимый характер агрегации, притом что у здоровых добровольцев агрегация была необратимой. Действительно, анализ литературы показал, что несмотря на сохранение у пациентов с ТГ ристоцетининдуцированной агрегации как таковой, ее параметры могут существенно отличаться по сравнению со здоровыми добровольцами. В частности, другими авторами было показано, что скорость, максимальная амплитуда и форма агрегатограмм при ТГ заметно варьируют и во многом зависят от использованной концентрации ристоцетина. Спонтанно обратимый и даже осцилляторный характер ристоцетининдуцированной агрегации тромбоцитов является весьма типичным для ТГ [96, 236], что согласуется с полученными нами данными. Кроме того, аналогичный эптифибатида эффект вызывает инкубация ОТП с моноклональными антителами 10E5 к субъединице αIIb интегринов $\alpha IIb\beta 3$. Инкубация с этими антителами вызывала полную блокаду АДФ-, адреналин- и тромбининдуцированной агрегации. При использовании ристоцетина в высокой дозе инкубация с этими антителами приводила к снижению скорости агрегации тромбоцитов, а при использовании этого индуктора в низкой дозе, вызывающей двухволновую агрегацию, — к отмене второй волны агрегации [98].

В-третьих, мы изучили состав цитоскелета тромбоцитов в динамике ристоцетининдуцированной агрегации тромбоцитов у здоровых добровольцев без инкубации полученной ОТП с эптифибатидом (контроль), у здоровых добровольцев с инкубацией ОТП с эптифибатидом (модель) и пациентов с ТГ. Исследование

показало, что в покоящихся тромбоцитах, полученных от здоровых добровольцев, вне зависимости от наличия эптифибатида ни интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$, ни комплекс GPIb-IX-V не ассоциированы с цитоскелетом, что согласуется с результатами других авторов [209, 300]. Аналогичные результаты были зарегистрированы и у пациентов с ТГ с тем лишь замечанием, что интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и не мог быть ассоциирован с цитоскелетом ввиду его отсутствия в тромбоцитах при данной патологии. Индукция агрегации тромбоцитов с помощью ристоцетина в контрольных образцах приводила к устойчивой (продолжавшейся не менее 5 мин) ассоциации обоих рецепторов с цитоскелетом. Блокада интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с помощью эптифибатида делала невозможной их ассоциацию с цитоскелетом и обуславливала транзиторный характер ассоциации рецепторного комплекса GPIb-IX-V с цитоскелетом тромбоцитов. У пациентов с ТГ также наблюдалась транзиторная ассоциация рецепторного комплекса GPIb-IX-V с цитоскелетом. Примечательно, что начало последующей диссоциации комплекса GPIb-IX-V от цитоскелета и у пациентов с ТГ, и в модели этой патологии по времени совпадало с началом спонтанной дезагрегации тромбоцитов. Данный эксперимент позволяет не только проверить соответствие динамики цитоскелета в обработанных эптифибатидом нормальных тромбоцитах таковой в тромбоцитах, полученных от пациентов с ТГ, но и свидетельствуют о том, что ассоциация рецепторного комплекса GPIb-IX-V с цитоскелетом происходит в два этапа: начальный этап, не зависимый от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, заключается в транзиторной ассоциации комплекса GPIb-IX-V с цитоскелетом и обеспечивает начальную, обратимую фазу ристоцетининдуцированной агрегации, и поздний этап, зависимый от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, заключается в стабилизации связи комплекса GPIb-IX-V с цитоскелетом и требует активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$, связывания ими фибриногена и сигнализации «снаружи внутрь», что также обеспечивает стабилизацию тромбоцитарных агрегатов в динамике ристоцетининдуцированной агрегации. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что ассоциация интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом требует обязательного их связывания с фибриногеном.

Нельзя не отметить, что несмотря на сходство поведения тромбоциты в разработанной нами модели отличаются от таковых у пациентов с ТГ. Например, в модели интегрины $\alpha\text{IIb}\beta 3$ нормальной структуры и в должной мере представлены на мембране тромбоцитов, хотя и заблокированы эптифибатидом, тогда как у пациентов с ТГ количество тромбоцитов, как правило, снижено, а имеющиеся интегрины отличаются ненормальной структурой и функцией, что необходимо учитывать при интерпретации полученных с ее помощью результатов.

Несмотря на вышеуказанные и другие ограничения, характерные для любых моделей *in vitro*, наша модель воспроизводит различные нарушения функциональной активности тромбоцитов, характерные для ТГ. Безусловным преимуществом разработанной нами модели является использование человеческих тромбоцитов, что упрощает экстраполяцию получаемых в этой модели результатов на пациента (в отличие от моделей на трансгенных животных), позволяет исследовать различные присущие исключительно тромбоцитам функции в условиях блокады интегрина $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (что невозможно в моделях на трансгенных клетках). Кроме того, использование цельной крови человека для создания этой модели позволяет исследовать влияние различных комбинаций гемостатических препаратов с применением методов глобальной оценки гемостатического потенциала крови, получающих все большее распространение в клинической практике. Разработанную нами модель также отличает простота воспроизведения и небольшая стоимость. Эта модель была использована нами в последующих экспериментах.

Ранее мы отмечали, что rFVIIa на сегодняшний день является единственным препаратом, рекомендованным в качестве альтернативы трансфузии тромбоцитарного концентрата при ТГ. Показано, что применение rFVIIa при указанной патологии вызывает ускорение генерации тромбина и увеличение общего его количества, что способствует более раннему началу формирования кровяного сгустка и уменьшению его проницаемости [162], хотя и не оказывает при этом заметного влияния на максимальную плотность сгустка [216]. В связи с этим интерес представляет поиск таких гемостатических средств, которые способствовали

бы увеличению плотности кровяного сгустка при ТГ и расширили бы возможности экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при этой патологии.

Логичными кандидатами на эту роль являются концентраты фибриногена и FXIII. Несмотря на то что при ТГ снижение плотности сгустка обусловлено, главным образом, снижением генерации тромбина и неспособностью тромбоцитов реализовать свою контрактильную функцию при сохранении нормальной концентрации фибриногена в плазме, мы полагаем, что повышение концентрации фибриногена могло бы увеличить степень переплетения нитей фибрина в сгустке и тем самым увеличить его плотность и усилить гемостатический потенциал крови при этой патологии. Несмотря на то что у пациентов с ТГ уровень FXIII остается в пределах нормальных значений, мы полагаем, что повышение концентрации в плазме этого фактора свертывания будет способствовать формированию более плотного и устойчивого к фибринолизу сгустка при этой патологии.

При изучении литературы мы обнаружили лишь одну публикацию, в которой описывается опыт применения концентратов фибриногена и FXIII (в сочетании с транексамовой кислотой и rFVIIa) для профилактики кровотечения в послеоперационном периоде у пациентки с ТГ [223]. Иными словами, на сегодняшний день влияние концентратов фибриногена и FXIII на формирование кровяного сгустка при ТГ остается практически неисследованным. В связи с этим мы изучили особенности формирования кровяного сгустка у пациентов с ТГ типа 1 и в модели этой патологии, а также возможности коррекции этого процесса с помощью указанных концентратов факторов свертывания.

Исследования показали, что для ТГ характерно существенное нарушение формирования кровяного сгустка, выражающееся, главным образом, в уменьшении его плотности, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [216, 364]. Наиболее вероятным механизмом снижения плотности кровяного сгустка при ТГ является одновременное нарушение прокоагулянтной и контрактильной функций тромбоцитов. Нарушение прокоагулянтной функции, как мы уже отмечали ранее, обусловлено снижением экспрессии фосфатидилсерина на мембране активированных тромбоцитов, а также снижением образования тромбо-

цитами содержащих фосфатидилсерин микрочастиц. Это приводит к снижению суммарной площади прокоагулянтной поверхности, служащей для сборки теназного и протромбиназного комплексов, и, как следствие, к снижению генерации тромбина [118]. Последнее приводит к замедлению превращения фибриногена в фибрин, в результате чего образуется более проницаемый и менее устойчивый к лизису сгусток, состоящий из толстых, слабо переплетенных и мало разветвленных нитей фибрина [390].

Нарушение контрактильной функции тромбоцитов при ТГ обусловлено тем, что по причине дефицита и/или дисфункции интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ тромбоциты оказываются неспособными генерировать контрактильную силу и транслировать ее на структуры внеклеточного матрикса, в т. ч. на нити фибрина, составляющие основу сгустка. Нарушение этой функции тромбоцитов делает невозможной ретракцию сгустка — процесс, в ходе которого нормальные тромбоциты стягивают фибриновые нити сгустка [372]. Наблюдаемое при ТГ нарушение ретракции сгустка приводит к снижению его плотности, увеличению проницаемости и подверженности лизису [99]. Учитывая, что коррекция генерации тромбина, наблюдаемая при использовании rFVIIa, хотя и сокращает время, необходимое для начала формирования сгустка, не приводит к увеличению его плотности, можно сделать вывод, что нарушение контрактильной функции является основной причиной снижения плотности кровяного сгустка при ТГ [216].

Далее мы исследовали возможность коррекции плотности сгустка при ТГ с помощью концентратов фибриногена и FXIII. Проведенные исследования показали, что увеличение концентрации фибриногена в плазме пациентов с ТГ на 3 г/л приводит к увеличению плотности кровяного сгустка, тогда как увеличение концентрации FXIII на 2 МЕ/мл не вызывает значимого корригирующего эффекта, а эффект от одновременного применения этих веществ не отличался от такового при использовании концентрата фибриногена отдельно. Полученные данные говорят об эффективности концентрата фибриногена и неэффективности FXIII в этих условиях. Последнее, вероятно, связано с отсутствием условий для реализации эффектов FXIII. В частности, поскольку у пациентов с ТГ нет дефицита FXIII и

поскольку кровь получали у них в ходе планового обследования, т. е. в ситуации, не предполагающей повышение фибринолитической активности плазмы, возможности для реализации эффекта концентрата FXIII в данных условиях не было. Кроме того, поскольку у пациентов с ТГ типа 1 на мембране тромбоцитов отсутствуют интегрины $\alpha IIb\beta 3$, FXIII не может выполнить еще одну важнейшую функцию — «сшивание» нитей фибрина с интегринами $\alpha IIb\beta 3$, что необходимо для ретракции сгустка. В отличие от этого увеличение уровня фибриногена в крови пациентов способствовало повышению плотности сгустка за счет увеличения количества нитей фибрина в сгустке и их необходимым «сшиванием» в условиях достаточной активности эндогенного FXIII.

У большинства пациентов с ТГ хотя бы раз в жизни возникает большое кровотечение [136]. Потеря значительного количества крови приводит к гипоперфузии тканей, выделению в кровь катехоламинов, вазопрессина и других биологически активных веществ, вызывающих активацию большого количества эндотелиальных клеток и высвобождение ими tPA [184]. Последнее приводит к повышению активности пламина в крови и развитию гиперфибринолиза. Учитывая высокую склонность пациентов с ТГ к кровотечениям, а следовательно, и повышенный риск развития у них гиперфибринолиза, мы исследовали у них особенности формирования кровяного сгустка в условиях tPA-индуцированного фибринолиза и возможность коррекции обнаруженных нарушений с помощью концентратов фибриногена и FXIII.

Исследование показало, что добавление tPA в кровь пациентов с ТГ не только индуцировало лизис кровяного сгустка, но и вызывало снижение его максимальной плотности. По-видимому, данный эффект обусловлен тем, что при выполнении тромбоэластометрии формирование кровяного сгустка происходило на фоне нарастающей генерации пламина, в результате чего лизис сгустка начинался еще до достижения им максимальной плотности. В условиях гиперфибринолиза у пациентов с ТГ добавление в кровь концентрата фибриногена способствовало повышению плотности сгустка, что, вероятно, объясняется увеличением количества нитей фибрина в образующемся сгустке, хотя и не приводило к отдалению

момента начала лизиса сгустка. Добавление концентрата FXIII не вызывало заметных изменений в формировании сгустка, однако при его использовании вместе с концентратом фибриногена наблюдалось и увеличение плотности сгустка, и отдаление времени начала лизиса. Иными словами, антифибринолитический эффект FXIII реализовывался только в условиях повышенной концентрации фибриногена в плазме. Отсутствие заметного эффекта концентрата FXIII при его использовании отдельно могло быть обусловлено его недостаточной активацией в условиях избыточного фибринолиза, поскольку фибрин, как известно, является важным фактором, необходимым для активации FXIII. Как известно, присутствующий в плазме FXIII представляет собой тетрамер, состоящий из двух субъединиц А, образующих активный центр фермента, и двух субъединиц В, служащих переносчиком для субъединиц А. Переход FXIII в активную форму (FXIIIa) происходит в два этапа. На первом этапе под влиянием тромбина от субъединиц А отщепляется по одному активационному пептиду; на втором этапе происходит диссоциация субъединиц В, что приводит к изменению конформации субъединиц А и значительному повышению их каталитической активности. Связывание FXIII с α С-областью фибрина значительно ускоряет диссоциацию субъединиц В и, следовательно, активацию FXIII [62]. Наблюдаемое в присутствии tРА снижение максимальной плотности сгустка свидетельствует об уменьшении количества фибрина и доступных α С-областей в сгустке, что ограничивает возможность связывания с фибрином и активации добавленного в кровь FXIII. В то же время добавление в кровь фибриногена приводит к увеличению количества фибрина в сгустке, на что указывает увеличение его максимальной плотности, а следовательно, и к увеличению количества сайтов для связывания и активации FXIII. Именно в этих условиях мы и наблюдали антифибринолитическое действие последнего.

Аналогичные закономерности в действии концентратов фибриногена и FXIII были обнаружены и в разработанной нами модели ТГ. Это дополнительно свидетельствует о том, что эта модель адекватно отражает нарушения в системе гемо-

стаза, характерные для ТГ, и позволяет объективно оценивать возможности их коррекции.

Таким образом, проведенное исследование показало потенциальную возможность коррекции плотности кровяного сгустка при ТГ с помощью концентратов фибриногена и FXIII, однако при выборе этих средств важно учитывать выраженность фибринолитической активности плазмы. При отсутствии гиперфибринолиза целесообразно использовать концентрат фибриногена, что позволяет увеличить плотность сгустка, а при наличии гиперфибринолиза — комбинацию концентрата фибриногена и FXIII, что позволяет одновременно достичь коррекции и плотности, и фибринолитической устойчивости сгустка. Использование концентратов фибриногена и FXIII по отдельности не позволяет достичь коррекции фибринолитической устойчивости кровяного сгустка.

Снижение гемостатического потенциала при ТГ обусловлено не только нарушением адгезивной, агрегационной и контрактильной функций тромбоцитов, т. е. функций, напрямую зависящих от взаимодействия интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с фибриногеном и фибрином, но и нарушением экспрессии фосфатидилсерина на мембране тромбоцитов и тромбоцитарных микрочастиц. Это приводит к уменьшению площади прокоагулянтной поверхности и снижению генерации тромбина, необходимого для формирования фибриновой сети. Тем не менее существующие на данный момент методы экстренной коррекции гемостатического потенциала при ТГ сводятся главным образом к переливанию тромбоцитарного концентрата и введению концентрата rFVIIa. Хотя введение rFVIIa пациентам с ТГ и приводит к увеличению экспрессии фосфатидилсерина тромбоцитами, методы, которые были непосредственно направлены на усиление прокоагулянтных свойств тромбоцитов, на сегодняшний день отсутствуют.

Исследования последних лет указывают на то, что активированные тромбоциты образуют как минимум две фенотипически различные субпопуляции: агрегирующие тромбоциты и прокоагулянтные (сверхактивированные, «укутанные») тромбоциты. Агрегирующие тромбоциты — это тромбоциты, которые адгезируют к поврежденной сосудистой стенке, агрегируют друг с другом,

формируя основу тромбоцитарной пробки. Функция этих тромбоцитов существенно зависит от наличия на их мембране интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Прокоагулянтные тромбоциты располагаются кнаружи от агрегирующих [270], экспрессируют значительное количество фосфатидилсерина и служит для генерации тромбина. Важной особенностью прокоагулянтных тромбоцитов является инактивация интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и неспособность образовывать агрегаты, что делает их схожими с тромбоцитами при ТГ.

Одним из основных факторов, определяющих фенотип активированных тромбоцитов, является степень их активации. Чем сильнее активирующий стимул, тем меньше доля агрегирующих и больше доля прокоагулянтных тромбоцитов. В связи с этим мы предположили, что, дополнительно стимулируя тромбоциты при ТГ, можно увеличивать долю прокоагулянтных тромбоцитов, экспрессирующих фосфатидилсерин, и тем самым способствовать генерации большего количества тромбина, что в конечном счете должно приводить к увеличению плотности фибриновой сети и усилению гемостатического потенциала при этой патологии. Для проверки данного предположения мы изучили возможность коррекции формирования кровяного сгустка в модели ТГ *in vitro* путем дополнительной стимуляции тромбоцитов растворимыми агонистами, действующими через рецепторы, сопряженные с G-белком.

Проведенные исследования показали, что сочетанная стимуляция Ga_q , Ga_i и $\text{Ga}_{12/13}$ тромбоцитов с помощью TRAP и в меньшей степени сочетанная стимуляция Ga_q и Ga_i с помощью АДФ способствуют формированию кровяного сгустка, что выражается в укорочении времени, необходимого для начала генерации тромбина, ускорении начального этапа формирования сгустка и увеличении максимальной плотности кровяного сгустка. Для уточнения роли TXA_2 в реализации этих эффектов TRAP и АДФ мы повторили эксперименты, дополнительно проинкубировав тромбоциты с АСК. Присутствие АСК полностью отменяло стимулирующее действие TRAP и частично отменяло действие АДФ, что свидетельствует о большей значимости синтеза TXA_2 для реализации вышеуказанных эффектов TRAP, нежели АДФ. Полученные результаты также говорят о том, что активация

представителей всех трех семейств G-белков с помощью TRAP достаточна для синтеза TXA_2 даже при заблокированных интегринных $\alpha\text{IIb}\beta_3$, что согласуется с ранее опубликованными данными о нормальном синтезе TXA_2 при стимуляции тромбоцитов тромбином у пациентов с ТГ [234]. В то же время менее выраженный стимулирующий эффект сочетанной активации Ga_q и Ga_i с помощью АДФ, а также меньшая вовлеченность TXA_2 в его реализацию согласуется с данными о необходимости сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ для синтеза TXA_2 при действии АДФ [66, 182]. Селективная активация Ga_q , Ga_i или $\text{Ga}_{12/13}$ не вызывала заметной стимуляции формирования кровяного сгустка в модели ТГ, что говорит о необходимости их сочетанной активации для усиления прокоагулянтной функции тромбоцитов.

