



На правах рукописи

Сухарева Екатерина Геннадьевна

**ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ НА
ГЕМОСТАЗ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ (НА МОДЕЛИ
ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ)**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в отделении гравитационной хирургии и гемодиализа ФГБУ «Приволжского федерального медицинского исследовательского центра» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Григорий Яковлевич Левин

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения гравитационной хирургии и гемодиализа ФГБУ «Приволжского федерального медицинского исследовательского центра» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

Алексей Васильевич Муравьев

доктор биологических наук, профессор кафедры медико-биологических основ спорта ФГБОУ ВО «Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского».

Ляйли Дияверовна Зубаирова

доктор медицинских наук, профессор кафедры общей патологии ГБОУ ВПО «Казанского государственного медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

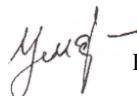
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится 31 октября в 15.30 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.93 при биологическом факультете Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова» по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, д.27) и на сайте <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Микровезикулы (МВ) представляют собой замкнутые фрагменты плазматической мембраны, выделяемые в кровотоки различными типами клеток, такими как тромбоциты, эритроциты, лейкоциты или эндотелиальные клетки (Diamant M. et al., 2004). МВ имеют размер менее 1 мкм и содержат множество белков, получаемых ими из клеток от которых они образовались, а также поверхностных рецепторов, которые позволяют идентифицировать их происхождение. Образование МВ связано с дестабилизацией липидного комплекса мембраны родительской клетки. При этом образуется направленное наружу выпячивание и последующее отделение МВ (Piccin A. et al., 2007).

Считается, что выход МВ – это жестко контролируемый процесс, вызванный различными стимулами, такими как стресс, комплементарная атака, про-апоптотическая стимуляция или повреждение (Rubin O. et al., 2010a). Достаточно долго считалось, что МВ являются побочными продуктами жизнедеятельности клеток и не имеют функциональной активности. В настоящее время МВ известны как клеточные эффекторы, вовлеченные в многочисленные клеточные процессы, в том числе и в гемостаз (Distler J. H. et al., 2005). Они участвуют в регуляции воспалительного процесса, клеточной пролиферации, апоптоза, сосудистых реакций и ряда других жизненно важных процессов (Abid Hussein M. N. et al., 2003; Distler J. H. et al., 2005). Показано, что при гемостазе, МВ обеспечивают дополнительную отрицательную фосфолипидную поверхность для сборки теназного и протромбиназного комплексов, тем самым, участвуя в каскаде коагуляции (Зубаиров Д. М., Зубаирова Л. Д., 2009).

Большая часть работ посвящена исследованию коагуляционной активности тромбоцитарных МВ, что связано с ведущей ролью в гемостазе именно тромбоцитов (Holme P. A. et al., 1998). Роль эритроцитарных МВ (эМВ) в гемокоагуляционном процессе остается мало изученной.

В ряде работ описана важная роль эМВ в патогенезе некоторых патологических состояний, в частности при онкологии, сердечнососудистых заболеваниях, гемолитической анемии, сепсисе. При этом была продемонстрирована связь между этими заболеваниями и ростом числа МВ в плазме (VanWijk M. J. et al., 2003; Diamant M. et al., 2004; Soriano A. O. et al., 2005; Ataga K. I., 2009).

Существует большое количество работ, посвященных нарушению гемостаза при ожоговой болезни (Arturson G., 2000; Lavrentieva A. et al., 2008). В них, как правило, сообщается о выраженной гиперкоагуляции, вплоть до развития синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания после термической травмы. Указывается на множество

причин, вызывающих эту гиперкоагуляцию – выброс тканевого тромбопластина, гиперадреналинемия, гемолиз эритроцитов, активация перекисного окисления липидов, протеолиза и другое (Fang С. Н. et al., 2002). Данные о возможной роли МВ, в частности, эритроцитарных, в развитии гиперкоагуляционного синдрома после термической травмы в литературе практически отсутствуют. Кроме того, повышение концентрации МВ у ожоговых больных могут провоцировать гемотрансфузии, т.к. в процессе консервации значительно усиливается везикулообразование (Rubin O. et al., 2010a).