Для проверки предположения о большой роли синтеза TXA_2 и стимуляции соответствующих тромбоксан-простаноидных рецепторов, сопряженных с Ga_q и $\text{Ga}_{12/13}$, в усилении прокоагулянтных свойств тромбоцитов мы использовали стабильный аналог TXA_2 (U46619). Стимуляция тромбоцитов с помощью U46619 вызывала выраженный прокоагулянтный эффект, аналогичный таковому при использовании TRAP. Поскольку эффект усиления формирования кровяного сгустка, связанный с дополнительной стимуляцией рецепторов, сопряженных с G-белком, происходит в условиях блокады интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$, можно сделать вывод о том, что реализация этого эффекта не требует сигнализации «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$.

Полученные данные обосновывают возможность применения нового, тромбоцитоориентированного подхода к коррекции гемостатического потенциала крови, который может быть применен при дефиците и дисфункции интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ — тромбастении Гланцмана, а также назначении пациенту эптифибатида и, возможно, других антагонистов указанного рецептора.

Таким образом, в данном разделе работы мы показали, что у пациентов с ТГ степень коррекции генерации тромбина при использовании концентрата rFVIIa *ex vivo* носит ярко выраженный индивидуальный характер: у одних пациентов полная коррекция генерации тромбина наступает при использовании этого

препарата в концентрации 0,7 мкг/мл (соответствует дозе 25 мкг/кг), то у других — коррекция не наступает и при его использовании в концентрации 7,0 мкг/мл (соответствует дозе 250 мкг/кг). Мы также обосновали целесообразность использования теста генерации тромбина для предварительной оценки возможности коррекции гемостатического потенциала крови при тромбастении Гланцмана с помощью rFVIIa, а также для разработки метода персонализированного подбора дозы этого препарата. Была разработана оригинальная модель тромбастении Гланцмана *in vitro*, основанная на инкубации крови или ее компонентов с эпифибатидом — низкомолекулярным антагонистом интегринов $\alpha IIb\beta 3$. С помощью разработанной модели мы показали возможность применения концентратов фибриногена и фактора XIII для коррекции формирования кровяного сгустка в зависимости от уровня фибринолитической активности плазмы, а также возможность коррекции формирования кровяного сгустка путем дополнительной стимуляции тромбоцитов с помощью растворимых тромбоцитарных агонистов, действующих через рецепторы, сопряженные с G-белками и при этом установили, что механизм усиления прокоагулянтных свойств тромбоцитов (коррекции формирования сгустка) частично зависит от синтеза TXA_2 и не зависит от интегринов $\alpha IIb\beta 3$.

Формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» как индикатор степени угнетения функциональной активности тромбоцитов

Для снижения риска развития сердечно-сосудистых событий после перенесенного инфаркта миокарда или нестабильной стенокардии рекомендуется назначение двойной антитромбоцитарной терапии (ДАТТ), включающей АСК и антагонист рецептора $P2Y_{12}$ тромбоцитов. Применение ДАТТ сопряжено с риском развития кровотечений, что обусловлено избыточным угнетением функций тромбоцитов при использовании стандартных дозу антитромбоцитарных препаратов у части пациентов [23, 56, 362]. В связи с этим существует потребность в разработке персонализированного подхода к назначению ДАТТ, основанному на мониторинговании остаточной реактивности тромбоцитов у конкретного пациента. Это

позволит индивидуально подбирать оптимальную дозу препаратов, которая будет достаточно эффективна и в то же время безопасна.

В настоящей работе мы предприняли попытку разработать на основе метода световой трансмиссионной агрегометрии новый подход к оценке остаточной реактивности тромбоцитов. Предлагаемый подход заключается в определении степени угнетения формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов под влиянием антиагрегационных препаратов. Прежде всего, мы проанализировали закономерности формирования указанного комплекса. Изучение состава не растворимой в Тритоне X-100 фракции тромбоцитов, содержащей цитоскелет и связанные с ним белки, показало, что цитоскелет покоящихся тромбоцитов содержит определенное количество полимеризованного β -актина и практически не содержит интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$. TRAP-индуцированная агрегация тромбоцитов приводит к дополнительному накоплению в цитоскелете полимеризованного β -актина и ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом, что согласуется с результатами других авторов [208, 288]. Стимуляция тромбоцитов с помощью TRAP в присутствии эптифибатида (антагониста интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$) вызывает полимеризацию β -актина, но не приводит к ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом. Отсутствие ассоциации этих рецепторов с цитоскелетом было также показано при стимуляции тромбоцитов с помощью U46619 или АДФ в присутствии пептида RGDS (блокатора интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$) [208, 279], а также с помощью тромбина в присутствии ЭДТА (нарушает связывание фибриногена с интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$) [292]. Эти данные указывают на то, что активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ «изнутри наружу» недостаточно для их ассоциации с цитоскелетом и что для этого необходимо связывание фибриногена и/или агрегация тромбоцитов.

Далее мы показали, что стимуляция тромбоцитов с помощью TRAP без перемешивания магнитной мешалкой (т. е. в условиях, при которых происходит активация интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и связывание фибриногена без последующей агрегации тромбоцитов) способна вызывать полимеризацию β -актина, но недостаточна для ассоциации αIIb с цитоскелетом. Следовательно, стимуляция тромбо-

цитов через рецепторы растворимых тромбоцитарных агонистов, сопряженные с G-белком, приводит к полимеризации β -актина и активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ независимо от того, произойдет ли последующее связывание с ними фибриногена и агрегация тромбоцитов. Тем не менее агрегация тромбоцитов является необходимой для ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом. Схожие результаты были получены другими авторами при стимуляции тромбоцитов с помощью АДФ без перемешивания магнитной мешалкой [208], а также при стимуляции отмытых тромбоцитов с помощью арахидоновой кислоты в присутствии фрагмента D фибриногена [387]. Значимость агрегации тромбоцитов для ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ цитоскелетом была также продемонстрирована в исследовании, в котором степень ассоциации интегринов была пропорциональна степени перемешивания суспензии тромбоцитов при их стимуляции тромбином [126].

В целом полученные результаты указывают на то, что ключевую роль в ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом играет физический контакт тромбоцитов друг с другом посредством фибриногеновых мостиков (собственно агрегация), а не просто активация интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и связывание с ними фибриногена. Чтобы отделить эффект образования физической связи между тромбоцитами от эффекта их стимуляции через рецепторы, сопряженные с G-белком, мы стимулировали тромбоциты с помощью МКА против LIBS6 — антител, которые связываются с субъединицей $\beta 3$ интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и вызывают смещение их конформационного равновесия в сторону активной, высокоаффинной конформации. Иными словами, МКА против LIBS6 вызывают активацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ напрямую, т. е. без предварительной стимуляции тромбоцитов через рецепторы, сопряженные с G-белком, и сигнализации «изнутри наружу». Проведенные исследования показали, что стимуляция тромбоцитов с помощью МКА против LIBS6 индуцирует двухволновую агрегацию. При этом первая волна агрегации есть результат прямого действия указанных антител на интегрины $\alpha\text{IIb}\beta 3$, а вторая волна — результат ауто- и паракринной стимуляции тромбоцитов эндогенными АДФ и TXA_2 . Это следует из того, что инкубация тромбоцитов с АСК и высокоселективными антагонистами рецепторов АДФ приводит к полной отмене

второй волны агрегации. Это говорит также о том, что применение МКА против LIBS6 в сочетании с АСК и антагонистами рецепторов АДФ позволяет изолировать эффект образования физической связи между тромбоцитами посредством фибриногеновых мостиков (собственно агрегации тромбоцитов) в процессе формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет». Анализ цитоскелетной фракции тромбоцитов показал, что образование фибриногеновых мостиков между тромбоцитами, не подкрепленное активацией тромбоцитов с помощью эндогенных АДФ и TXA_2 , недостаточно ни для полимеризации β -актина, ни для ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом. Несколько иные результаты были получены другими авторами, которые вместо МКА против LIBS6 использовали МКА D3, также способные вызывать активацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ напрямую. Эти антитела вызывали низкоамплитудную агрегацию тромбоцитов, приводящую к ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом [256]. Однако эта агрегация не сопровождалась секрецией АТФ (маркер высвобождения содержимого плотных гранул), что позволяет предположить, что АДФ (другой компонент плотных гранул) тоже не участвовал в этом процессе. Кроме того, авторы не изучали образование TXA_2 в тромбоцитах, который мог синтезироваться при их стимуляции с помощью МКА D3 и внести свой вклад в активацию тромбоцитов и ассоциацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом. Различия в эффектах, вызываемых МКА против LIBS6 и МКА D3, могли быть обусловлены тем, что указанные антитела связываются с разными эпитопами субъединицы $\beta 3$ интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [225], что могло по-разному отразиться на конформации интегринов и паттерне сигнализации «снаружи внутрь».

В результате стимуляции тромбоцитов интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ могут принимать различные конформации, отличающиеся по аффинности к фибриногену, что оказывает влияние на стабильность тромбоцитарных агрегатов. Прочность связи между интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном можно косвенно оценить по скорости эптифибатидиндуцированной дезагрегации тромбоцитов: чем больше скорость дезагрегации, тем меньше прочность связи между интегрином $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном. В настоящей работе мы показали, что тромбоцитарные агрегаты, образующиеся в

ходе TRAP-индуцированной агрегации тромбоцитов, включающей сигнализацию от рецепторов, сопряженных с G-белком, активацию интегринов «изнутри наружу», связывание фибриногена и сигнализацию от интегринов «снаружи внутрь», отличаются большей стабильностью по сравнению с агрегатами, образующимися при агрегации тромбоцитов, индуцированной с помощью МКА против LIBS6, включающей активацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ напрямую, связывание фибриногена и сигнализацию «снаружи внутрь». Полученные результаты свидетельствуют о большой роли сигнализации от рецепторов активации тромбоцитов, сопряженных с G-белком, в обеспечении прочности связи между интегринными $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном и стабильности тромбоцитарных агрегатов.

Таким образом, анализ механизмов формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» показал, что формирование указанного комплекса есть результат сочетанного действия сигнализации от рецепторов растворимых тромбоцитарных агонистов, сопряженных с G-белком, активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ «изнутри наружу», физического соединения тромбоцитов друг с другом через фибриноген (т. е. собственно агрегации тромбоцитов) и сигнализации от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ «снаружи внутрь».

При исследовании цитоскелета тромбоцитов было установлено, что агрегация тромбоцитов, индуцированная через рецепторы, сопряженные с G-белком, сопровождается стремительной полимеризацией β -актина, в результате которой количество актиновых филаментов в тромбоцитах возрастает более чем в 1,5 раза, что согласуется с результатами других авторов [180, 288, 324]. При этом для полимеризации β -актина достаточно активации тромбоцитов без последующей их агрегации, поскольку блокада интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ эпифибатидом не отражается на количестве β -актина в цитоскелете при стимуляции тромбоцитов с помощью TRAP. О незадействованности интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ в полимеризации β -актина свидетельствует также то, что она остается нормальной и у пациентов с тромбоастенией Гланцмана типа 1 [126, 324]. Тот факт, что именно активация тромбоцитов, а не их агрегация имеет значение для полимеризации актина, подтверждается и тем, что агрегация тромбоцитов, индуцированная с помощью МКА против

LIBS6 вызывает полимеризацию β -актина только при условии дополнительной стимуляции тромбоцитов эндогенными АДФ и ТХА₂, высвобождающимися из тромбоцитов при их активации.

Чтобы оценить роль полимеризации β -актина в формировании комплекса «фибриноген–интегрин α IIb β 3–цитоскелет», мы использовали цитохалазин D — ингибитор полимеризации актина. Проведенные исследования показали, что преинкубация тромбоцитов с цитохалазином D не оказывает влияния на амплитуду АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Аналогичные результаты были получены и при индукции агрегации с помощью тромбина [367], U46619, TRAP [366], коллагена и эпинефрина [241]. Хотя в некоторых работах было показано, что преинкубация с цитохалазином D может снижать амплитуду агрегации тромбоцитов, индуцированной тромбином, коллагеном или АДФ [252]. Неоднозначным оказалось влияние и других видов цитохалазина. Например, в одних исследованиях показано, что цитохалазин В не снижает амплитуду агрегации, индуцированной АДФ [289], тромбином [85] или коллагеном [202], тогда как в другом было показано, что цитохалазин В снижает амплитуду коллагениндуцированной агрегации [158]. Несовпадение результатов может быть обусловлено различиями в методиках выделения тромбоцитов, типом и концентрацией цитохалазина, временем инкубации, видом использованного агониста тромбоцитов и т. д.

Несмотря на то что блокада полимеризации актина в наших экспериментах не отражалась на амплитуде агрегации тромбоцитов, она приводила к существенному снижению стабильности тромбоцитарных агрегатов, на что указывает значительное увеличение скорости эпифибатидиндуцированной дезагрегации тромбоцитов, проинкубированных с цитохалазином D. Наши данные согласуются с результатами других авторов, показавших, что обработка тромбоцитов цитохалазином D повышает чувствительность U46619-, TRAP-, АДФ-, коллаген- и адреналининдуцированной агрегации к дезагрегирующему действию ЭДТА, МК-852 и GR144053 [241, 366]. Наиболее вероятным объяснением этой закономерности является то, что ингибирование полимеризации актина приводит к нарушению генерации в цитоскелете тромбоцитов контрактальной силы и/или к нарушению ее

трансмиссии во внеклеточное пространство и, как следствие, к нарушению уплотнения тромбоцитарных агрегатов. Последнее облегчает диффузию эпителифибрина в агрегат, где он конкурентно вытесняет фибриноген из связи с интегринами $\alpha IIb\beta 3$, вызывая тем самым дезагрегацию тромбоцитов. В пользу нашего предположения о механизме снижения стабильности тромбоцитарных агрегатов свидетельствует то, что ингибирование полимеризации актина с помощью цитохалазина D полностью блокирует вызываемую тромбоцитами ретракцию сгустка, которая непосредственно зависит от способности тромбоцитов генерировать контрактильную силу [84, 280].

Анализ цитоскелетной фракции тромбоцитов показал, что ингибирование полимеризации β -актина не отражается на ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом в динамике агрегации тромбоцитов. Это свидетельствует в пользу того, что главным фактором, который привел к снижению стабильности агрегатов, явилось именно нарушение генерации контрактильной силы, а не нарушение ее трансмиссии во внеклеточное пространство. Хотя нельзя исключить, что ингибирование полимеризации β -актина могло отразиться на их аффинности к фибриногену и оказать влияние на стабильность тромбоцитарных агрегатов [127]. Следовательно, хотя полимеризация β -актина и не является обязательной для агрегации тромбоцитов и ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом, она совершенно необходима для обеспечения прочности связи между интегринными $\alpha IIb\beta 3$ и фибриногеном.

Таким образом, исследование роли полимеризации β -актина в формировании комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов показало, что полимеризация актина не является обязательным условием агрегации тромбоцитов, но необходима для обеспечения высокой стабильности тромбоцитарных агрегатов и что нарушение полимеризации β -актина и обусловленное этим существенное снижение стабильности тромбоцитарных агрегатов не отражается на амплитуде агрегации тромбоцитов. Следовательно, амплитуда агрегации тромбоцитов не может служить надежным индикатором степени угнетения функциональной активности тромбоцитов, что важно учитывать

при определении остаточной реактивности тромбоцитов методом световой трансмиссионной агрегометрии.

Как мы уже отмечали ранее, современные схемы ДАТТ предполагают одновременно назначение пациенту АСК и антагониста рецептора $P2Y_{12}$. Однако комбинация этих препаратов у части пациентов вызывает осложнения в виде различных геморрагических событий, что говорит о необходимости поиска более безопасных подходов. Альтернативой антагонистам рецептора $P2Y_{12}$ могут стать антагонисты рецептора $P2Y_1$. В условиях *in vitro* их применение вызывает отчетливое угнетение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, а в экспериментах *in vivo* было показано, что дефицит рецепторов $P2Y_1$ не приводит к развитию больших кровотечений, что позволяет предполагать большую безопасность антагонистов рецептора $P2Y_1$ по сравнению с антагонистами рецептора $P2Y_{12}$. Несмотря на очевидный успех в разработке высокоселективных антагонистов рецептора $P2Y_1$, в клинической практике на сегодняшний день они не применяются, что обусловлено относительно коротким периодом их полужизни, токсичностью, ограниченной биодоступностью и другими факторами. Тем не менее попытки создания клинически эффективных антагонистов рецептора $P2Y_1$ продолжаются [187].

В связи с этим мы изучили влияние АСК и антагонистов рецепторов $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ на формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» в динамике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Проведенные исследования показали, что применение антагониста рецептора $P2Y_1$ вызывает наименьшее угнетение, выражающееся лишь в замедлении формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет». Более существенное угнетение отмечается при использовании АСК, выражающееся в снижении прочности связи между интегринами $\alpha IIb\beta 3$ и фибриногеном и снижении ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом тромбоцитов. Еще большее угнетение формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» отмечается при одновременном использовании антагониста рецептора $P2Y_1$ и АСК, что выражается в еще большем ослаблении связи между интегринами $\alpha IIb\beta 3$ и фибриногеном и полном нарушении

ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом. Применение антагониста рецептора P2Y_{12} вызывает максимальное угнетение формирования указанного комплекса, о чем свидетельствует спонтанно-обратимый характер связи между интегринами $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и фибриногеном и отсутствие связи между интегринами $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и цитоскелетом. Таким образом, одновременное применение АСК и антагониста P2Y_1 вызывает меньшее угнетение формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет», чем применение антагониста P2Y_{12} отдельно. Это дает основание полагать, что применение антагонистов P2Y_1 будет связано с меньшим риском геморрагических осложнений, чем применение ингибиторов P2Y_{12} .

При исследовании влияния антагониста рецептора P2Y_{12} на формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов мы также показали, что стимуляция тромбоцитов с помощью АК в присутствии указанного антагониста приводит к снижению амплитуды агрегации тромбоцитов, снижению ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом и снижению стабильности тромбоцитарных агрегатов, что, очевидно, обусловлено невозможностью эндогенного АДФ связаться с заблокированным рецептором P2Y_{12} и вызывать активацию $\text{G}\alpha_{i2}$. При этом усиленная стимуляция тромбоцитов с помощью АК и АДФ в присутствии того же антагониста вызывала полную коррекцию амплитуды агрегации тромбоцитов, но не приводила к соответствующему увеличению ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом и не оказывала влияния на стабильность тромбоцитарных агрегатов. Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами наших предыдущих экспериментов, посвященных изучению роли полимеризации β -актина в формировании комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет», в которых мы показали, что ингибирование полимеризации β -актина не отражается на амплитуде агрегации тромбоцитов, но приводит к значительному снижению стабильности тромбоцитарных агрегатов. Результаты этих экспериментов еще раз подчеркивают, что амплитуда агрегатограммы не всегда может служить надежным маркером степени угнетения функциональной активности тромбоцитов при назначении антитромбоцитарных препаратов.

Результаты экспериментов по изучению влияния антагониста рецептора $P2Y_{12}$ на формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» в динамике агрегации тромбоцитов, индуцированной с помощью АК, свидетельствуют также о том, что степень ассоциации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с цитоскелетом не является простой функцией амплитуды агрегации тромбоцитов, как это было предложено ранее [387], а представляет собой специфический ответ тромбоцитов на стимуляцию определенных G-белков. В частности, они указывают на необходимость индукции $G\alpha_{i2}$, с которым сопряжен рецептор $P2Y_{12}$, для обеспечения максимального формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет», что согласуется с результатами других авторов, показавших, что активация этого G-белка необходима для стабилизации тромбоцитарных агрегатов [368] и что оптимальная агрегация тромбоцитов требует участия представителей всех трех семейств G-белков — $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ и $G\alpha_{12/13}$ [201].

Значимость $G\alpha_i$ в обеспечении формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет», вероятно, объясняется тем, что стимуляция этого G-белка приводит к активации PI3K, Akt и Rap1b [224], необходимых для активации интегринов $\alpha IIb\beta 3$ [396]. Известно также, что активация $G\alpha_i$ приводит к ингибированию аденилатциклазы и, как следствие, к снижению активности протеинкиназы A, одним из субстратов которой является $G\alpha_{13}$. При этом недавно было установлено, что $G\alpha_{13}$ является важнейшим медиатором сигнального пути «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha IIb\beta 3$ [121]. В частности, активация интегринов $\alpha IIb\beta 3$ «изнутри наружу» и связывание с ними фибриногена вызывает диссоциацию талина от цитоплазматического хвоста субъединицы $\beta 3$ и присоединение к нему $G\alpha_{13}$, что считается самым ранним событием сигнального пути «снаружи внутрь» от интегринов $\alpha IIb\beta 3$. Дефицит фосфорилирования $G\alpha_{13}$ приводит к снижению связывания этого G-белка с цитоплазматическим доменом субъединицы $\beta 3$, что в свою очередь приводит к нарушению распластывания тромбоцитов и ингибированию второй волны тромбининдуцированной агрегации тромбоцитов [331]. Следовательно, возможно, что дефицит сигнализации от $G\alpha_{i2}$, обусловленный действием антагониста рецептора $P2Y_{12}$, приводит в итоге к нарушению связывания $G\alpha_{13}$ с субъединицей $\beta 3$, нарушению сигнализации

«снаружи внутрь» от интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и, как следствие, к снижению их ассоциации с цитоскелетом, что является критически важным для передачи контрактильной силы во внеклеточное пространство и стабилизации тромбоцитарных агрегатов.

Таким образом, что формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» является неотъемлемым условием образования стабильных и прочных тромбоцитарных агрегатов, что механизм подавления функции тромбоцитов при использовании АСК и/или антагонистов рецепторов P2Y_1 и P2Y_{12} включает нарушение формирования в тромбоцитах указанного комплекса. Это выражается как в снижении прочности связи интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с фибриногеном, так и в снижении ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом. Подавляя агрегацию тромбоцитов в одинаковой мере, разные антитромбоцитарные препараты могут в разной степени угнетать формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет». На этом основании можно сделать вывод о том, что измерение агрегации тромбоцитов не всегда дает адекватное представление о степени угнетения их функциональной активности при использовании антитромбоцитарных препаратов. Анализ формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» дает дополнительную информацию о степени подавления функциональной активности тромбоцитов.

Тестирование прочности связи интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с фибриногеном (стабильности тромбоцитарных агрегатов) и исследование ассоциации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом в динамике агрегации тромбоцитов может стать основой для разработки нового скринингового, легко воспроизводимого в условиях клиники метода оценки их остаточной реактивности при назначении антитромбоцитарной терапии (чем меньше ассоциация интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с цитоскелетом и меньше прочность их связи с фибриногеном, тем меньше остаточная реактивность тромбоцитов), а также метода выявления пациентов с повышенным риском кровотечений и метода персонализированного подбора дозы антитромбоцитарных препаратов. Мы также полагаем, что анализ формирования комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ –цитоскелет» в присутствии ингибиторов функций тромбоцитов может быть полезен для предварительной оценки соотношения эффективности и риска кровотечений при разработке новых антитромбоцитарных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. В условиях гемодилюции 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 гемодилюции, 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 гемодилюции, не осложненной гиперфибринолизом, коррекция формирования кровяного сгустка достигается с помощью концентрата фибриногена. При гемодилюции, 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 гемостатического 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–цито-

скелет», что выражается как в снижении прочности связи интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с фибриногеном, так и в снижении их ассоциации с цитоскелетом. Сигнализация от рецептора P2Y_{12} необходима для обеспечения прочности связи фибриногена с интегринами $\alpha\text{IIb}\beta 3$ 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 гемодилюции 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 активируемым 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 $P2Y_{12}$ тромбоцитов для контроля степени угнетения их функциональной активности целесообразно оценивать амплитуду агрегатограммы и формирование комплекса «фибриноген–интегрин $\alpha IIb\beta 3$ –цитоскелет» (прочность связи интегринов $\alpha IIb\beta 3$ с фибриногеном и их ассоциацию с цитоскелетом) в динамике агрегации тромбоцитов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ	аденозин-5'-дифосфат
АК	арахидоновая кислота
АКПК	активированный концентрат протромбинового комплекса
АСК	ацетилсалициловая кислота
АЧТВ	активированное частичное тромбопластиновое время
БТП	бедная тромбоцитами плазма
ГЕПЕС	N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота
ДМСО	диметилсульфоксид
ДСН	додецилсульфат натрия
ЕД	единица действия биологической активности
ИТП	иммунная тромбоцитопения
МЕ	международная единица биологической активности
МКА	моноклональные антитела
МНО	международное нормализованное отношение
ОТП	обогащенная тромбоцитами плазма
ПААГ	полиакриламидный гель
ПВ	протромбиновое время
ТВ	тромбиновое время
ТГ	тромбастения Гланцмана
ТКК	транексамовая кислота
ЭГТА	этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир) -N,N,N',N'-тетраацетат
ЭДТА	этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат
ФМСФ	фенилметансульфонилфторид
A10	Амплитуда тэмограммы на 10-й минуте
Aα	угол альфа
AUC	area under the curve; площадь под кривой
CFT	clot formation time; время формирования сгустка
СТ	clotting time; время свертывания

EC50	effective concentration 50; полумаксимальная эффективная концентрация
FII	фактор II (протромбин)
FV	фактор V (проакцелерин)
FVII	фактор VII (проконвертин)
FVIII	фактор VIII (антигемофильный фактор A)
FIX	фактор IX (антигемофильный фактор B)
FX	фактор X (фактор Стюарта–Прауэр)
FXIII	фактор XIII (фибринстабилизирующий фактор)
G-белок	гетеротримерный белок, связывающий гуаниновые нуклеотиды
GP	glycoprotein; гликопротеин
LIBS6	ligand-induced binding site 6; лигандом индуцируемый сайт связывания 6
LI30	lysis index at 30 min; индекс лизиса на 30-й минуте
LOT	lysis onset time; время начала лизиса
<i>M</i>	mean; выборочное среднее
MCF	maximal clot firmness; максимальная плотность сгустка
PAR-1	protease-activated receptor 1; протеазой активируемый рецептор 1
PBS	phosphate-buffered saline; натрий-фосфатный буфер
PGE ₁	prostaglandin E ₁ ; простагландин E ₁
<i>r</i>	коэффициент корреляции Пирсона
rFVIIa	рекомбинантный активированный фактор VII
ROTEM	rotational thromboelastometry; ротационная тромбоэластометрия
<i>SD</i>	standard deviation; выборочное стандартное отклонение
TAFI	thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor; активируемый тромбином ингибитор фибринолиза
TBS	Tris-buffered saline; Трис-солевой буфер
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20; Трис-солевой буфер с добавлением Твина 20
TF	tissue factor; тканевой фактор

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афончиков, В. С. Ранняя травматическая коагулопатия — один из факторов патогенеза острого периода травматической болезни / В. С. Афончиков, А. Ю. Каськов, С. Ш. Тания // Кремлевская медицина. Клинический вестник. — 2015. — № 2. — С. 170–174.
2. Афончиков, В. С. Гиперфибринолиз и ретракция сгустка крови при шокогенной травме / В. С. Афончиков, А. В. Михеева // Вестник интенсивной терапии. — 2016. — № 3. — С. 47–52.
3. Аюпова, Р. Ф. Эффективность множественных переливаний тромбоцитов / Р. Ф. Аюпова, У. С. Султанбаев, Е. Б. Жибурт // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. — 2017. — Т. 3, № 1. — С. 30–37.
4. Аюпова, Р. Ф. Риск гемотрансмиссивных инфекций в «период окна» / Р. Ф. Аюпова, Р. Г. Хамитов, Е. Б. Жибурт // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. — 2019. — Т. 5, № 3. — С. 260–263.
5. Бабак, С. И. Современные стратегии менеджмента инфузионной терапии при тяжелой травме / С. И. Бабак, И. А. Кучинская, О. А. Галушко, С. П. Дяченко // Экстренная медицина. — 2016. — Т. 5, № 4. — С. 560–567.
6. Барбараш, О. Л. Длительность двойной антитромбоцитарной терапии / О. Л. Барбараш // Атеротромбоз. — 2016. — № 1. — С. 59–68.
7. Барбараш, О. Л. Продолжительность двойной антитромбоцитарной терапии. Факты и предположения / О. Л. Барбараш, В. В. Кашталап // Российский кардиологический журнал. — 2016. — Т. 21, № 2. — С. 75–83.
8. Биткова, Е. Е. Влияние отечественных препаратов — ингибиторов фибринолиза на агрегантное состояние крови и объем операционной кровопотери у кардиохирургических больных / Е. Е. Биткова, В. Х. Тимербаев, В. Б. Хватов и др. // Анестезиология и реаниматология. — 2014. — Т. 2. — С. 59–64.
9. Буланов, А. Ю. Роль тромбоэластографии в трансфузионной терапии посттравматической коагулопатии / А. Ю. Буланов // Трансфузиология. — 2011. — Т. 12, № 4. — С. 47–55.

10. Буланов, А. Ю. Тромбоэластография: клиническая значимость теста на функциональный фибриноген / А. Ю. Буланов, К. В. Яцков, Е. Л. Буланова, Н. В. Доброва // Вестник интенсивной терапии. — 2017. — № 1. — С. 5–11.
11. Буланов, А. Ю. Концентраты протромбинового комплекса как инструмент стратегии менеджмента крови пациента / А. Ю. Буланов // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2017. — Т. 72, № 4. — С. 20–24.
12. Буланов, А. Ю. Средства фармацевтического гемостаза в современной клинической практике / А. Ю. Буланов, Н. В. Прасолов // Тольяттинский медицинский консилиум. — 2013. — № 3–4. — С. 25–29.
13. Вдовин, В. В. Тест генерации тромбина в лабораторном контроле эффективности терапии тромбастении Гланцманна препаратом Коагил-VII / В. В. Вдовин, Ю. А. Наместников, П. В. Свирин и др. // Вопросы гематологии / онкологии и иммунопатологии в педиатрии. — 2011. — Т. 10, № 3. — С. 41–44.
14. Галстян, Г. М. Нужны ли в России препараты фибриногена? / Г. М. Галстян, А. Л. Берковский, В. В. Журавлев и др. // Анестезиология и реаниматология. — 2014. — Т. 3. — С. 49–59.
15. Гелис, Л. Г. Распространенность и клиническое значение высокой остаточной реактивности тромбоцитов у пациентов с нестабильной стенокардией / Л. Г. Гелис, Е. А. Медведева, И. И. Русских // Неотложная кардиология и кардиоваскулярные риски. — 2017. — Т. 1, № 1. — С. 57–64.
16. Глазанова, Т. В. Выработка аллогенных антител к антигенам лейкоцитов и тромбоцитов (анти-HLA и анти-НРА) у больных с заболеваниями системы крови на фоне трансфузий компонентов крови / Т. В. Глазанова, С. В. Грицаев, Е. Р. Шилова и др. // Гематология и трансфузиология. — 2015. — Т. 60, № 4. — С. 26–29.
17. Грачева, М. А. Сравнение ответов интегральных и скрининговых тестов оценки системы гемостаза на различные коагуляционные состояния в моделях *in vitro* / М. А. Грачева, А. Н. Баландина, Ф. И. Атауллаханов, Е. В. Ройтман // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2016. — Т. 68, № 4. — С. 64–71.
18. Гуськова, Е. В. Остаточная реактивность тромбоцитов к АДФ и риск кровотечений у больных стабильной ИБС, получающих двойную антитромбоцитар-

- ную терапию в связи с плановым чрескожным коронарным вмешательством / Е. В. Гуськова, Е. П. Панченко, А. Л. Комаров и др. // Российский кардиологический журнал. — 2015. — Т. 20, № 3. — С. 35–42.
19. Дёмина, И. А. Тромбоцитопатии / И. А. Дёмина, М. А. Кумскова, М. А. Пантелеев // Российский журнал детской гематологии и онкологии. — 2015. — Т. 2, № 1. — С. 54–60.
 20. Жибурт, Е. Трансфузионные реакции: как предотвратить, определить, лечить / Е. Жибурт, Д. Камельских, И. Чемоданов // Заместитель главного врача. — 2018. — № 5. — С. 94–105.
 21. Жибурт, Е. Б. Менеджмент крови пациента при критическом кровотечении / Е. Б. Жибурт // Эффективная фармакотерапия. — 2014. — № 6. — С. 20–27.
 22. Заболотских, И. Б. Периоперационное ведение пациентов с нарушениями системы гемостаза / И. Б. Заболотских, С. В. Синьков, К. М. Лебединский // Анестезиология и реаниматология. — 2018. — № 1–2. — С. 58–81.
 23. Заболотских, И. Б. Периоперационное ведение пациентов, получающих длительную анти тромботическую терапию. Клинические рекомендации Федерации анестезиологов и реаниматологов / И. Б. Заболотских, М. Ю. Киров, В. С. Афончиков и др. // Вестник интенсивной терапии имени А. И. Салтанова. — 2019. — № 1. — С. 7–19.
 24. Илюкевич, Г. В. Оценка состояния свертывающей системы крови у пациентов с тяжелой травмой / Г. В. Илюкевич, В. Э. Олецкий, В. В. Гончаров // Экстренная медицина. — 2016. — Т. 5, № 1. — С. 94–102.
 25. Йовенко, И. А. Качественная клиническая практика стартовой интенсивной терапии при боевой и гражданской политравме (обзор литературы) / И. А. Йовенко, Ю. Ю. Кобеляцкий, А. В. Царев // Медицина неотложных состояний. — 2017. — Т. 81, № 2. — С. 39–50.
 26. Канева, В. Н. Тромбоцитарные интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ / В. Н. Канева, А. А. Мартыанов, Д. С. Морозова и др. // Биологические мембраны. — 2019. — Т. 36, № 1. — С. 15–31.

27. Коваль, Е. А. Двойная антитромбоцитарная терапия больных с острым инфарктом миокарда: вопросы, новые рекомендации и практика / Е. А. Коваль // Артериальная гипертензия. — 2011. — Т.25, № 5. — С. 41–45.
28. Кубышкин, А. В. Травма, гемостаз и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания: патогенетические механизмы нарушений гемокоагуляции / А. В. Кубышкин, Н. Ю. Пылаева, И. И. Фомочкина, А. А. Писарев // Клиническая патофизиология. — 2016. — Т. 22, № 4. — С. 104–117.
29. Кумскова, М. А. Диагностика тромбастении Гланцмана с помощью исследования показателей плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза / М. А. Кумскова, И. А. Дёмина, Н. А. Подоплелова и др. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. — 2015. — Т. 14, № 4.— С. 17–24.
30. Левченко, О. К. Интенсивная терапия желудочно-кишечных кровотечений у больных тромбастенией Гланцмана / О. К. Левченко, Е. М. Шулутко, В. М. Городецкий // Гематология и трансфузиология. — 2014. — Т. 59, № 1. — С. 47–50.
31. Лисуков, И. А. Иммунная тромбоцитопения: клинические проявления и ответ на терапию. Промежуточный анализ данных российского регистра пациентов с первичной иммунной тромбоцитопенией и обзор литературы / И. А. Лисуков, А. А. Масчан, А. В. Шамардина и др. // Онкогематология. — 2013. — Т. 8, № 2. — С. 61–69.
32. Литвинов, Р. И. Молекулярные механизмы и клиническое значение фибринолиза / Р. И. Литвинов // Казанский медицинский журнал. — 2013. — Т. 94, № 5. — С. 711–718.
33. Мазуров, А. В. Диагностика тромбоцитопений / А. В. Мазуров, С. Г. Хаспекова, С. А. Васильев // Терапевтический архив. — 2018. — Т. 90, № 7. — С. 4–13.
34. Меликян, А. Л. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению первичной иммунной тромбоцитопении (идиопатической тромбоцитопенической пурпуры) у взрослых / А. Л. Меликян, Е. И. Пустовал, Н. В. Цветаева и др. // Гематология и трансфузиология. — 2015. — Т. 60, № 1. — С. 44–56.
35. Меликян, А. Л. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (первичной иммун-