При консервации эритроцитов происходят изменения, известные как «the storage lesion» и накопление МВ является одним из проявлений этого процесса (Bosman G. J. et al., 2008b; Lion N. et al., 2010). В процессе хранения мембраны эритроцитов становятся более жесткими, нарушается фосфолипидная асимметрия, и образуются МВ. Это происходит в течение всей жизни эритроцита в кровотоке, и значительно усиливается во время хранения, что приводит к накоплению МВ при консервации и может иметь влияние на эффективность трансфузий. Известны немногочисленные работы, посвященные влиянию эритроцитов небольших и поздних сроков хранения на посттрансфузионные осложнения у реципиентов (Koch С. G. et al., 2008; Spinella P. С. et al., 2009). Предполагается, что МВ выступают в качестве потенциальной причины этих осложнений.

Цель исследования: изучить влияние микровезикул, выделенных из эритроцитов в процессе их консервации, на плазменный гемостаз и агрегацию тромбоцитов в норме и при ожоговой болезни.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние микровезикул, выделенных из эритроцитов в процессе их консервации, на показатели плазменного гемостаза клотинговым и тромбоэластографическим методами.
2. Исследовать фибринолитическую и антитромбиновую активность микровезикул, выделенных из эритроцитов в процессе их консервации.
3. Изучить влияние микровезикул, выделенных из эритроцитов в процессе их консервации на процесс спонтанной (поток-индуцированной) агрегации тромбоцитов.
4. Исследовать изменение деформируемости эритроцитов, а также концентрации Hb и HbA_{1c} в эритроцитах, их мембранах и микровезикулах, выделенных из эритроцитов в процессе их консервации.
5. Изучить влияние термической травмы на процесс микровезикуляции эритроцитов и гемокоагуляционные свойства эритроцитарных микровезикул.

Научная новизна:

– впервые установлено, что эритроцитарные микровезикулы обладают не только прокоагулянтной, но и антитромбиновой активностью, которая

может быть связана с присутствием на их мембранах антитромбина, кофактора гепарина II и $\alpha 2$ -макроглобулина.

– впервые показано, что эритроцитарные микровезикулы обладают выраженной фибринолитической активностью, которая может быть обусловлена наличием в них плазминогена.

– впервые показано, что в процессе консервации эритроцитов в выделяющихся из них микровезикулах увеличивается антитромбиновая и снижается фибринолитическая активность.

– впервые установлено, что микровезикулы, выделенные из отмытых эритроцитов, снижают спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию тромбоцитов, а выделенные из неотмытых эритроцитов – усиливают агрегацию тромбоцитов и индуцируют процесс фибринообразования.

– впервые установлено, что в острые периоды ожоговой болезни значительно усиливается микровезикуляция эритроцитов, увеличивается их прокоагулянтная и снижается антитромбиновая и фибринолитическая активность.

Теоретическая и практическая значимость

– выдвигается гипотеза о том, что эритроцитарные микровезикулы могут способствовать процессу локального тромбообразования, а наличие у них антитромбиновой и фибринолитической активности предотвращает генерализацию этого процесса.

– показано, что при патологических состояниях не только может усиливаться микровезикуляция эритроцитов, но и изменяются их гемостазиологические свойства.

– установлено, что эритроцитарные микровезикулы, выделенные из неотмытых эритроцитов, могут не только увеличивать агрегацию тромбоцитов, но и усиливать фибринообразование.

– полученные данные могут иметь важное значение в трансфузиологии: значительное увеличение антитромбиновой активности в микровезикулах, высвобождаемых эритроцитами в процессе консервации, позволяет в определенной степени объяснить причину относительно небольшого количества посттрансфузионных осложнений неиммунного генеза после переливания консервированной эритроцитарной массы длительных сроков консервации.