- ной тромбоцитопении) у взрослых (редакция 2016 г.) / А. Л. Меликян, Е. И. Пустовал, Н. В. Цветаева и др. // Гематология и трансфузиология. — 2016. — Т. 62, № 1–S1. — С. 1–24.
36. Меликян, А. Л. Эпидемиологические характеристики первичной иммунной тромбоцитопении у взрослого населения в Российской Федерации / А. Л. Меликян, Е. И. Пустовая, М. В. Калинина и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. — 2017. — Т. 10, № 4. — С. 558–559.
 37. Норина, А. А. Мониторинг коагулопатии при сочетанной травме с использованием метода ротационной тромбоэластометрии / А. А. Норина, С. Ю. Мухачева, Н. П. Шень // Университетская медицина Урала. — 2016. — Т. 2, № 2 (5). — С. 38–40.
 38. Пантелеев, М. А. Внеклеточные везикулы плазмы крови: состав, происхождение, свойства / М. А. Пантелеев, А. А. Абаева, А. Н. Баландина и др. // Биологические мембраны. — 2017. — Т. 34, № 3. — С. 155–161.
 39. Платонова, О. А. Иммунно-опосредованная тромбоцитопения в раннем неонатальном периоде / О. А. Платонова, Е. Н. Альферович, Е. А. Саржевская, Т. Г. Абражевич // Медицинский журнал. — 2017. — № 2 (60). — С. 156–158.
 40. Плохов, Д. М. Современные подходы в лабораторной диагностике тромбоцитарного гемостаза / Д. М. Плохов, М. А. Пантелеев // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. — 2016. — Т. 2, № 2. — С. 270–290.
 41. Пономаренко, Е. А. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики / Е. А. Пономаренко, А. А. Игнатова, Д. В. Федорова и др. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. — 2019. — Т. 18, № 3. — С. 112–119.
 42. Прасолов, Н. В. Концентрат протромбинового комплекса: опыт использования в условиях выездной специализированной консультативной бригады / Н. В. Прасолов, А. Ю. Буланов, Е. М. Шулутко и др. // Вестник интенсивной терапии. — 2013. — № 4. — С. 3–14.
 43. Прасолов, Н. В. Комплексная терапия тяжелого послеродового кровотечения с использованием концентрата протромбинового комплекса / Н. В. Прасолов,

- А. Ю. Буланов, Е. М. Шулутко и др. // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2018. — № 4 (76). — С. 36–43.
44. Рабочая группа по двойной антитромбоцитарной терапии при ишемической болезни сердца Европейского общества кардиологов (ЕОК, ESC) и Европейской ассоциации кардио-торакальной хирургии (EACTS). Двойная антитромбоцитарная терапия при ишемической болезни сердца: обновленная версия 2017 года // Российский кардиологический журнал. — 2018. — Т. 23, № 8. — С. 113–163.
 45. Родионов, А. В. Двойная антитромбоцитарная терапия у больных с острым коронарным синдромом / А. В. Родионов, Д. Х. Айнетдинова, В. А. Сулимов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2011. — Т. 10, № 5. — С. 87–91.
 46. Свешникова, А. Н. Роль трансмембранных гликопротеинов, интегринов и серпентинов в адгезии и активации тромбоцита / А. Н. Свешникова, А. В. Беляев, М. А. Пантелеев, Д. Ю. Нечипуренко // Биологические мембраны. — 2018. — Т. 35, № 5. — С. 351–363.
 47. Свешникова, А. Н. Современные представления о регуляции тромбоцитарного гемостаза / А. Н. Свешникова, А. А. Якушева, А. А. Рябых и др. // Креативная кардиология. — 2018. — Т. 12, № 3. — С. 260–274.
 48. Синауридзе, Е. И. Усиление коагуляции, вызываемое переливанием искусственных плазмозамещающих растворов / Е. И. Синауридзе, А. Ю. Буланов, О. В. Щербакова и др. // Терапевтический архив. — 2009. — Т. 81, № 1. — С. 52–55.
 49. Федорова, Д. В. Диагностика тромбоцитопатий у детей: корреляции исследования функциональной активности тромбоцитов с клинической картиной и результатами агрегометрии / Д. В. Федорова, П. А. Жарков, А. А. Игнатова и др. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. — 2018. — Т. 17, № 1. — С. 16–22.
 50. Хаспекова, С. Г. Патогенез и факторы риска неонатальной иммунной тромбоцитопении / С. Г. Хаспекова, Л. Л. Головкина, Н. В. Голубева и др. // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2016. — № S3 (67). — С. 436–438.

51. Чарная, М. А. Аминокапроновая или транексамовая кислоты в кардиохирургии: Что? Где? Когда? Обзор литературы. Часть 1 / М. А. Чарная, И. И. Дементьева // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. — 2016. — Т. 9, № 3. — С. 72–77.
52. Чемоданов, И. Г. Инструмент профилактики трансфузионной циркуляторной перегрузки. / И. Г. Чемоданов, Л. Г. Гореликова, А. И. Лямовский и др. // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. — 2018. — № 4. — С. 93–95.
53. Шабалина, А. А. Сравнение двух методов лабораторной оценки агрегации тромбоцитов и резистентности к антиагрегантной терапии / А. А. Шабалина, Е. В. Ройтман, М. М. Танашян // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2019. — № 3 (79). — С. 64–71.
54. Шихмирзаев, Т. А. Фармакопрофилактика трансфузионных реакций / Т. А. Шихмирзаев, И. Г. Чемоданов, Е. А. Шестаков и др. // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. — 2018. — Т. 13, № 2. — С. 95–99.
55. Abraham, A. S. Antibodies to human platelet antigens form a significant proportion of platelet antibodies detected in Indian patients with refractoriness to platelet transfusions / A. S. Abraham, M. P. Chacko, N. A. Fouzia et al. // Transfusion Medicine. — 2018. — Vol. 28, № 5. — P. 392–339.
56. Agewall, S. Expert position paper on the use of proton pump inhibitors in patients with cardiovascular disease and antithrombotic therapy / S. Agewall // European Heart Journal. — 2013. — Vol. 34, № 23. — P. 1708–1713.
57. Aisina, R. B. Structure and function of plasminogen/plasmin system / R. B. Aisina, L. I. Mukhametova // Russian Journal of Bioorganic Chemistry — 2014. — Vol. 40, № 6. — P. 590–605.
58. Akuta, K. A unique phenotype of acquired Glanzmann thrombasthenia due to non-function-blocking anti- α IIb β 3 autoantibodies / K. Akuta, H. Kashiwagi, T. Yujiri et al. // Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2019. — Vol. 17, № 1. — P. 206–219.
59. Al-Attar, N. Impact of bleeding complications on length of stay and critical care utilization in cardiac surgery patients in England / N. Al-Attar, S. Johnston, N. Jamous et al. // Journal of Cardiothoracic Surgery. — 2019. — Vol. 14, № 1. — P. 64.

60. Alberts M. J. Antiplatelet effect of aspirin in patients with cerebrovascular disease / M. J. Alberts, D. Bergman, E. Molner et al. // *Stroke*. — 2004.— Vol. 35, № 1. — P. 175–178.
61. Anglin, C.O. Effects of platelet and plasma transfusion on outcome in traumatic brain injury patients with moderate bleeding diatheses / C. O. Anglin, J. S. Spence, M. A. Warner et al. // *Journal of Neurosurgery*. — 2013. — Vol. 118, № 3. — P. 676.
62. Ariëns R. A. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms / R. A. Ariëns, T. S. Lai, J. W. Weisel et al. // *Blood*. — 2002. — Vol. 100, № 3. — P. 743–754.
63. Bajzar, L. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor / L. Bajzar, R. Manuel, M. E. Nesheim // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1995. — Vol. 270, № 24. — P. 14477–14484.
64. Bajzar, L. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex / L. Bajzar, J. Morser, M. Nesheim // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1996. — Vol. 271, № 28. — P. 16603–16608.
65. Bakchoul, T. Platelet destruction in immune thrombocytopenia. Understanding the mechanisms / T. Bakchoul, U. J. Sachs // *Hamostaseologie*. — 2016. — Vol. 36, № 3. — P. 187–194.
66. Bhavaraju, K. G(12/13) signaling pathways substitute for integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -signaling for thromboxane generation in platelets / K. Bhavaraju, P. R. Lakhani, R. T. Dorsam et al. // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6, № 2. — P. e16586.
67. Bilecen, S. Fibrinogen concentrate therapy in complex cardiac surgery / S. Bilecen, L. M. Peelen, C. J. Kalkman et al. // *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. — 2013. — Vol. 27, № 1. — P. 12–17.
68. Bilecen S. Effect of fibrinogen concentrate on intraoperative blood loss among patients with intraoperative bleeding during high-risk cardiac surgery: A randomized clinical trial / S. Bilecen, A. H. de Groot, C. J. Kalkman et al. // *JAMA*. — 2017. — Vol. 317, № 7. — P. 738–747.

69. Bokesch, P. M. A phase 2 prospective, randomized, double-blind trial comparing the effects of tranexamic acid with ecallantide on blood loss from high-risk cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CONSERV-2 Trial) / P. M. Bokesch, G. Szabo, R. Wojdyga et al. // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. — 2012. — Vol. 143, № 5. — P. 1022–1029.
70. Bolliger, D. Haemodilution-induced profibrinolytic state is mitigated by fresh-frozen plasma: Implications for early haemostatic intervention in massive haemorrhage / D. Bolliger, F. Szlam, J. H. Levy et al. // *British Journal of Anaesthesia*. — 2010. — Vol. 104, № 3. — P. 318–325.
71. Bolliger, D. Pathophysiology and treatment of coagulopathy in massive hemorrhage and hemodilution / D. Bolliger, K. Görlinger, K. A. Tanaka // *Anesthesiology*. — 2010. — Vol. 113, № 5. — P. 1205–1219.
72. Borhany, M. Pattern of bleeding and response to therapy in Glanzmann thrombasthenia / M. Borhany, H. Fatima, A. Naz et al. // *Haemophilia*. — 2012. — Vol. 18, № 6. — P. e423–e425.
73. Brambilla, M. Do methodological differences account for the current controversy on tissue factor expression in platelets? / M. Brambilla, L. Rossetti, C. Zara et al. // *Platelets*. — 2018. — Vol. 29, № 4. — P. 406–414.
74. Brohi K. Acute traumatic coagulopathy / K. Brohi, J. Singh, M. Heron, T. Coats // *The Journal of Trauma*. — 2003. — Vol. 54, № 6. — P. 1127–1130.
75. Brohi, K. Acute traumatic coagulopathy initiated by hypoperfusion: modulated through the protein C pathway? / K. Brohi, M. J. Cohen, M. A. Matthay et al. // *Annals of Surgery*. — 2007. — Vol. 245, № 5. — P. 812–818.
76. Buchanan, G. R. Grading of hemorrhage in children with idiopathic thrombo-cytopenic purpura / G. R. Buchanan, L. Adix // *The Journal of Pediatrics*. — 2002. — Vol. 141, № 5. — P. 683–688.
77. Butenas, S. Antiplatelet agents in tissue factor-induced blood coagulation / S. Butenas, K. M. Cawthern, C. van't Veer et al. // *Blood*. — 2001. — Vol. 97, № 8. — P. 2314–2322.

78. Byrnes, J. R., Newly-recognized roles of factor XIII in thrombosis / J. R. Byrnes, A. S. Wolberg // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. — 2016. — Vol. 42, № 4 — P. 445–454.
79. Byzova, T. V, Networking in the hemostatic system. Integrin α IIb β 3 binds prothrombin and influences its activation / T. V. Byzova, E. F. Plow // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1997. — Vol. 272, № 43. — P. 27183–27188.
80. Caballo C. Impact of experimental haemodilution on platelet function, thrombin generation and clot firmness: effects of different coagulation factor concentrates / C. Caballo, G. Escolar, M. Diaz-Ricart et al. // *Blood Transfusion*. — 2013. — Vol. 11, № 3. — P. 391–399.
81. Cannon, J. W. Hemorrhagic Shock / J. W. Cannon // *The New England Journal of Medicine*. — 2018. — Vol. 378, № 4. — P. 370–379.
82. Cap, A. P. Damage control resuscitation / A. P. Cap, H. F. Pidcoke, P. Spinella et al. // *Military Medicine*. — 2018. — Vol. 183 № suppl. 2. — P. 36–43.
83. Cardenas, J. C. Elevated tissue plasminogen activator and reduced plasminogen activator inhibitor promote hyperfibrinolysis in trauma patients / J. C. Cardenas, N. Matijevic, L. A. Baer et al. // *Shock*. — 2014. — Vol. 41, № 6. — P. 514–521.
84. Carrieri, C. The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and factor XI in platelet-mediated fibrinolysis resistance: a thromboelastographic study in whole blood / C. Carrieri, R. Galasso, F. Semeraro et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2011. — Vol. 9, № 1. — P. 154–162.
85. Carroll, R. C. Separable assembly of platelet pseudopodal and contractile cytoskeletons / R. C. Carroll, R. G. Butler, P. A. Morris, J. M. Gerrard // *Cell*. — 1982. — Vol. 30, № 2. — P. 385–393.
86. Casari, C. Acquired platelet disorders / C. Casari, W. Bergmeier // *Thrombosis Research*. — 2016. — Vol. 141, Suppl 2: S73–S75.
87. Castaman, G. Pilot study on the safety and efficacy of desmopressin for the treatment or prevention of bleeding in patients with hematologic malignancies / G. Castaman, E. D. Bona, C. Schiavotto et al. // *Haematologica*. — Vol. 82, № 5. — P. 584–587.

88. Castro, V. Human platelet antigens and primary immune thrombocytopenia / V. Castro // *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. — 2017. — Vol. 39, № 2. — P. 95–97.
89. Cayla, G. Platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy in elderly patients stented for an acute coronary syndrome (ANTARCTIC): an open-label, blinded-endpoint, randomised controlled superiority trial / G. Cayla, T. Cuisset, J. Silvain et al. // *Lancet*. — 2016. — Vol. 388, № 10055. — P. 2015–2022.
90. Chapin, J. C., Fibrinolysis and the control of blood coagulation / J. C. Chapin, K. A. Hajjar // *Blood Reviews*. — 2015. — Vol. 29, № 1. — P. 17–24.
91. Chapman, M. P. Overwhelming tPA release, not PAI-1 degradation, is responsible for hyperfibrinolysis in severely injured trauma patients / M. P. Chapman, E. E. Moore, H. B. Moore et al. // *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. — 2016. — Vol. 80, № 1. — P. 16–25.
92. Chen, L. The myth of 0.9% saline: neither normal nor physiological / L. Chen // *Critical Care Nursing Quarterly*. — 2015. — Vol. 38, № 4. — P. 385–389.
93. Childs, B. R. Presentation coagulopathy and persistent acidosis predict complications in orthopaedic trauma patients / B. R. Childs, D. R. Verhotz, T. A. Moore, H. A. Vallier // *Journal of Orthopaedic Trauma*. — 2017. — Vol. 31, № 12. — P. 617–623.
94. Chowdhury, A. H. A randomized, controlled, double-blind crossover study on the effects of 2-L infusions of 0.9% saline and plasma-lyte® 148 on renal blood flow velocity and renal cortical tissue perfusion in healthy volunteers / A. H. Chowdhury, E. F. Cox, S. T. Francis, D. N. Lobo // *Annals of Surgery*. — 2012. — Vol. 256, № 1. — P. 18–24.
95. Cines, D. B. Immune thrombocytopenic purpura / D. B. Cines, V. S. Blanchette // *The New England Journal of Medicine*. — 2002. — Vol. 346, № 13. — P. 995–1008.
96. Cohen, I. Effects of ADP and ATP on bovine fibrinogen- and ristocetin-induced platelet aggregation in Glanzmann's thrombasthenia / I. Cohen, T. Glaser, U. Seligsohn // *British Journal of Haematology*. — 1975. — Vol. 31, № 3. — P. 343–347.
97. Cole, E. Tranexamic acid use in severely injured civilian patients and the effects on outcomes: a prospective cohort study / E. Cole, R. Davenport, K. Willett, K. Brohi // *Annals of Surgery*. — 2015. — Vol. 261, № 2. — P. 390–394.

98. Collier, B. S. A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa / B. S. Collier, E. I. Peerschke, L. E. Scudder, C. A. Sullivan // *Journal of Clinical Investigation*. — 1983. — Vol. 72, № 1. — P. 325.
99. Collet, J. P. Disaggregation of *in vitro* preformed platelet-rich clots by abciximab increases fibrin exposure and promotes fibrinolysis / J. P. Collet, G. Montalescot, C. Lesty et al. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2001. — Vol. 21, № 1. — P. 142–148.
100. Colucci, M. Deficiency of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in cirrhosis is associated with increased plasma fibrinolysis / M. Colucci, B. M. Binetti, M. G. Branca et al. // *Hepatology*. — 2003. — Vol. 38, № 1. — P. 230–237.
101. Consolini, R. The Centenary of immune thrombocytopenia — Part 2: Revising diagnostic and therapeutic approach / R. Consolini, G. Costagliola, D. Spatafora // *Frontiers in Pediatrics*. — 2017. — № 5. — P. 179.
102. Cordell, P. A. Association of coagulation factor XIII-A with Golgi proteins within monocyte-macrophages: implications for subcellular trafficking and secretion / P. A. Cordell, B. T. Kile, K. F. Standeven et al. // *Blood*. — 2010. — Vol. 115, № 13. — P. 2674–2681.
103. CRASH-2 collaborators. The importance of early treatment with tranexamic acid in bleeding trauma patients: an exploratory analysis of the CRASH-2 randomised controlled trial / CRASH-2 collaborators, I. Roberts, H. Shakur et al. // *Lancet*. — 2011. — Vol. 377, № 9771. — P. 1096–1101, 1101.e1–1101.e2.
104. CRASH-2 trial collaborators. Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial / CRASH-2 trial collaborators, H. Shakur, I. Roberts et al. // *Lancet*. — 2010. — Vol. 376, № 9734. — P. 23–32.
105. Cushing, M. M. Influence of cryoprecipitate, Factor XIII, and fibrinogen concentrate on hyperfibrinolysis / M. M. Cushing, M. M. Fitzgerald, R. M. Harris et al. // *Transfusion*. — 2017. — Vol. 57, № 10. — P. 2502–2510.

106. D'Andrea, G. Glanzmann's thrombasthenia: modulation of clinical phenotype by alpha2C807T gene polymorphism / G. D'Andrea, M. Margaglione; Glanzmann's Thrombasthenia Italian Team (GLATIT) // *Haematologica*. — 2003. — Vol. 88, № 12. — P. 1378–1382.
107. Dailey, S. E. An *in vitro* study comparing the effects of Hextend, Hespan, normal saline, and lactated ringer's solution on thrombelastography and the activated partial thromboplastin time / S. E. Dailey, C. B. Dysart, D. R. Langan et al. // *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. — 2005. — Vol. 19, № 3. — P. 358–361.
108. Darlington, D. N. Effect of hemodilution on coagulation and recombinant factor VIIa efficacy in human blood *in vitro* / D. N. Darlington, A. V. Delgado, B. S. Kheirabadi et al. // *The Journal of trauma*. — 2011. — Vol. 71, № 5. — P. 1152–1163.
109. Davenport, R. A. Activated protein C drives the hyperfibrinolysis of acute traumatic coagulopathy / R. A. Davenport, M. Guerreiro, D. Frith et al. // *Anesthesiology*. — 2017. — Vol. 126, № 1. — P. 115–127.
110. Deka, L. Morphometric evaluation of megakaryocytes in bone marrow aspirates of immune-mediated thrombocytopenic purpura / L. Deka, S. Gupta, R. Gupta et al. // *Platelets*. — 2013. — Vol. 24, № 2. — P. 113–117.
111. DeLoughery, T. G. Coagulation defects in trauma patients: etiology, recognition, and therapy / T. G. DeLoughery // *Critical Care Clinics*. — 2004. — Vol. 20, № 1. — P. 13.
112. Desborough, M. J. Alternatives to allogeneic platelet transfusion / M. J. Desborough, P. A. Smethurst, L. J. Estcourt et al. // *British Journal of Haematology*. — 2016. — Vol. 175, № 3. — P. 381–392.
113. Dirkmann, D. Hypothermia and acidosis synergistically impair coagulation in human whole blood / D. Dirkmann, A. A. Hanke, K. Görlinger, J. Peters // *Anesthesia and Analgesia*. — 2008. — Vol. 106, № 6. — P. 1627–1632.
114. Djaldetti, M. pH-induced platelet ultrastructural alterations. A possible mechanism for impaired platelet aggregation / M. Djaldetti, P. Fishman, H. Bessler, C. Chaimoff // *Archives of Surgery*. — 1979. — Vol. 114, № 6. — P. 707–710.

115. Drabik, L. Fibrin clot permeability as a predictor of stroke and bleeding in anti-coagulated patients with atrial fibrillation / L. Drabik, P. Wołkow, A. Undas // *Stroke*. — 2017. — Vol. 48, № 10. — P. 2716–2722.
116. Driessen, A. Prehospital volume resuscitation--Did evidence defeat the crystalloid dogma? An analysis of the Trauma Register DGU® 2002-2012 / A. Driessen, M. Fröhlich, N. Schäfer et al. // *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. — 2016. — Vol. 24. — P. 42.
117. Dunbar, N. M. Thrombin generation in trauma patients / N. M. Dunbar, W. L. Chandler // *Transfusion*. — 2009. — Vol. 49, № 12. — P. 2652–2660.
118. Elgue, G. The effect of plasma antithrombin concentration on thrombin generation and fibrin gel structure / G. Elgue, J. Sanchez, K. Fatah et al. // *Thrombosis Research*. — 1994. — Vol. 75, № 2. — P. 203–212.
119. Engstrom, M. Acidosis impairs the coagulation: A thromboelastographic study / M. Engstrom, U. Schott, B. Romner, P. Reinstrup // *The Journal of Trauma*. — 2006. — Vol. 61, № 3. — P. 624–628.
120. Estcourt, L. J. Antifibrinolytics (lysine analogues) for the prevention of bleeding in people with haematological disorders / L. J. Estcourt, M. Desborough, S. J. Brunskill et al. // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. — 2016. — Vol. 3. — P. CD009733.
121. Estevez, B. Targeting integrin and integrin signaling in treating thrombosis / B. Estevez, B. Shen, X. Du // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2015. — Vol. 35, № 1. — P. 24–29.
122. Femia, E. A. Effect of platelet count on platelet aggregation measured with impedance aggregometry (Multiplate™ analyzer) and with light transmission aggregometry / E. A. Femia, M. Scavone, A. Lecchi, M. Cattaneo // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2013. — Vol. 11, № 12. — P. 2193–2196.
123. Fiore, M. Anti- α IIb β 3 immunization in Glanzmann thrombasthenia: review of literature and treatment recommendations / M. Fiore, R. d'Oiron, X. Pillois, M. C. Alessi // *British Journal of Haematology*. — 2018. — Vol. 181, № 2. — P. 173–182.

124. Foley, J. H. Kinetics of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa)-catalyzed cleavage of C-terminal lysine residues of fibrin degradation products and removal of plasminogen-binding sites / J. H. Foley, P. F. Cook, M. E. Nesheim // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2011. — Vol. 286, № 22. — P. 19280–19286.
125. Fox, J. E. Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib / J. E. Fox // *The Journal of Clinical Investigation*. — 1985. — Vol. 76, № 4. — P. 1673–1683.
126. Fox, J. E. On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GP IIb-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton / J. E. Fox, L. Lipfert, E. A. Clark et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1993. — Vol. 268, № 34. — P. 25973.
127. Fox, J. E. The platelet cytoskeleton stabilizes the interaction between α IIb β 3 and its ligand and induces selective movements of ligand-occupied integrin / J. E. Fox, S. J. Shattil, R. L. Kinlough-Rathbone et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1996. — Vol. 271, № 12. — P. 7004–7011.
128. Fox, S. C. How does measurement of platelet P-selectin compare with other methods of measuring platelet function as a means of determining the effectiveness of anti-platelet therapy? / S. C. Fox, J. A. May, N. Dovlatova et al. // *Platelets*. — 2019. — Vol. 30, № 3. — P. 290–295.
129. Francis, C. W. Increased resistance to plasminic degradation of fibrin with highly crosslinked α -polymer chains formed at high factor XIII concentrations / C. W. Francis, V. J. Marder // *Blood*. — 1988. — Vol. 71, № 5. — P. 1361–1365.
130. Fraser, S. R. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through α_2 -antiplasmin cross-linking / S. R. Fraser, N. A. Booth, N. J. Mutch // *Blood*. — 2011. — Vol. 117, № 23. — P. 6371–6374.
131. Frith, D. Definition and drivers of acute traumatic coagulopathy: clinical and experimental investigations / D. Frith, C. Goslings, C. Gaarder et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2010. — Vol. 8, № 9. — P. 1919–1925.
132. Galas, F. R. Hemostatic effects of fibrinogen concentrate compared with cryoprecipitate in children after cardiac surgery: a randomized pilot trial / F. R. Galas, J. P. de

- Almeida, J. T. Fukushima et al. // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. — 2014. — Vol. 148, № 4. — P. 1647–1655.
133. Gando, S. Local hemostasis, immunothrombosis, and systemic disseminated intravascular coagulation in trauma and traumatic shock / S. Gando, Y. Otomo // Critical Care. — 2015. — Vol. 19. — P. 72.
 134. Garrigue, D. French lyophilized plasma versus fresh frozen plasma for the initial management of trauma-induced coagulopathy: a randomized open-label trial / D. Garrigue, A. Godier, A. Glacet et al. // Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2018. — Vol. 16, № 3. — P. 481–489.
 135. Gayet-Ageron, A. Effect of treatment delay on the effectiveness and safety of antifibrinolytics in acute severe haemorrhage: a meta-analysis of individual patient-level data from 40 138 bleeding patients / A. Gayet-Ageron, D. Prieto-Merino, K. Ker et al. // Lancet. — 2018. — Vol. 391, № 10116. — P. 125–132.
 136. George, J. N. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease / J. N. George, J. P. Caen, A. T. Nurden // Blood. — 1990. — Vol. 75, № 7. — P. 1383.
 137. Gerrits, A. J. Platelet tissue factor synthesis in type 2 diabetic patients is resistant to inhibition by insulin / A. J. Gerrits, C. A. Koekman, T. W. van Haeften, J. W. Akkerman // Diabetes. — 2010. — Vol. 59, № 6. — P. 1487–1495.
 138. Ghosh, K. Antiplatelet antibodies in cases of Glanzmann's thrombasthenia with and without a history of multiple platelet transfusion / K. Ghosh, B. Kulkarni, S. Shetty, S. Nair // Indian Journal of Human Genetics. — 2009. — Vol. 15, № 1. — P. 23–27.
 139. Giansily-Blaizot, M. Recombinant human factor VIIa (rFVIIa) in hemophilia: mode of action and evidence to date / M. Giansily-Blaizot, J. F. Schved // Therapeutic Advances in Hematology. — 2017. — Vol. 8, № 12. — P. 345–352.
 140. Gimbel, M. E. A practical guide on how to handle patients with bleeding events while on oral antithrombotic treatment / M. E. Gimbel, S. C. S. Minderhoud, J. M. Ten Berg // Netherlands Heart Journal. — 2018. — Vol. 26, № 6. — P. 341–351.
 141. Gladner, J. A. Effects of crosslinking on the rigidity and proteolytic susceptibility of human fibrin clots / J. A. Gladner, R. Nossal // Thrombosis Research. — 1983. — Vol. 30, № 3. — P. 273–288.

142. Godier, A. Use of factor concentrates for the management of perioperative bleeding: guidance from the SSC of the ISTH / A. Godier, A. Greinacher, D. Faraoni et al. // Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2018. — Vol. 16, № 1. — P. 170–174.
143. Gödje, O. Coagulation factor XIII reduces postoperative bleeding after coronary surgery with extracorporeal circulation / O. Gödje, U. Gallmeier, M. Schelian et al. // The Thoracic and cardiovascular surgeon. — 2006. — Vol. 54, № 1. — P. 26–33.
144. Görlinger, K. The role of evidence-based algorithms for rotational thromboelastometry-guided bleeding management / K. Görlinger, A. Pérez-Ferrer, D. Dirkmann et al. // Korean journal of anesthesiology. — 2019. — Vol. 72, № 4. — P. 297–322.
145. Grassin-Delyle, S. Optimisation of the dosage of tranexamic acid in trauma patients with population pharmacokinetic analysis / S. Grassin-Delyle, O. M. Theusinger, R. Albrecht et al. // Anaesthesia. — 2018. — Vol. 73, № 6. — P. 719–729.
146. Gresele, P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH / P. Gresele // Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2015. — Vol. 13, № 2. — P. 314–322.
147. Grottke, O. Thrombin generation capacity of prothrombin complex concentrate in an *in vitro* dilutional model / O. Grottke, R. Rossaint, Y. Henskens et al. // PloS One. — 2013. — Vol. 8, № 5. — P. e64100.
148. Grottke, O. Prothrombin complex concentrates in trauma and perioperative bleeding / O. Grottke, J. H. Levy // Anesthesiology. — 2015. — Vol. 122, № 4. — P. 923–931.
149. Guimarães, A. H. A new functional assay of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor / A. H. Guimarães, R. M. Bertina, D. C. Rijken // Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2005. — Vol. 3, № 6. — P. 1284–1292.
150. Gurewich, V. Spontaneous clot lysis in whole human plasma by endogenous tissue type and urokinase type plasminogen activators: Demonstration of a promoting effect by t-PA and by platelets on urokinase / V. Gurewich, F. Emmons, R. Pannell // Fibrinolysis. — 1988. — Vol. 2, № 3. — P. 143–149.
151. Gurion, R. Use of recombinant factor VIIa in a pediatric patient with initial presentation of refractory acute immune thrombocytopenic purpura and severe bleeding / R. Gurion,

- A. Siu, A. R. Weiss, M. Masterson // The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics. — 2012. — Vol. 17, № 3. — P. 274–280.
152. Haas, T. The in vitro effects of fibrinogen concentrate, factor XIII and fresh frozen plasma on impaired clot formation after 60% dilution / T. Haas, D. Fries, C. Velik-Salchner et al. // Anesthesia and Analgesia. — 2008. — Vol. 106, № 5. — P. 1360.
 153. Hainaud, P. Dissociation between fibrinogen and fibrin interaction with platelets in patients with different subtypes of Glanzmann's thrombasthenia: studies in an *ex vivo* perfusion chamber model / P. Hainaud, J. P. Brouland, P. Andre et al. // British Journal of Haematology. — 2002. — Vol. 119, № 4. — P. 998–1004.
 154. Halmin, M. Effect of plasma-to-RBC ratios in trauma patients: a cohort study with time-dependent data / M. Halmin, F. Boström, O. Brattström et al. // Critical Care Medicine. — 2013. — Vol. 41, № 8. — P. 1905–1914.
 155. Halmin, M. Epidemiology of Massive Transfusion: A Binational Study from Sweden and Denmark / M. Halmin, F. Chiesa, S. K. Vasan et al. // Critical Care Medicine. — 2016. — Vol. 44, № 3. — P. 468–477.
 156. Harr, J. N. The acute coagulopathy of trauma is due to impaired initial thrombin generation but not clot formation or clot strength / J. N. Harr, E. T. Moore, M. V. Wohlauer et al. // The Journal of Surgical Research. — 2011. — Vol. 170, № 2. — P. 319–24.
 157. Harvin, J. A. The impact of tranexamic acid on mortality in injured patients with hyperfibrinolysis / J. A. Harvin, C. A. Peirce, M. M. Mims et al. // The journal of Trauma and Acute Care Surgery. — 2015. — Vol. 78, № 5. — P. 905–911.
 158. Haslam, R. J. Cytochalasin B, the blood platelet release reaction and cyclic GMP / R. J. Haslam, M. M. Davidson, M. D. McClenaghan // Nature. — 1975. — Vol. 253, № 5491. — P. 455–457.
 159. Hauser, C. J. Results of the CONTROL trial: efficacy and safety of recombinant activated Factor VII in the management of refractory traumatic hemorrhage / C. J. Hauser, K. Boffard, R. Dutton et al. // The Journal of Trauma. — 2010. — Vol. 69, № 3. — P. 489–500.

160. Haut, E. R. Prehospital intravenous fluid administration is associated with higher mortality in trauma patients / E. R. Haut, B. T. Kalish, B. A. Cotton et al. // *Annals of Surgery*. — 2011. — Vol. 253, № 2. — P. 371–377.
161. Haverkamp, F. J. C. The prehospital management of hypothermia — An up-to-date overview / F. J. C. Haverkamp, G. G. Giesbrecht, Tan E. C. T. H. // *Injury*. — 2018. — Vol. 49, № 2. — P. 149–164.
162. He, S. The effect of platelets on fibrin gel structure formed in the presence of recombinant factor VIIa in hemophilia plasma and in plasma from a patient with Glanzmann thrombasthenia / S. He, G. J. Ekman, U. Hedner // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2005. — Vol. 3, № 2. — P. 272–279.
163. Hemker, H. C. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma / H. C. Hemker, P. Giesen, R. Al Dieri et al. // *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. — 2003. — Vol. 33, № 1. — P. 4–15.
164. Hess, J. R. Blood and coagulation support in trauma care / J. R. Hess // *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. — 2007. — Vol. 2007, № 1. — P. 187–191.
165. Hiippala, S. T. Hemostatic factors and replacement of major blood loss with plasma-poor red cell concentrates / S. T. Hiippala, G. J. Myllylä, E. M. Vahtera // *Anesthesia and Analgesia*. — 1995. — Vol. 81, № 2. — P. 360–365.
166. Hijazi, N. Endogenous plasminogen activators mediate progressive intracerebral hemorrhage after traumatic brain injury in mice / N. Hijazi, R. Abu Fanne, R. Abramovitch et al. // *Blood*. — 2015. — Vol. 125, № 16. — P. 2558–2567.
167. Hiller, K. N. Clinically relevant exaggerated pharmacodynamic response to dual antiplatelet therapy detected by Thromboelastogram® Platelet Mapping / K. N. Hiller // *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*. — 2016. — Vol. 32, № 1. — P. 112–114.
168. Hoffman, M. Mechanisms and monitoring of bypassing agent therapy / M. Hoffman, Y. Dargaud // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2012. — Vol. 10, № 8. — P. 1478–1485.

169. Holcomb, J. B. Damage control resuscitation: directly addressing the early coagulopathy of trauma / J. B. Holcomb, D. Jenkins, P. Rhee et al. // *The Journal of Trauma*. — 2007. — Vol. 62, № 2. — P. 307–310.
170. Holcomb, J. B. Transfusion of plasma, platelets, and red blood cells in a 1:1:1 vs a 1:1:2 ratio and mortality in patients with severe trauma: the PROPPR randomized clinical trial / J. B. Holcomb, B. C. Tilley, S. Baraniuk et al. // *JAMA*. — 2015. — Vol. 313, № 5. — P. 471–482.
171. Hoylaerts, M. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin / M. Hoylaerts, D. C. Rijken, H. R. Lijnen, D. Collen // *The Journal of biological chemistry*. — 1982. — Vol. 257, № 6. — P. 2912–2919.
172. Hrafnkelsdottir, T. Regulation of local availability of active tissue-type plasminogen activator *in vivo* in man / T. Hrafnkelsdottir, T. Gudnason, U. Wall et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2004. — Vol. 2, № 11. — P. 1960–1968.
173. Inbal, A. Platelets but not monocytes contribute to the plasma levels of factor XIII subunit A in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell trans-plantation / A. Inbal, L. Muszbek, A. Lubetsky et al. // *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. — 2004. — Vol. 15, № 3. — P. 249–253.
174. Innerhofer, P. The exclusive use of coagulation factor concentrates enables reversal of coagulopathy and decreases transfusion rates in patients with major blunt trauma / P. Innerhofer, I. Westermann, H. Tauber et al. // *Injury*. — 2013. — Vol. 44, № 2. — P. 209–216.
175. Innerhofer, P. Reversal of trauma-induced coagulopathy using first-line coagulation factor concentrates or fresh frozen plasma (RETIC): a single-centre, parallel-group, open-label, randomised trial / P. Innerhofer, D. Fries, M. Mittermayr et al. // *The Lancet. Haematology*. — 2017. — Vol. 4, № 6. — P. e258–e271.
176. Iraqi, M. Immune thrombocytopenia: Antiplatelet autoantibodies inhibit proplatelet formation by megakaryocytes and impair platelet production *in vitro* / M. Iraqi, J. Perdomo, F. Yan et al. // *Haematologica*. — 2015. — Vol. 100, № 5. — P. 623–632.