– полученные результаты исследования могут быть использованы при чтении соответствующих разделов физиологии и патофизиологии в вузах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эритроцитарные микровезикулы обладают не только выраженной прокоагулянтной, но и антитромбиновой, фибринолитической, антиагрегационной активностью.

2. В процессе консервации эритроцитов происходит усиление микровезикуляции, снижение электрофоретической подвижности и

деформируемости красных клеток крови. В выделяемых из эритроцитов микровезикулах в процессе консервации происходит снижение фибринолитической и увеличение антитромбиновой активности, а также увеличивается содержание HbA_{1c} .

3. В ранний период ожоговой болезни происходит увеличение электрофоретической подвижности эритроцитов, а также увеличение концентрации HbA_{1c} , что может являться причиной ухудшения деформируемости эритроцитов. Кроме того, при ожоговой болезни, усиливается микровезикуляция эритроцитов, а в высвобождаемых из них микровезикулах снижается фибринолитическая и антитромбиновая активности.

Апробация результатов работы

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на VI и VII Всероссийской конференции “Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии” (с международным участием) (Москва, 2013, 2015); IX и X международной конференции “Гемореология и микроциркуляция” (Ярославль, 2013, 2015); XVII и XVIII Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2012, 2013); VI Всероссийской с международным участием школе-конференция по физиологии кровообращения (Москва, 2016); XVII Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2013); Всероссийской научно-практической конференции “Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии” (Санкт-Петербург, 2014); Форуме молодых ученых ННГУ им. Н.И. Лобачевского (Нижний Новгород, 2013); 65 ежегодной областной студенческой конференции биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского “Биосистемы: организация, поведение, управление”, автор награждена дипломом за лучший доклад по направлению “Физиология животных” (Нижний Новгород, 2012); 69 ежегодной областной студенческой конференции биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского “Биосистемы: организация, поведение, управление” (Нижний Новгород, 2016); Научно-практической конференции с международным участием «Современные аспекты лечения термической травмы» (Санкт-Петербург, 2016).

Автор является лауреатом стипендии им. академика Г.А. Разуваева за особые успехи в научной работе.

Первичная апробация работы проведена на заседании Ученого совета ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России от 26.04.2016 (протокол № 6).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 159 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы с изложением результатов

собственных исследований с их обсуждением, заключения, выводов и списка литературы. Библиографический указатель включает 253 источника: 18 отечественных и 235 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 11 рисунками и 30 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали 45 образцов крови больных с термическими ожогами II-III степени площадью более 20% поверхности тела, в ранний период ожоговой болезни (на 3-14 сутки после травмы) лечившихся в ожоговом отделении ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, из них мужчин – 31 и женщин 14 в возрасте от 18 до 65 лет, и 155 образцов крови 91 здорового донора, из них мужчин – 51 и женщин 40 в возрасте от 18 до 57 лет. Исследования были проведены на основе протоколов, одобренных локальным этическим комитетом ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, и после получения информированного согласия.

Кровь для исследования влияния МВ на гемостаз стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Затем путем дробного центрифугирования отделяли обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП), бестромбоцитарную плазму (БП), которую хранили при +4 °С, удаляли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку, а эритроцитарную массу (ЭМ) трижды отмывали физиологическим раствором. Далее в нее добавляли трис-НСl буфер (рН 7,4) в соотношении 1:1 и для выделения из них МВ инкубировали в течение 24 часов при +37 °С.

Для исследования влияния МВ, выделенных в процессе длительной консервации эритроцитов, на показатели системы свертывания крови, использовали кровь, стабилизированную раствором гемоконсерванта ЦФДА-1 в соотношении 4:1. Выделяли ЭМ, которую разделяли на 2 части. В первую часть (неотмытые эритроциты) добавляли гемоконсервант в соотношении 4:1 и хранили при +4 °С в течение 28 суток. Вторую часть ЭМ трижды отмывали физиологическим раствором. Затем в нее также добавляли гемоконсервант (4:1) и хранили в тех же условиях (отмытые эритроциты).