177. Ireland, S. The incidence and significance of accidental hypothermia in major trauma — a prospective observational study / S. Ireland, R. Endacott, P. Cameron et al. // *Resuscitation*. — 2011. — Vol. 82, № 3. — P. 300–306.
178. Jalaer, I. The role of von Willebrand factor in primary haemostasis under conditions of haemodilution / I. Jalaer, D. A. Tsakiris, B. A. Solecka-Witulska, C. Kannicht // *Thrombosis Research*. — 2017. — Vol. 157. — P. 142–146.
179. Jehan, F. The role of four-factor prothrombin complex concentrate in coagulopathy of trauma: A propensity matched analysis / F. Jehan, H. Aziz, T. O’Keeffe et al. // *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. — 2018. — Vol. 85, № 1. — P. 18–24.
180. Jennings, L. K. Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation / L. K. Jennings, J. E. Fox, H. H. Edwards, D. R. Phillips // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1981. — Vol. 256, № 13. — P. 6927–6932.
181. Jeppsson, A. Preoperative supplementation with fibrinogen concentrate in cardiac surgery: A randomized controlled study / A. Jeppsson, K. Waldén, C. Roman-Emanuel et al. // *British Journal of Anaesthesia*. — 2016. — Vol. 116, № 2. — P. 208–214.
182. Jin, J. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A₂ generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin α IIb β 3 and ADP receptors / J. Jin, T. M. Quinton, J. Zhang et al. // *Blood*. — 2002. — Vol. 99, № 1. — P. 193–198.
183. Johansson, P. I. Differential clot stabilising effects of rFVIIa and rFXIII-A2 in whole blood from thrombocytopenic patients and healthy volunteers / P. I. Johansson, N. Jacob-sen, D. Viuff et al. // *British journal of haematology*. — 2008. — Vol. 143, № 4. — P. 559–69.
184. Johansson, P. I. High circulating adrenaline levels at admission predict increased mortality after trauma / P. I. Johansson, J. Stensballe, L. S. Rasmussen, S. R. Ostrowski // *The journal of trauma and acute care surgery*. — 2012. — Vol. 72, № 2. — P. 428.
185. Johnson, J. L. Effect of blood products transfusion on the development of postinjury multiple organ failure / J. L. Johnson, E. E. Moore, J. L. Kashuk et al. // *Archives of Surgery*. — 2010. — Vol. 145, № 10. — P. 973–977.

186. Johnston, T. D. Functional equivalence of hypothermia to specific clotting factor deficiencies / T. D. Johnston, Y. Chen, R. L. Reed // *The Journal of Trauma*. — 1994. — Vol. 37, № 3. — P. 413–417.
187. Karim, Z. A. Characterization of a novel function-blocking antibody targeted against the platelet P2Y1 receptor / Z. A. Karim, H. P. Vemana, F. Z. Alshbool et al. // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. — 2015. — Vol. 35, № 3. — P. 637–644.
188. Karkouti, K. Efficacy and safety of recombinant factor XIII on reducing blood transfusions in cardiac surgery: a randomized, placebo-controlled, multicenter clinical trial / K. Karkouti, C. von Heymann, C. M. Jespersen et al. // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. — 2013. — Vol. 146, № 4. — P. 927–939.
189. Kasahara, K. Clot retraction is mediated by factor XIII-dependent fibrin- α IIb β 3-myosin axis in platelet sphingomyelin-rich membrane rafts / K. Kasahara, M. Kaneda, T. Miki et al. // *Blood*. — 2013. — Vol. 122, № 19. — P. 3340–3348.
190. Kashiwagi, H. Demonstration of novel gain-of-function mutations of α IIb β 3: association with macrothrombocytopenia and Glanzmann thrombasthenia-like phenotype / H. Kashiwagi, S. Kunishima, K. Kiyomizu et al. // *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. — 2013. — Vol. 1, № 2. — P. 77–86.
191. Kasotakis, G. Aggressive early crystalloid resuscitation adversely affects outcomes in adult blunt trauma patients: an analysis of the Glue Grant database / G. Kasotakis, A. Sideris, Y. Yang et al. // *The journal of Trauma and Acute Care Surgery*. — 2013. — Vol. 74, № 5. — P. 1215–1222.
192. Kattula, S. Factor XIII in plasma, but not in platelets, mediates red blood cell retention in clots and venous thrombus size in mice / S. Kattula, J. R. Byrnes, S. M. Martin et al. // *Blood Advances*. — 2018. — Vol. 2, № 1. — P. 25–35.
193. Kaufman, R. M. Platelet transfusion: A clinical practice guideline from the AABB / R. M. Kaufman, B. Djulbegovic, T. Gernsheimer et al. // *Annals of Internal Medicine*. — 2015. — Vol. 162, № 3. — P. 205–213.
194. Kermode, J. C. Marked temperature dependence of the platelet calcium signal induced by human von Willebrand factor / J. C. Kermode, Q. Zheng, E. P. Milner // *Blood*. — 1999. — Vol. 94, № 1. — P. 199–207.

195. Kettner, S. C. The effect of graded hypothermia (36 degrees C-32 degrees C) on hemostasis in anesthetized patients without surgical trauma / S. C. Kettner, C. Sitzwohl, M. Zimpfer et al. // *Anesthesia & Analgesia*. — 2003. — Vol. 96, № 6. — P. 1772–1776.
196. Keuren, J. F. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ and shear-dependent action of glycoprotein $\text{Ib}\alpha$ stimulate platelet-dependent thrombin formation in stirred plasma / J. F. Keuren, H. Ulrichs, M. A. Feijge et al. // *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. — 2003. — Vol. 141, № 5. — P. 350–358.
197. Khan, S. Hemostatic resuscitation is neither hemostatic nor resuscitative in trauma hemo-rrhage / S. Khan, K. Brohi, M. Chana et al. // *The journal of Trauma and Acute Care Surgery*. — 2014. — Vol. 76, № 3. — P. 561–568.
198. Khan, S. Damage control resuscitation using blood component therapy in standard doses has a limited effect on coagulopathy during trauma hemorrhage / S. Khan, R. Davenport, I. Raza et al. // *Intensive Care Medicine*. — 2015. — Vol. 41, № 2. — P. 239–247.
199. Khellaf, M. Assessment of a therapeutic strategy for adults with severe autoimmune thrombocytopenic purpura based on a bleeding score rather than platelet count / M. Khellaf, M. Michel, A. Schaeffer et al. // *Haematologica*. — 2005. — Vol. 90, № 6. — P. 829–832.
200. Kiekkas, P. Inadvertent hypothermia and mortality in critically ill adults: Systematic review and meta-analysis / P. Kiekkas, F. Fligou, M. Igoumenidis et al. // *Australian Critical Care*. — 2018. — Vol. 31, № 1. — P. 12–22.
201. Kim, S. Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G(i) signaling / S. Kim, C. Foster, A. Lecchi et al. // *Blood*. — 2002. — Vol. 99, № 10. — P. 3629–3636.
202. Kirkpatrick, J. P. Differential effects of cytochalasin B on platelet release, aggregation and contractility: evidence against a contractile mechanism for the release of platelet granular contents / J. P. Kirkpatrick, L. V. McIntire, J. L. Moake, P. L. Cimo // *Thrombosis and Haemostasis*. — 1980. — Vol. 42, № 5. — P. 1483–1489.

203. Kobbervig, C. FXIII polymorphisms, fibrin clot structure and thrombotic risk / C. Kobbervig, E. Williams // *Biophysical Chemistry*. — 2004. — Vol. 112, № 2–3. — P. 223–228.
204. Kojima, T. Systematic elucidation of effects of tranexamic acid on fibrinolysis and bleeding during and after cardiopulmonary bypass surgery / T. Kojima, S. Gando, Y. Morimoto et al. // *Thrombosis Research*. — 2001. — Vol. 104, № 5. — P. 301–307.
205. Kolev, K. Bleeding related to disturbed fibrinolysis / K. Kolev, C. Longstaff // *British Journal of Haematology*. — 2016. — Vol. 175, № 1. — P. 12–23.
206. Kornblith, L. Z. Trauma-induced coagulopathy: The past, present, and future / L. Z. Kornblith, H. B. Moore, M. J. Cohen // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2019. — Vol. 17, № 6. — P. 852–862.
207. Korte, W. C. Factor XIII substitution in surgical cancer patients at high risk for intraoperative bleeding / W. C. Korte, C. Szadkowski, A. Gähler et al. // *Anesthesiology*. — 2009. — Vol. 110, № 2. — P. 239–245.
208. Kouns, W. C. The effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor occupancy on the cytoskeleton of resting and activated platelets / W. C. Kouns, C. F. Fox, W. J. Lamoreaux et al. // *The Journal of biological chemistry*. — 1991. — Vol. 266, № 21. — P. 13891–13900.
209. Kovacsovics, T. J. Thrombin-induced GPIIb-IX centralization on the platelet surface requires actin assembly and myosin II activation / T. J. Kovacsovics, J. H. Hartwig // *Blood*. — 1996. — Vol. 87, № 2. — P. 618–629.
210. Kozek-Langenecker, S. A. Intravenous fluids: should we go with the flow? / S. A. Kozek-Langenecker // *Critical Care*. — 2015. — Vol. 19, № Suppl 3. — P. S2.
211. Kozek-Langenecker, S. A. Fluids and coagulation / S. A. Kozek-Langenecker // *Current Opinion in Critical Care*. — 2015. — Vol. 21, № 4. — P. 285–291.
212. Kozek-Langenecker, S. A. Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology: First update 2016 / S. A. Kozek-Langenecker, A. B. Ahmed, A. Afshari et al. // *European Journal of Anaesthesiology*. — 2017. — Vol. 34, № 6. — P. 332–395.

213. Krishnamurti, C. Inhibitory effects of lysine analogues on t-PA induced whole blood clot lysis / C. Krishnamurti, S. J. Vukelja, B. M. Alving // *Thrombosis Research*. — 1994. — Vol. 73, № 6. — P. 419–430.
214. Krishnegowda, M. Platelet disorders: an overview / M. Krishnegowda, V. Rajashekaraiah // *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. — 2015. — Vol. 26, № 5. — P. 479–491.
215. Kuwana, M. Autoantibody to c-Mpl (thrombopoietin receptor) in systemic lupus erythematosus: relationship to thrombocytopenia with megakaryocytic hypoplasia / M. Kuwana, Y. Okazaki, M. Kajihara et al. // *Arthritis and rheumatism*. — 2002. — Vol. 46, № 8. — P. 2148–2159.
216. Lak, M. Evaluation of rFVIIa (NovoSeven) in Glanzmann patients with thromboelastogram / M. Lak, B. Scharling, A. Blemings et al. // *Haemophilia*. — 2008. — Vol. 14, № 1. — P. 103–110.
217. Lang, T. The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia / T. Lang, K. Johanning, H. Metzler et al. // *Anesthesia and Analgesia*. — 2009. — Vol. 108, № 3. — P. 751–758.
218. Léticée, N. Pregnancy in mother with Glanzmann's thrombasthenia and isoantibody against GPIIb-IIIa: Is there a foetal risk? / N. Léticée, C. Kaplan, D. Lémery // *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. — 2005. — Vol. 121, № 2. — P. 139–142.
219. Levy, J. H. Biology of Factor XIII and clinical manifestations of Factor XIII deficiency / J. H. Levy, C. Greenberg // *Transfusion*. — 2013. — Vol. 53, № 5. — P. 1120–1131.
220. Li, J. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia / J. Li, D. E. van der Wal, G. Zhu et al. // *Nature Communications*. — 2015. — Vol. 6. — P. 7737.
221. Li, Y. Sialylation on O-glycans protects platelets from clearance by liver Kupffer cells / Y. Li, J. Fu, Y. Ling et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2017. — Vol. 114, № 31. — P. 8360–8365.
222. Lijnen, H. R. Influence of cyanogen-bromide-digested fibrinogen on the kinetics of plasminogen activation by urokinase / H. Lijnen, B. Van Hoef, D. Collen // *European Journal of Biochemistry*. — 1984. — Vol. 144, № 3. — P. 541–544.

223. Lison, S. Perioperative haemostatic management of Glanzmann thrombasthenia for abdominal surgery / S. Lison, M. Spannagl, B. Heindl // *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. — 2009. — Vol. 20, № 5. — P. 371–373.
224. Lova, P. A Gi-dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets / P. Lova, S. Paganini, F. Sinigaglia et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2002. — Vol. 277, № 14. — P. 12009–12015.
225. Luo, B. H. Disrupting integrin transmembrane domain heterodimerization increases ligand binding affinity, not valency or clustering / B. H. Luo, C. V. Carman, J. Takagi, T. A. Springer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2005. — Vol. 102, № 10. — P. 3679–3684.
226. Lupu, I. M. A Low-dose human fibrinogen is not effective in decreasing post-operative bleeding and transfusion requirements during cardiac surgery in case of concomitant clinical bleeding and low FIBTEM values: A retrospective matched study / I. M. Lupu, Z. Rebaine, L. Lhotel et al. // *Annals of Cardiac Anaesthesia*. — 2018. — Vol. 21, № 3. — P. 262–269.
227. Lv, X. Evaluation for effects of severe acidosis on hemostasis in trauma patients using thrombelastography analyzer / X. Lv, Y. Mao, Z. Qin // *The American Journal of Emergency Medicine*. — 2018. — Vol. 36, № 8. — P. 1332–1340.
228. Mackman, N. Platelet tissue factor: to be or not to be / N. Mackman, T. Luther // *Thrombosis Research*. — 2013. — Vol. 132, № 1. — P. 3–5.
229. MacLeod, T. J. Phospholipid-associated annexin A2-S100A10 heterotetramer and its subunits / T. J. MacLeod, Mi. Kwon, N. R. Filipenko, D. M. Waisman et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 2003. — Vol. 278, № 28. — P. 25577–25584.
230. Maegele, M. Early coagulopathy in multiple injury: An analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients / M. Maegele, R. Lefering, N. Yucel et al. // *Injury*. — 2007. — Vol. 38, № 3. — P. 298–304.
231. Maegele, M. The coagulopathy of trauma / M. Maegele // *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. — 2014. — Vol. 40, № 2. — P. 113–126.

232. Mahla, E. Does platelet reactivity predict bleeding in patients needing urgent coronary artery bypass grafting during dual antiplatelet therapy? / E. Mahla, F. Prueller, S. Farzi et al. // *The Annals of thoracic surgery*. — 2016. — Vol. 102, № 6. — P. 2010–2017.
233. Makhoulouf, M. M. Expression of IL4 (VNTR intron 3) and IL10 (-627) genes polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura / M. M. Makhoulouf, S. M. Abd Elhamid // *Laboratory Medicine*. — 2014. — Vol. 45, № 3. — P. 211–219.
234. Malmsten, C. Thromboxane synthesis and the platelet release reaction in Bernard-Soulier syndrome, thrombasthenia Glanzmann and Hermansky-Pudlak syndrome / C. Malmsten, H. Kindahl, B. Samuelsson et al. // *British Journal of Haematology*. — 1977. — Vol. 35, № 4. — P. 511–520.
235. Mann, K. G. Thrombin formation / K. G. Mann // *Chest*. — 2003. — Vol. 124, № 3 (suppl. 1). — P. 4S–10S.
236. Manne, R. K. Glanzmann thrombasthenia associated with human immunodeficiency virus-positive patient / R. K. Manne, K. Natarajan, R. Patil et al. // *International Journal of Preventive Medicine*. — 2014. — Vol. 5, № 4. — P. 500–504.
237. Martini, W. Z. Independent contributions of hypothermia and acidosis to coagulopathy in swine / W. Z. Martini, A. E. Pusateri, J. M. Uscilowicz et al. // *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. — 2005. — Vol. 58, № 5. — P. 1002–1010.
238. Martini, W. Z. Thrombelastography is better than PT, aPTT, and activated clotting time in detecting clinically relevant clotting abnormalities after hypothermia, hemorrhagic shock and resuscitation in pigs / W. Z. Martini, D. S. Cortez, M. A. Dubick et al. // *The Journal of Trauma*. — 2008. — Vol. 65, № 3. — P. 535–543.
239. Martini, W. Z. Coagulopathy by hypothermia and acidosis: mechanisms of thrombin generation and fibrinogen availability / W. Z. Martini // *The Journal of Trauma*. — 2009. — Vol. 67, № 1. — P. 202–209.
240. Marumo, M. Extracellular pH affects platelet aggregation associated with modulation of store-operated Ca^{2+} entry / M. Marumo, A. Suehiro, E. Kakishita et al. // *Thrombosis Research*. — 2001. — Vol. 104, № 5. — P. 353–360.
241. May, J. A. GPIIb-IIIa antagonists cause rapid disaggregation of platelets pre-treated with cytochalasin D. Evidence that the stability of platelet aggregates depends on

- normal cytoskeletal assembly / J. A. May, H. Ratan, J. R. Glenn et al. // *Platelets*. — 1998. — Vol. 9, № 3–4. — P. 227–232.
242. McQuilten, Z. K. Fibrinogen concentration and use of fibrinogen supplementation with cryoprecipitate in patients with critical bleeding receiving massive transfusion: a bi-national cohort study / Z. K. McQuilten, M. Bailey, P. A. Cameron et al. // *British Journal of Haematology*. — 2017. — Vol. 179, № 1. — P. 131–141.
243. McVey, M. J. Extracellular vesicles: biomarkers and regulators of vascular function during extracorporeal circulation / M. J. McVey, W. M. Kuebler // *Oncotarget*. — 2018. — Vol. 9, № 98. — P. 37229–37251.
244. Medcalf, R. L. The traumatic side of fibrinolysis / R. L. Medcalf // *Blood*. — 2015. — Vol. 125, № 16. — P. 2457–2458.
245. Medcalf, R. L. What drives “fibrinolysis”? / R. L. Medcalf // *Hamostaseologie*. — 2015. — Vol. 35, № 4. — P. 303–310.
246. van der Meijden, P. E. Key role of integrin $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation / P. E. van der Meijden, M. A. Feijge, F. Swieringa et al. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2012. — Vol. 69, № 20. — P. 3481.
247. Menegatti, M. Minimal factor XIII activity level to prevent major spontaneous bleeds: reply / M. Menegatti, R. Palla, P. Bucciarelli, F. Peyvandi et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2017. — Vol. 15, № 11. — P. 2280–2282.
248. Meng, Z. H. The Effect of Temperature and pH on the activity of Factor VIIa: Implications for the efficacy of high-dose Factor VIIa in hypothermic and acidotic patients / Z. H. Meng, A. S. Wolberg, D. M. Monroe, M. Hoffman // *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. — 2003. — Vol. 55, № 5. — P. 886–891.
249. Middelburg, R. A. Platelet function in adult ITP patients can be either increased or decreased, compared to healthy controls, and is associated with bleeding risk / R. A. Middelburg, J. C. Carbaat-Ham, H. Hesam et al. // *Hematology*. — 2016. — Vol. 21, № 9. — P. 549–551.
250. Di Minno, G. The international, prospective Glanzmann Thrombasthenia Registry: treatment modalities and outcomes of non-surgical bleeding episodes in patients with

- Glanzmann thrombasthenia / G. Di Minno, R. B. Zotz, R. d'Oiron et al. // *Haematologica*. — 2015. — Vol. 100, № 8. — P. 1031–1037.
251. Mistral, T. Performance of point-of-care international normalized ratio measurement to diagnose trauma-induced coagulopathy / T. Mistral, Y. Boué, J. L. Bosson et al. // *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. — 2017. — Vol. 25, № 1. — P. 59.
 252. Mistry, N. Cytoskeletal regulation of the platelet glycoprotein Ib/V/IX-von Willebrand factor interaction / N. Mistry, S. L. Cranmer, Y. Yuan et al. // *Blood*. — 2000. — Vol. 96, № 10. — P. 3480–3489.
 253. Mitchell, J. L. Functional factor XIII-A is exposed on the stimulated platelet surface / J. L. Mitchell, A. S. Lionikiene, S. R. Fraser et al. // *Blood*. — 2014. — Vol. 124, № 26. — P. 3982–3990.
 254. Moledina, S. M. Risk factors for mortality among patients admitted with upper gastrointestinal bleeding at a tertiary hospital: a prospective cohort study / S. M. Moledina, E. Komba // *BMC gastroenterology*. — 2017. — Vol. 17, № 1. — P. 165.
 255. Moncharmont, P. Platelet component transfusion and alloimmunization: Where do we stand? / P. Moncharmont // *Transfusion Clinique et Biologique*. — 2018. — Vol. 25, № 3. — P. 172–178.
 256. Mondoro, T. H. Active GPIIb-IIIa conformations that link ligand interaction with cytoskeletal reorganization / T. H. Mondoro, M. M. White, L. K. Jennings // *Blood*. — 2000. — Vol. 96, № 7. — P. 2487–2495.
 257. Monroe, D. M. Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor / D. M. Monroe, M. Hoffman, J. A. Oliver, H. R. Roberts // *British Journal of Haematology*. — 1997. — Vol. 99, № 3. — P. 542–547.
 258. Monroe D.M. Modeling the action of factor VIIa in dilutional coagulopathy. // *Thrombosis Research*. — 2008. — Vol. 122, Suppl 1. — P. S7–S10.
 259. Moore, E. E. Postinjury fibrinolysis shutdown: Rationale for selective tranexamic acid / E. E. Moore, H. B. Moore, E. Gonzalez et al. // *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. — 2015. — Vol. 78, № 6 (Suppl. 1). — P. S65–S69.