К консервированным в течение суток, 7, 14, 21 и 28 дней эритроцитам добавляли 1 мл трис-НСl буфера (рН 7,4), и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 минут, затем надосадочную жидкость очищали от клеточного дебриса путем центрифугирования в течение 15 минут при 5000g (Dey-Hazra E. et al., 2010). Далее МВ осаждали с помощью ультрацентрифугирования на центрифуге Sorvall MX 150 Micro-Ultracentrifuge (Thermo Scientific, США) при 100000g в течение 60 минут (Chung S. M. et al., 2007). Число МВ определяли на проточном цитофлюориметре Navios/Gallios (Beckman Coulter, США) и стандартизовали их количество в пробах.

Методы оценки влияния эритроцитарных микровезикул на гемостаз

Определение АЧТВ проводили согласно инструкции к набору АПТВ(АЧТВ)-Тест («Технология Стандарт», Россия) на коагулометре Coagulometer BC1 («Sticker Elektronik», Германия).

Определение протромбинового времени свертывания плазмы проводили согласно инструкции к набору Техпластин-Тест («Технология Стандарт», Россия) на коагулометре.

Определение тромбинового времени свертывания плазмы проводили согласно инструкции к набору Тромбо-Тест («Технология Стандарт», Россия) на коагулометре.

Определение времени рекальцификации плазмы крови проводили на коагулометре при добавлении к ней 100 мкл 0,025 М CaCl₂.

Характер процесса коагуляции БП исследовали на тромбоэластографе TEG 5000 (Haemoscope, США), согласно описанному в инструкции методу.

Во всех описанных выше методах в качестве контроля использовали смесь БП и трис-НСl буфера (рН 7,4) в соотношении 1:1, а в качестве опыта – смесь БП и МВ в соотношении 1:1.

Определение антитромбиновой активности эМВ и эритроцитов, проводили клотинговым методом по U. Abildgaard (1984), Реаклот-АТIII (НПО «Ренам», Россия).

Оценивали также влияние МВ и эритроцитов на время образования фибринового сгустка в отсутствии гепарина (Реаклот-АТIII (НПО «Ренам», Россия)). При этом вместо имидазолового буфера, содержащего гепарин, добавляли трис-НСl буфер. Смесь, содержащую суспензию МВ или эритроцитов и тромбин, до добавления раствора фибриногена инкубировали в течение 2 часов при +25 °С. После этого добавляли раствор фибриногена и определяли время фибринообразования.

При исследовании антитромбиновой активности регистрировали время с момента добавления фибриногена до образования сгустка при +37 °С на коагулометре. В контроле, вместо суспензии МВ или эритроцитов, использовали трис-НСl буфер.

Определяли антитромбиновую активность оптическим методом согласно инструкции к набору реактивов Реахром-АТIII (НПО «Ренам», Россия) на спектрофотометре Spekol UV VIS (Zeiss, Германия).

Как и в клотинговом методе антитромбиновую активность определяли в присутствии гепарина и без него.

Методы оценки влияния эритроцитарных микровезикул на фибринолиз

Влияние МВ на фибринолитическую активность донорской БП (ХПа-зависимый фибринолиз и фибринолиз индуцированный стрептокиназой)

определяли согласно инструкции к набору Фибринолиз-Тест («Технология Стандарт», Россия) на коагулометре. При этом эуглобулины выделяли согласно инструкции, но вместо цельной плазмы использовалась смесь БП и трис-НСI буфера (рН 7,4) в соотношении 1:1. В опыте вместо трис-НСI буфера к плазме добавляли МВ, ресуспендированные в трис-НСI буфере.

Кроме того, определяли влияние эМВ на хромогенный субстрат оптическим способом согласно инструкции, к набору ХромоТех-Плазминоген («Технология Стандарт», Россия) на спектрофотометре.