260. Moore, H. B. Acute fibrinolysis shutdown after injury occurs frequently and increases mortality: A multicenter evaluation of 2,540 severely injured patients / H. B. Moore, E. E. Moore, I. N. Liras et al. // *Journal of the American College of Surgeons*. — 2016. — Vol. 222, № 4. — P. 347–355.
261. Moore, H. B. Does Tranexamic acid improve clot strength in severely injured patients who have elevated fibrin degradation products and low fibrinolytic activity, measured by thrombelastography? / H. B. Moore, E. E. Moore, M. P. Chapman et al. // *Journal of the American College of Surgeons*. — 2019. — Vol. 229, № 1. — P. 92–101.
262. Morrison, J. J. A systematic review of the use of resuscitative endovascular balloon occlusion of the aorta in the management of hemorrhagic shock / J. J. Morrison, R. E. Galgon, J. O Jansen et al. // *The journal of trauma and acute care surgery*. — 2016. — Vol. 80, № 2. — P. 324–334.
263. Moser, M. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation / M. Moser, B. Nieswandt, S. Ussar et al. // *Nature Medicine*. — 2008. — Vol. 14, № 3. — P. 325–330.
264. Mosnier, L. O. Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets / L. O. Mosnier, P. Buijtenhuijs, P. F. Marx et al. // *Blood*. — 2003. — Vol. 101, № 12. — P. 4844–4846.
265. Nair, S. Glanzmann's thrombasthenia: updated / S. Nair, K. Ghosh, B. Kulkarni et al. // *Platelets*. — 2002. — Vol. 13, № 7. — P. 387–393.
266. Nakamura, Y. Fibrinogen level on admission is a predictor for massive transfusion in patients with severe blunt trauma: Analyses of a retrospective multicentre observational study / Y. Nakamura, H. Ishikura, S. Kushimoto et al. // *Injury*. — 2017. — Vol. 48, № 3. — P. 674–679.
267. Nakayama, Y. Thromboelastometry-guided intraoperative haemostatic management reduces bleeding and red cell transfusion after paediatric cardiac surgery / Y. Nakayama, Y. Nakajima, K. A. Tanaka et al. // *British Journal of Anaesthesia*. — 2015. — Vol. 114, № 1. — P. 91–102.

268. Nardi, G. Trauma-induced coagulopathy: impact of the early coagulation support protocol on blood product consumption, mortality and costs / G. Nardi, V. Agostini, B. Rondinelli et al. // *Critical care*. — 2015. — Vol. 19. — P. 83.
269. Nascimento, B. Fibrinogen in the initial resuscitation of severe trauma (FiiRST): a randomized feasibility trial / B. Nascimento, J. Callum, H. Tien et al. // *British Journal of Anaesthesia*. — 2016. — Vol. 117, № 6. — P. 775–782.
270. Nechipurenko, D. Y. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface / D. Y. Nechipurenko, N. Receveur, A. O. Yakimenko et al. // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. — 2019. — Vol. 39, № 1. — P. 37–47.
271. Nedel, W. L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor as a bleeding predictor in liver transplantation: a pilot observational study / W. L. Nedel, E. M. Rodrigues Filho, A. C. Pasqualotto // *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. — 2016. — Vol. 28, № 2. — P. 161–166.
272. Négrier, C. Postauthorization safety study of Clottafact®, a triply secured fibrinogen concentrate in acquired fibrinogen deficiency: a prospective observational study / C. Négrier, A. S. Ducloy-Bouthors, V. Piriou et al. // *Vox Sanguinis*. — 2018. — Vol. 113, № 2. — P. 120–127.
273. Nesheim, M. Fibrinolysis and the plasma carboxypeptidase / M. Nesheim // *Current Opinion in Hematology*. — 1998. — Vol. 5, № 5. — P. 309–313.
274. Neufeld, E. J. Recombinant activated factor VII in approved indications: Update on safety / E. J. Neufeld, C. Négrier, S. Benchikh el Fegoun et al. // *Haemophilia*. — 2018. — Vol. 24, № 4. — P. e275–e277.
275. Neunert, C. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia / C. Neunert, W. Lim, M. Crowther et al. // *Blood*. — 2011. — Vol. 117, № 16. — P. 4190–4207.
276. Neunert, C. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review / C. Neunert, N. Noroozi, G. Norman et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2015. — Vol. 13, № 3. — P. 457–464.

277. Nevin, D. G. Permissive hypotension for active haemorrhage in trauma / D. G. Nevin, K. Brohi // *Anaesthesia*. — 2017. — Vol. 72, № 12. — P. 1443–1448.
278. Nielsen, V. G. Contact activation prolongs clot lysis time in human plasma: role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and Factor XIII / V. G. Nielsen, B. L. Steenwyk, W. Q. Gurley // *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. — 2006. — Vol. 25, № 10. — P. 1247–1252.
279. Oda, A. Association of pp60src with Triton X-100-insoluble residue in human blood platelets requires platelet aggregation and actin polymerization / A. Oda, B. J. Druker, M. Smith, E. W. Salzman et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1992. — Vol. 267, № 28. — P. 20075–20081.
280. Osdoit, S. Fibrin clot retraction by human platelets correlates with alpha(IIb)beta(3) integrin-dependent protein tyrosine dephosphorylation / S. Osdoit, J. P. Rosa // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2001. — Vol. 276, № 9. — P. 6703–6710.
281. Ostrowski, S. R. Endothelial glycocalyx degradation induces endogenous heparinization in patients with severe injury and early traumatic coagulopathy / S. R. Ostrowski, P. I. Johansson // *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. — 2012. — Vol. 73, № 1. — P. 60–66.
282. Page, L. K. The immune thrombocytopenic purpura (ITP) bleeding score: assessment of bleeding in patients with ITP / L. K. Page, B. Psaila, D. Provan et al. // *British Journal of Haematology*. — 2007. — Vol. 138, № 2. — P. 245–248.
283. Paniccia, R. Platelet function tests: a comparative review / R. Paniccia, R. Priora, A. A. Liotta, R. Abbate // *Vascular Health and Risk Management*. — 2015. — Vol. 11. — P. 133–148.
284. Pansy, J. Evaluating bleeding severity in children with newly diagnosed immune thrombocytopenia: a pilot study / J. Pansy, M. Minkov, R. Dengg et al. // *Klinische Padiatrie*. — 2010. — Vol. 222, № 6. — P. 374–377.
285. Park, M. S. Quantification of hypercoagulable state after blunt trauma: Microparticle and thrombin generation are increased relative to injury severity, while standard markers are not / M. S. Park, B. A. Owen, B. A. Ballinger et al. // *Surgery*. — 2012. — Vol. 151, № 6. — P. 831–836.

286. Payen, J. F. Reduced mortality by meeting guideline criteria before using recombinant activated factor VII in severe trauma patients with massive bleeding / J. F. Payen, M. Berthet, C. Genty et al. // *British Journal of Anaesthesia*. — 2016. — Vol. 117, № 4. — P. 470–476.
287. Pedicord, D. L. Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists inhibit the development of platelet procoagulant activity / D. L. Pedicord, B. E. Thomas, S. A. Mousa, I. B. Dicker // *Thrombosis Research*. — 1998. — Vol. 90, № 6. — P. 247–258.
288. Peerschke, E. I. Time-dependent association between platelet-bound fibrinogen and the Triton X-100 insoluble cytoskeleton / E. I. Peerschke // *Blood*. — 1991. — Vol. 77, № 3. — P. 508–514.
289. Peerschke, E. I. Relationship of ADP-induced fibrinogen binding to platelet shape change and aggregation elucidated by use of colchicine and cytochalasin B / E. I. Peerschke, M. B. Zucker // *Thrombosis and haemostasis*. — 1980. — Vol. 43, № 1. — P. 58–60.
290. Petrou, A. Massive bleeding in cardiac surgery. Definitions, predictors and challenges / A. Petrou, P. Tzimas, S. Siminelakis // *Hippokratia*. — 2016. — Vol. 20, № 3. — P. 179–186.
291. Pham, H. P. Update on massive transfusion / H. P. Pham, B. H. Shaz // *British Journal of Anaesthesia*. — 2013. — Vol. 111, Suppl. 1. — P. i71–i82.
292. Phillips, D. R. Identification of membrane proteins mediating the interaction of human platelets / D. R. Phillips, L. K. Jennings, H. H. Edwards // *The Journal of Cell Biology*. — 1980. — Vol. 86, № 1. — P. 77–86.
293. Ponschab, M. Haemostatic profile of reconstituted blood in a proposed 1:1:1 ratio of packed red blood cells, platelet concentrate and four different plasma preparations / M. Ponschab, H. Schöchl, C. Gabriel et al. // *Anaesthesia*. — 2015. — Vol. 70, № 5. — P. 528–536.
294. Poon, M. C. The international, prospective Glanzmann Thrombasthenia Registry: treatment and outcomes in surgical intervention / M. C. Poon, R. d'Oiron, R. B. Zotz et al. // *Haematologica*. — 2015. — Vol. 100, № 8. — P. 1038–1044.
295. Poon, M. C. New Insights into the treatment of Glanzmann thrombasthenia / M. C. Poon, G. Di Minno, R. d'Oiron, R. Zotz // *Transfusion Medicine Reviews*. — 2016. — Vol. 30, № 2. — P. 92–99.

296. Poon, M. C. Alloimmunization in congenital deficiencies of platelet surface glycol-proteins: focus on Glanzmann's thrombasthenia and Bernard-Soulier's syndrome / M. C. Poon, R. d'Oiron // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. — 2018. — Vol. 44, № 6. — P. 604–614.
297. Poon, M. C. Hemopoietic origin of factor XIII A subunits in platelets, monocytes, and plasma. Evidence from bone marrow transplantation studies / M. C. Poon, J. A. Russell, S. Low et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. — 1989. — Vol. 84, № 3. — P. 787–792.
298. Prokopchuk-Gauk, O. Tranexamic acid to treat life-threatening hemorrhage in prostate cancer associated disseminated intravascular coagulation with excessive fibrinolysis / O. Prokopchuk-Gauk, K. Brose // *Cureus*. — 2015. — Vol. 7, № 12. — P. e428.
299. Provan, D. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia / D. Provan, R. Stasi, A. C. Newland et al. // *Blood*. — 2010. — Vol. 115, № 2. — P. 168–186.
300. Puszkin, E. G. Assembly and GPIIIa content of cytoskeletal core in platelets agglutinated with bovine von Willebrand factor / E. G. Puszkin, E. A. Mauss, M. B. Zucker // *Blood*. — 1990. — Vol. 76, № 8. — P. 1572–1579.
301. Rahe-Meyer, N. Bleeding management with fibrinogen concentrate targeting a high-normal plasma fibrinogen level: a pilot study / N. Rahe-Meyer, M. Pichlmaier, A. Have-rich et al. // *British Journal of Anaesthesia*. — 2009. — Vol. 102, № 6. — P. 785–792.
302. Rajpurkar, M. Use of recombinant activated factor VII in patients with Glanzmann's thrombasthenia: a review of the literature / M. Rajpurkar, M. Chitlur, M. Recht, D. L. Cooper // *Haemophilia*. — 2014. — Vol. 20, № 4. — P. 464–471.
303. Ramaker, A. J. Effects of acidosis, alkalosis, hyperthermia and hypothermia on haemostasis: results of point-of-care testing with the thromboelastography analyser / A. J. Ramaker, P. Meyer, J. van der Meer et al. // *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. — 2009. — Vol. 20, № 6. — P. 436–439.
304. Rank, A. Management of chronic immune thrombocytopenic purpura: targeting insufficient megakaryopoiesis as a novel therapeutic principle / A. Rank, Q. Weigert, H. Ostermann // *Biologics: Targets and Therapy*. — 2010. — Vol. 4. — P. 139–145.

305. Ranucci, M. Major bleeding, transfusions, and anemia: the deadly triad of cardiac surgery / M. Ranucci, E. Baryshnikova, S. Castelvechio et al. // *The Annals of Thoracic Surgery*. — 2013. — Vol. 96, № 2. — P. 478–485.
306. Rao, V. M. Cells and the Activation of Factor VII / V. M. Rao, S. I. Rapaport // *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. — 1996. — Vol. 26 (Suppl 1.) — P. 1–5.
307. Reverter, J. C. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and “clinical restenosis” / J. C. Reverter, S. Béguin, H. Kessels et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. — 1996. — Vol. 98, № 3. — P. 863–874.
308. Rizoli, S. B. Clotting factor deficiency in early trauma-associated coagulopathy / S. B. Rizoli, S. Scarpelini, J. Callum et al. // *Journal of Trauma*. — 2011. — Vol. 71, № 5 (Suppl. 1). — P. S427–S434.
309. Rodeghiero, F. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group / F. Rodeghiero, R. Stasi, T. Gernsheimer et al. // *Blood*. — 2009. — Vol. 113, № 11. — P. 2386–2393.
310. Rohrer, M. J. Effect of hypothermia on the coagulation cascade / M. J. Rohrer, A. M. Natale // *Critical Care Medicine*. — 1992. — Vol. 20, № 10. — P. 1402–1405.
311. Ross, S. W. Returning from the acidotic abyss: Mortality in trauma patients with a pH / S. W. Ross, B. W. Thomas, A. B. Christmas et al. // *American Journal of Surgery*. — 2017. — Vol. 214, № 6. — P. 1067–1072.
312. Rossaint, R. The STOP the bleeding campaign / R. Rossaint, B. Bouillon, V. Cerny et al. // *Critical Care*. — 2013. — Vol. 17, № 2. — P. 136.
313. Rosthøj, S. Duration and morbidity of chronic immune thrombocytopenic purpura in children: five-year follow-up of a Nordic cohort / S. Rosthøj, J. Rajantie, I. Treutiger et al. // *Acta Paediatrica*. — 2012. — Vol. 101, № 7. — P. 761–766.
314. Roubinian, N. H. Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury / N. H. Roubinian, D. J. Triulzi // *Hematology/Oncology Clinics of North America*. — 2019. — Vol. 33, № 5. — P. 767–779.

315. Rugeri, L. Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thrombelastography / L. Rugeri, A. Levrat, J. S. David et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2007. — Vol. 5, № 2. — P. 289–295.
316. Rundgren, M. A thromboelastometric evaluation of the effects of hypothermia on the coagulation system / M. A Rundgren, M. Engström // *Anesthesia and Analgesia*. — 2008. — Vol. 107, № 5. — P. 1465–1468.
317. Ryan, E. A. Structural origins of fibrin clot rheology / E. A. Ryan, L. F. Mockros, J. W. Weisel, L. Lorand // *Biophysical journal*. — 1999. — Vol. 77, № 5. — P. 2813–2826.
318. Ryan, E. A. Influence of a natural and a synthetic inhibitor of factor XIIIa on fibrin clot rheology / E. A. Ryan, L. F. Mockros, A. M. Stern, L. Lorand // *Biophysical Journal*. — 1999. — Vol. 77, № 5. — P. 2827–2836.
319. Sabate, A. Impact of preemptive fibrinogen concentrate on transfusion requirements in liver transplantation: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial / A. Sabate, R. Gutierrez, J. Beltran et al. // *American Journal of Transplantation*. — 2016. — Vol. 16, № 8. — P. 2421–2429.
320. Salama, A. Massive platelet transfusion is a rapidly effective emergency treatment in patients with refractory autoimmune thrombocytopenia / A. Salama, H. Kiesewetter, U. Kalus et al. // *Thrombosis and Haemostasis*. — 2008. — Vol. 100, № 5. — P. 762–765.
321. Saris, A. Platelets from donors with consistently low HLA-B8, -B12, or -B35 expression do not undergo antibody-mediated internalization / A. Saris, B. Tomson, A. Brand et al. // *Blood*. — 2018. — Vol. 131, № 1. — P. 144–152.
322. Sato, H. Accelerated activation of the coagulation pathway during cardiopulmonary bypass in aortic replacement surgery: a prospective observational study / H. Sato, K. Yamamoto, A. Kakinuma et al. // *Journal of Cardiothoracic Surgery*. — 2015. — Vol. 10. — P. 84.
323. Sauaia, A. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment / A. Sauaia, F. A. Moore, E. E. Moore et al. // *The Journal of Trauma*. — 1995. — Vol. 38, № 2. — P. 185–193.
324. Saumet, A. Association of thrombospondin-1 with the actin cytoskeleton of human thrombin-activated platelets through an α IIb β 3- or CD36-independent mechanism / A. Saumet, N. de Jesus, C. Legrand, V. Dubernard et al. // *The Biochemical Journal*. — 2002. — Vol. 363, № 3. — P. 473–482.