Исследовали фибринолитическую активность эМВ без добавления БП, индуцированную стрептокиназой, с помощью набора Фибринолиз-Тест («Технология Стандарт», Россия). Эуглобулины выделяли согласно инструкции, но вместо плазмы использовали суспензию МВ, в которую добавляли 100 мкл фибриногена с концентрацией 1 мг/мл («Технология Стандарт», Россия). Регистрировали время с момента добавления стрептокиназы и тромбина до полного растворения сгустка при +37 °С на коагулометре. Определяли время лизиса сгустка в опыте (с МВ) и в контроле (без МВ).

Определение наличия в МВ активаторов плазминогена проводили клотинговым методом. При этом эуглобулины получали описанным выше способом. К раствору эуглобулинов добавляли 100 мкл (1 μ М) плазминогена (Sigma, США) и 100 мкл тромбина (50 ед. НИ/мл) («Технология Стандарт», Россия). Регистрировали время с момента добавления этих компонентов до полного растворения сгустка при +37 °С на коагулометре. Определяли время лизиса сгустка в опыте (с МВ) и в контроле (без МВ).

Фибринолитическую активность самих МВ, определяли оптическим методом согласно инструкции к набору ХромоТех-Плазминоген («Технология Стандарт», Россия) с помощью хромогенного субстрата и стрептокиназы. При этом вместо БП использовали суспензию МВ, приготовленных описанным выше способом. В контроле вместо МВ использовали 250 мкл трис-НСI буфера.

Для исключения влияния гемоглобина (Hb) МВ на результаты спектрофотометрии проводили уравнивание опорного значения смесью МВ с буфером, хромогенным субстратом и уксусной кислотой.

Наличие в эМВ активаторов фибринолиза определяли описанным выше способом с помощью хромогенного субстрата и плазминогена, вместо стрептокиназы.

Методы оценки количества гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) в эритроцитах, их мембранах и МВ

Количество HbA_{1c} в эритроцитах, их мембранах и МВ определяли с помощью набора «Гликогемотест» («ЭЛТА», Россия) согласно инструкции.

Количество Hb в эритроцитах, мембранах и МВ определяли Гемихромным методом.

Методы оценки морфологии, деформируемости и электрофоретической подвижности эритроцитов

Деформируемость эритроцитов определяли с помощью ригидометра (Г.Я. Левин и соавт., авторское свидетельство №1363065). Принцип действия его заключался в следующем: суспензия эритроцитов помещалась между двумя коаксиальными цилиндрами, создавался ламинарный поток, в котором эритроциты деформировались (вытягивались) и фиксировались в этом положении с помощью 0,5 % раствора глутаральдегида (Г.Я. Левин и соавт., авторское свидетельство №1377111). В поле зрения светового микроскопа подсчитывали количество деформированных (вытянутых) и недеформированных эритроцитов (при сравнении размеров полуосей эритроцита их соотношение было менее, чем в 1,5 раза). По степени деформируемости различали 1 степень (средне – незначительно вытянутые клетки, при сравнении размеров полуосей эритроцита их соотношение было от 1,5 – 2,5 раз), 2 степень (резко вытянутые клетки, при сравнении размеров полуосей эритроцита их соотношение было более, чем в 2,5 раза). Степень деформируемости эритроцитов выражали в процентах от общего числа подсчитанных клеток.

Для оценки морфологии эритроцитов в поле зрения светового микроскопа (Zeiss, Германия) подсчитывали 100 клеток и затем вычисляли процент дискоцитов, эхиноцитов, стоматоцитов, сфероцитов.

Измерение электрофоретической подвижности эритроцитов проводили методом микроэлектрофореза (Харамоненко С. С., Ракитянская А. А., 1974).

Метод исследования влияния эритроцитарных микровезикул на спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию тромбоцитов

Спонтанную агрегацию тромбоцитов исследовали на реоскопе, сконструированном по принципу Н. Schmid-Schönbein et al. (1973) в модификации Г.Я. Левина и соавт. (патент № 2278381). Агрегацию тромбоцитов изучали в условиях сдвигового потока (скорость сдвига 60c^{-1} – 160c^{-1}) с видеозаписью процесса агрегации, последующей компьютерной обработкой полученных микрофотоснимков и определением интегральной оптической плотности каждого объекта и всех объектов кадра в целом. Оценивали: степень агрегации – по суммарной максимальной интегральной оптической плотности тромбоцитарных агрегатов Ма (усл. ед.), скорость агрегации – по суммарной максимальной интегральной оптической плотности тромбоцитарных агрегатов через 180 с, после начала процесса агрегации A_{180} (усл. ед.).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы STATISTICA 6.0. Проверку выборочного

распределения проводили с помощью теста Шапиро–Уилка. Достоверность различий определяли с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни, Вилкоксона, Фридмена, Краскелла-Уолиса, Ньюмана-Кейлса.

За уровень статистически значимых принимали изменения при $p < 0,05$ и $p < 0,001$. Гипотеза о взаимосвязи данных проверялась по коэффициентам ранговой корреляции Спирмена. Данные в таблицах и тексте представлены как $M \pm \sigma$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали проведенные исследования, МВ, выделенные после 24-часовой инкубации эритроцитов, оказывали влияние прежде всего на показатель «R» тромбоэластограммы (ТЭГ). Он соответствует фазе инициации, результатом которой является образование протромбиназы (табл. 1). Эти результаты согласуются с данными, полученными при исследовании АЧТВ. Ускорение коагуляции плазмы под действием эМВ при этом может быть связано с тем, что имеющиеся на их мембранах фосфотидилсериновые кластеры предоставляют дополнительную каталитическую поверхность для внутренней и внешней теназы и протромбиназного комплекса (Sinauridze E. I. et al., 2007; Rubin O. et al., 2010).

Таблица 1– Влияние эМВ на показатели тромбоэластограммы

Параметры измерения ТЭГ	Контроль n=14	Опыт n=14
R, мин	8,7±1,9	5,8±0,8*
K, мин	4,1±0,6	4,4±0,8
α, градусы	60,1±3,2	66,2±1,8*
МА, мм	35,5±2,5	34,8±2,9

Примечания: *– $p < 0,05$ в сравнении с контролем, критерий Вилкоксона.

Известно, что параметры «K» и «α» ТЭГ отражают конечный этап свертывания крови. Как показали проведенные исследования, влияние эМВ на эти параметры было разнонаправленным (табл. 1). Можно предположить, что эМВ могут с одной стороны замедлять скорость генерации тромбина, а с другой – ускорять процесс образования нитей фибрина. Это в свою очередь может быть обусловлено влиянием эМВ или на антитромбиновую активность или на полимеризацию фибрин-мономеров.

Для дополнительной оценки влияния эМВ на гемостаз проводили исследование конечного этапа свертывания плазмы крови на коагулометре. Установлено, что эМВ обладают не только про-, но и антикоагулянтными свойствами. Это положение основывалось на полученных нами данных о

том, что ЭМВ, выделенные после 24-инкубации эритроцитов, не только не сокращали, но даже замедляли тромбиновое время на 11% ($p < 0,05$).

С целью выявления возможного действия ЭМВ на процесс полимеризации фибрин-мономеров было проведено исследование влияния ЭМВ на этот процесс. По нашим данным статистически значимой разницы между контролем (трис-НСI буфер) и опытом (суспензия ЭМВ) не выявлено. Это подтверждает выдвинутую гипотезу о том, что замедление конечного этапа коагуляции под действием ЭМВ, по-видимому, связано с наличием в них антитромбиновой активности.

В связи с важнейшей ролью тромбоцитов в процессе гемостаза мы сочли целесообразным провести исследование влияния ЭМВ на их агрегационную способность. При этом мы исследовали спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию тромбоцитов, максимально приближенную к условиям *in vivo*.