325. Say, L. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis / L. Say, D. Chou, A. Gemmill et al. // *The Lancet. Global health.* — 2014. — Vol. 2, № 6. — P. e323–e333.
326. Schadinger, S. L. Secretion and antifibrinolytic function of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor from human platelets / S. L. Schadinger, J. H. Lin, M. Garand, M. B. Boffa // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* — 2010. — Vol. 8, № 11. — P. 2523–2529.
327. Schöchl, H. Goal-directed coagulation management of major trauma patients using thromboelastometry (ROTEM)-guided administration of fibrinogen concentrate and prothrombin complex concentrate / H. Schöchl, U. Nienaber, G. Hofer et al. // *Critical Care.* — 2010. — Vol. 14, № 2. — P. R55.
328. Schöchl, H. Management of traumatic haemorrhage — the European perspective / H. Schöchl, W. Voelckel, C. J. Schlimp // *Anaesthesia.* — 2015. — Vol. 70, Suppl 1. — P. 102–107.
329. Schramko, A. A. Role of fibrinogen-, factor VIII- and XIII-mediated clot propagation in gelatin haemodilution / A. A. Schramko, A. H. Kuitunen, R. T. Suojaranta-Ylinen, T. T. Niemi // *Acta Anaesthesiologica Scandinavica.* — 2009. — Vol. 53, № 6. — P. 731–735.
330. Sessler, D. I. Complications and Treatment of Mild Hypothermia / D. I. Sessler // *Anesthesiology.* — 2001. — Vol. 95, № 2. — P. 531–543.
331. Shen, B. A directional switch of integrin signalling and a new anti-thrombotic strategy / B. Shen, X. Zhao, K. A. O'Brien et al. // *Nature.* — 2013. — Vol. 503, № 7474. — P. 131–135.
332. Shenkman, B. Testing of platelet deposition on polystyrene surface under flow conditions by the Cone and Plate(let) Analyzer / B. Shenkman, N. Savion, R. Dardik et al. // *Thrombosis Research.* — 2000. — Vol. 99, № 4. — P. 353–361.
333. Shenkman, B. 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 et al. // *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* — 2012. — Vol. 23, № 5. — P. 370–378.

334. Shenkman, B. Plasma tissue-type plasminogen activator increases fibrinolytic activity of exogenous urokinase-type plasminogen activator / B. Shenkman, T. Livnat, I. Budnik et al. // *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. — 2012. — Vol. 23, № 8. — P. 729–733.
335. Shirasugi, Y. Romiplostim for the treatment of chronic immune thrombocytopenia in adult Japanese patients: a double-blind, randomized Phase III clinical trial / Y. Shirasugi, K. Ando, K. Miyazaki et al. // *International Journal of Hematology*. — 2011. — Vol. 94, № 1. — P. 71–80.
336. Siller-Matula, J. M. Phenotyping vs. genotyping for prediction of clopidogrel efficacy and safety: the PEGASUS-PCI study / J. M. Siller-Matula, G. Delle-Karth, I. M. Lang et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2012. — Vol. 10, № 4. — P. 529–542.
337. Silva, M. M. Regulation of fibrinolysis by C-terminal lysines operates through plasminogen and plasmin but not tissue-type plasminogen activator / M. M. Silva, C. Thelwell, S. C. Williams, C. Longstaff et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2012. — Vol. 10, № 11. — P. 2354–2360.
338. Sinauridze, E. I. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets / E. I. Sinauridze, D. A. Kireev, N. Y. Popenko et al. // *Thrombosis and haemostasis*. — 2007. — Vol. 97, № 3. — P. 425–434.
339. Smith, C. A. Does saline resuscitation affect mechanisms of coagulopathy in critically ill trauma patients? An exploratory analysis / C. A. Smith, R. C. Gosselin, G. H. Utter et al. // *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. — 2015. — Vol. 26, № 3. — P. 250–254.
340. Smith, K. A. Interactions between factor XIII and the alphaC region of fibrinogen / K. A. Smith, P. J. Adamson, R. J. Pease et al. // *Blood*. — 2011. — Vol. 117, № 12. — P. 3460–3468.
341. Smith, S. A. Early coagulopathy and metabolic acidosis predict transfusion of packed red blood cells in pediatric trauma patients / S. A. Smith, M. H. Livingston, N. H. Merritt // *Journal of Pediatric Surgery*. — 2016. — Vol. 51, № 5. — P. 848–852.
342. Sniecinski, R. Antithrombin deficiency increases thrombin activity after prolonged cardiopulmonary bypass / R. Sniecinski, F. Szlam, E. P. Chen et al. // *Anesthesia and Analgesia*. — 2008. — Vol. 106, № 3. — P. 713–718.

343. Soleimani, M. The effect of fibrinogen concentrate on perioperative bleeding in transurethral resection of the prostate: a double-blind placebo-controlled and randomized study / M. Soleimani, N. Masoumi, N. Nooraei et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2017. — Vol. 15, № 2. — P. 255–262.
344. Solh, T. Glanzmann's thrombasthenia: pathogenesis, diagnosis, and current and emerging treatment options / T. Solh, A. Botsford, M. Solh // *Journal of Blood Medicine*. — 2015. — Vol. 6. — P. 219–27.
345. Solomon, C. Time course of haemostatic effects of fibrinogen concentrate administration in aortic surgery / C. Solomon, C. Hagl, N. Rahe-Meyer // *British Journal of Anaesthesia*. — 2013. — Vol. 110, № 6. — P. 947–956.
346. Spahn, D. R. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition / D. R. Spahn, B. Bouillon, V. Cerny et al. // *Critical Care*. — 2019. — Vol. 23, № 1. — P. 98.
347. Spero, R. C. Nanoparticle Diffusion Measures Bulk Clot Permeability / R. C. Spero, R. K. Sircar, R. Schubert et al. // *Biophysical Journal*. — 2011. — Vol. 101, № 4. — P. 943–950.
348. Stansbury, L. G. The clinical significance of platelet counts in the first 24 hours after severe injury / L. G. Stansbury, A. S. Hess, K. Thompson et al. // *Transfusion*. — 2013. — Vol. 53, № 4. — P. 783–789.
349. Stasi, R. Long-term outcome of otherwise healthy individuals with incidentally discovered borderline thrombocytopenia / R. Stasi, S. Amadori, J. Osborn et al. // *PLoS Medicine*. — 2006. — Vol. 3, № 3. — P. e24.
350. Stasi, R. How to approach thrombocytopenia / R. Stasi // *Hematology*. — 2012. — Vol. 2012. — P. 191–197.
351. Stein, P. Change of transfusion and treatment paradigm in major trauma patients / P. Stein, A. Kaserer, K. Sprengel et al. // *Anaesthesia*. — 2017. — Vol. 72, № 11. — P. 1317–1326.
352. Stewart, R. J. Characterization of the interactions of plasminogen and tissue and vampire bat plasminogen activators with fibrinogen, fibrin, and the complex of D-dimer noncovalently linked to fragment E / R. J. Stewart, J. C. Fredenburgh, J. I. Weitz // *Journal of Biological Chemistry*. — 1998. — Vol. 273, № 29. — P. 18292–18299.

353. Summersgill, A. Determining the utility of metabolic acidosis for trauma patients in the emergency department / A. Summersgill, M. Kanter, R. M. Fraser et al. // The Journal of Emergency Medicine. — 2015. — Vol. 48, № 6. — P. 693–698.
354. Swinkels, M. Emerging concepts in immune thrombocytopenia / M. Swinkels, M. Rijkers, J. Voorberg et al. // Frontiers in Immunology. — 2018. — Vol. 9. — P. 880.
355. Takada, A. Effects of tranexamic acid on fibrinolysis, fibrinogenolysis and amidolysis / A. Takada, Y. Makino, Y. Takada // Thrombosis Research. — 1986. — Vol. 42, № 1. — P. 39–47.
356. Takada, A. Enhancement of the activation of Glu-plasminogen by urokinase in the simultaneous presence of tranexamic acid or fibrin / A. Takada, Y. Sugawara, Y. Takada // Haemostasis. — 1989. — Vol. 19, № 1. — P. 26–31.
357. Tarantino, M. D. Hospitalizations in pediatric patients with immune thrombocytopenia in the United States / M. D. Tarantino, M. Danese, R. J. Klaassen et al. // Platelets. — 2016. — Vol. 27, № 5. — P. 472–478.
358. Terrell, D. R. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports / D. R. Terrell, L. A. Beebe, S. K. Vesely et al. // American journal of hematology. — 2010. — Vol. 85, № 3. — P. 174–180.
359. Thachil, J. How do we approach thrombocytopenia in critically ill patients? / J. Thachil, T. E. Warkentin // British Journal of Haematology. — 2017. — Vol. 177, № 1. — P. 27–38.
360. Thelwell, C. The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1 / C. Thelwell, C. Longstaff // Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2007. — Vol. 5, № 4. — P. 804–811.
361. Theusinger, O. M. *In vitro* factor XIII supplementation increases clot firmness in rotation thromboelastometry (ROTEM®) / O. M Theusinger, W. Baulig, L. M. Asmis et al. // Thrombosis and Haemostasis. — 2010. — Vol. 104, № 2. — P. 385–391.
362. Thomas, M. R. Clinical significance of residual platelet reactivity in patients treated with platelet P2Y₁₂ inhibitors / M. R. Thomas, R. F. Storey // Vascular Pharmacology. — 2016. — Vol. 84. — P. 25–27.

363. Thorsen, K. Clinical and cellular effects of hypothermia, acidosis and coagulopathy in major injury / K. Thorsen, K. G. Ringdal, K. Strand et al. // *British Journal of Surgery*. — 2011. — Vol. 98, № 7. — P. 894–907.
364. Topal, A. Anaesthetic Management with thromboelastography in a patient with Glanzmann thrombasthenia / A. Topal, A. Kılıçaslan, A. Erol et al. // *Turkish Journal of Anaesthesiology and Reanimation*. — 2014. — Vol. 42, № 4. — P. 227–229.
365. Torbet, J. The thrombin activation pathway modulates the assembly, structure and lysis of human plasma clots in vitro / J. Torbet // *Thrombosis and Haemostasis*. — 1995. — Vol. 73, № 5. — P. 785–792.
366. Torti, M. Agonist-induced actin polymerization is required for the irreversibility of platelet aggregation / M. Torti, E. T. Festetics, A. Bertoni et al. // *Thrombosis and Haemostasis*. — 1996. — Vol. 76, № 3. — P. 444–449.
367. Torti, M. The platelet cytoskeleton regulates the aggregation-dependent synthesis of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate induced by thrombin / M. Torti, A. Bertoni, F. Sinigaglia et al. // *FEBS Letters*. — 2000. — Vol. 466, № 2–3. — P. 355–358.
368. Trumel, C. A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase / C. Trumel, B. Payrastre, M. Plantavid et al. // *Blood*. — 1999. — Vol. 94, № 12. — P. 4156–4165.
369. Tsuei, B. J. Hypothermia in the trauma patient / B. J. Tsuei, P. A. Kearney // *Injury*. — 2004. — Vol. 35, № 1. — P. 7–15.
370. Tu, Y. K. Testing the relation between percentage change and baseline value / Y. K. Tu // *Scientific reports*. — 2016. — Vol. 6, № 1. — P. 23247.
371. Turecek, P. L. FEIBA: mode of action / P. L. Turecek, K. Váradi, H. Gritsch, H. P. Schwarz. // *Haemophilia*. — 2004. — Vol. 10, Suppl. 2. — P. 3–9.
372. Tutwiler, V. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood / V. Tutwiler, R. I. Litvinov, A. P. Lozhkin et al. // *Blood*. — 2016. — Vol. 127, № 1. — P. 149–159.
373. Uitte de Willige, S. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen' levels / S. Uitte de Willige,

- M. C. Visser, J. J. Houwing-Duistermaat et al. // *Blood*. — 2005. — Vol. 106, № 13. — P. 4176–4183.
374. Urano, T. Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin / T. Urano, F. J. Castellino, Y. Suzuki // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2018. — Vol. 16, № 8. — P. 1487–1497.
375. Valgimigli, M. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) / M. Valgimigli, H. Bueno, R. A. Byrne et al. // *European Heart Journal*. — 2018. — Vol. 39, № 3. — P. 213–260.
376. Valle, E. J. Do all trauma patients benefit from tranexamic acid? / E. J. Valle, C. J. Allen, R. M. Van Haren et al. // *The journal of trauma and acute care surgery*. — 2014. — Vol. 76, № 6. — P. 1373–1378.
377. Vardon, F. Accidental hypothermia in severe trauma / F. Vardon, S. Mrozek, T. Geeraerts, O. Fourcade // *Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine*. — 2016. — Vol. 35, № 5. — P. 355–361.
378. Velik-Salchner, C. The effect of fibrinogen concentrate on thrombocytopenia / C. Velik-Salchner, T. Haas, P. Innerhofer et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2007. — Vol. 5, № 5. — P. 1019–1025.
379. Verhovsek, M. Laboratory testing for fibrinogen abnormalities / M. Verhovsek, K. A. Moffat, C. P. Hayward // *American Journal of Hematology*. — 2008. — Vol. 83, № 12. — P. 928–931.
380. Vischer, U. M. Epinephrine induces von Willebrand factor release from cultured endothelial cells: involvement of cyclic AMP-dependent signalling in exocytosis / U. M. Vischer, C. B. Wollheim // *Thrombosis and Haemostasis*. — 1997. — Vol. 77, № 6. — P. 1182–1188.
381. Vulliamy, P. Platelet transfusions reduce fibrinolysis but do not restore platelet function during trauma hemorrhage / P. Vulliamy, S. Gillespie, L. S. Gall et al. // *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. — 2017. — Vol. 83, № 3. — P. 388–397.

382. Wang, W. The newest progress of research on acute trauma-induced coagulopathy / W. Wang, Z.-S. Feng, W. Yin // *Journal of Acute Disease*. — 2016. — Vol. 5, № 3. — P. 185–189.
383. Wang, X. Tubulointerstitial fibrosis of living donor kidneys associates with urinary monocyte chemoattractant protein 1 / X. Wang, J. C. Lieske, M. P. Alexander et al. // *American Journal of Nephrology*. — 2016. — Vol. 43, № 6. — P. 454–459.
384. Watts, D. D. Hypothermic coagulopathy in trauma: effect of varying levels of hypothermia on enzyme speed, platelet function, and fibrinolytic activity / D. D. Watts, A. Trask, K. Soeken et al. // *The Journal of Trauma*. — 1998. — Vol. 44, № 5. — P. 846–854.
385. Weeterings, C. The glycoprotein Ib-IX-V complex contributes to tissue factor-independent thrombin generation by recombinant factor VIIa on the activated platelet surface / C. Weeterings, P. G. de Groot, J. Adelmeijer, T. Lisman // *Blood*. — 2008. — Vol. 112, № 8. — P. 3227–3233.
386. Weitz, J. I. Urokinase has direct catalytic activity against fibrinogen and renders it less clottable by thrombin / J. I. Weitz, B. Leslie // *Journal of Clinical Investigation*. — 1990. — Vol. 86, № 1. — P. 203–212.
387. Wheeler, M. E. Retention of the glycoprotein IIb-IIIa complex in the isolated platelet cytoskeleton. Effects of separable assembly of platelet pseudopodal and contractile cytoskeletons / M. E. Wheeler, A. C. Cox., R. C. Carroll // *The Journal of Clinical Investigation*. — 1984. — Vol. 74, № 3. — P. 1080–1089.
388. Wikkelsø, A. J. Pre-emptive treatment with fibrinogen concentrate for postpartum haemorrhage: randomized controlled trial / A. J. Wikkelsø, H. M. Edwards, A. Afshari et al. // *British Journal of Anaesthesia*. — 2015. — Vol. 114, № 4. — P. 623–633.
389. Wohlaer, M. V. Early platelet dysfunction: an unrecognized role in the acute coagulopathy of trauma / M. V. Wohlaer, E. E. Moore, S. Thomas et al. // *Journal of the American College of Surgeons*. — 2012. — Vol. 214, № 5. — P. 739–746.
390. Wolberg, A. S. Elevated prothrombin results in clots with an altered fiber structure: a possible mechanism of the increased thrombotic risk / A. S. Wolberg, D. M. Monroe, H. R. Roberts, M. Hoffman // *Blood*. — 2003. — Vol. 101, № 8. — P. 3008–3013.

391. Wolberg, A. S. A Systematic evaluation of the effect of temperature on coagulation enzyme activity and platelet function / A. S. Wolberg, Z. H. Meng, D. M. Monroe, M. Hoffman // *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. — 2004. — Vol. 56, № 6. — P. 1221–1228.
392. Yadav, D. K. Association of *TNF- α -308G>A* and *TNF- β +252A>G* genes polymorphisms with primary immune thrombocytopenia: a North Indian study / D. K. Yadav, A. K. Tripathi, A. Kumar et al. // *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. — 2016. — Vol. 27, № 7. — P. 791–796.
393. Yuan, S. Comparing the prothrombin time INR versus the APTT to evaluate the coagulopathy of acute trauma / S. Yuan, C. Ferrell, W. L. Chandler // *Thrombosis research*. — 2007. — Vol. 120, № 1. — P. 29–37.
394. Zatta, A. J. Elucidating the clinical characteristics of patients captured using different definitions of massive transfusion / A. J. Zatta, Z. K. McQuilten, B. Mitra et al. // *Vox sanguinis*. — 2014. — Vol. 107, № 1. — P. 60–70.
395. Zentai, C. Hemostatic therapy using tranexamic acid and coagulation factor concentrates in a model of traumatic liver injury / C. Zentai, P. E. van der Meijden, T. Braunschweig et al. // *Anesthesia and analgesia*. — 2016. — Vol. 123, № 1. — P. 38–48.
396. Zhang, G. Distinct roles for Rap1b protein in platelet secretion and integrin α IIb β 3 outside-in signaling / G. Zhang, B. Xiang, S. Ye et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2011. — Vol. 286, № 45. — P. 39466–39477.
397. Zimmermann, N. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery / N. Zimmermann, A. Wenk, U. Kim et al. // *Circulation*. — 2003. — Vol. 108, № 5. — P. 542–547.
398. Zinke, R. A. Factor VIII/von Willebrand factor concentrate for treatment of life-threatening epistaxis in Glanzmann's thrombasthenia / R. A. Zinke, D. L. Ornstein, C. E. Holmes // *Haemophilia*. — 2010. — Vol. 16, № 4. — P. 701–704.