Как показали проведенные исследования, МВ, выделенные после 24-часовой инкубации эритроцитов, в значительной степени угнетали спонтанную агрегацию тромбоцитов (рис. 1).

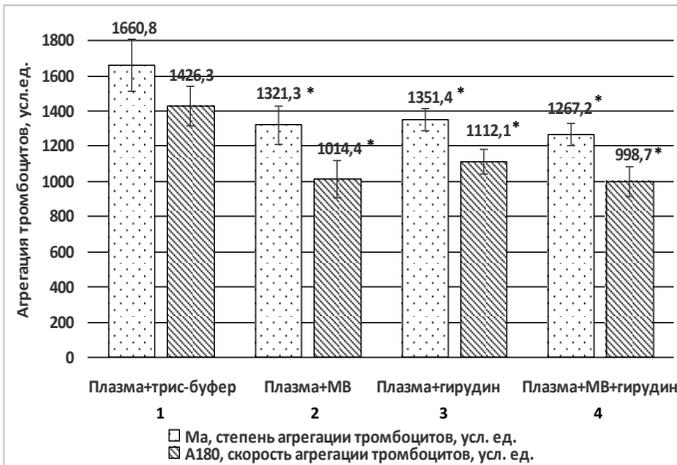


Рисунок 1 – Влияние ЭМВ на спонтанную агрегацию тромбоцитов в присутствии гирудина и без него. **Обозначения:** $p < 0,05$, сравнение групп, критерий Фридмана; * – $p < 0,05$, сравнение групп 1 и 2, 1 и 3, 1 и 4, критерий Ньюмана-Кейлса.

Можно предположить, что в условиях сдвигового потока, без экзогенных индукторов агрегации, агрегация тромбоцитов связана, главным образом, с присутствием наномолярных концентраций тромбина, а снижение агрегации под действием ЭМВ связано с их антитромбиновой активностью.

Для проверки этой гипотезы к ОТП мы добавляли антитромбин (гирудин). При этом мы провели исследование влияния гирудина, а также совместно гирудина и МВ на спонтанную агрегацию тромбоцитов. Как показали проведенные исследования, при добавлении к ОТП гирудина степень и скорость агрегации снижалась. При совместном действии гирудина и МВ снижение агрегации усиливалось, хотя и весьма незначительно (рис. 1). Это свидетельствует о том, что антиагрегационный эффект эМВ связан, главным образом, с их антитромбиновым действием.

В связи с тем, что, образование эМВ может иметь важное значение в трансфузиологии, мы исследовали изменение гемокоагуляционных свойств МВ, выделяемых в процессе консервации эритроцитов. Для того, чтобы оценить прочность связи факторов свертывания крови с эМВ, а также возможность их экспрессии на мембранах МВ, мы хранили эритроциты двух видов – предварительно отмытых и неотмытых, в условиях банка крови (при +4 °С).

Как показали проведенные исследования, эМВ, выделенные как из отмытых, так и из неотмытых эритроцитов к 28 суткам инкубации сокращали АЧТВ на 11% ($p < 0,05$) и 18% ($p < 0,05$) соответственно, причем их действие в процессе консервации усиливалось. Одной из возможных причин гиперкоагуляционного действия эМВ может являться не только наличие фосфотидилсерина (ФС) на мембране МВ, но и генерация тромбина, происходящая на поверхности МВ, выделенных из неотмытых эритроцитов (Sweeney J. et al., 2009).

При исследовании конечного этапа свертывания крови было установлено, что МВ, выделенные из отмытых и из неотмытых эритроцитов во все сроки консервации, замедляли тромбиновое время плазмы крови ($p < 0,05$). Установлено, что к концу срока консервации под влиянием МВ, выделенных из отмытых эритроцитов, тромбиновое время свертывания плазмы удлинялось на 78% ($p < 0,05$), а под влиянием МВ, выделенных из неотмытых эритроцитов, – на 70% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Объяснением этих данных могут служить полученные нами результаты исследования антитромбиновой активности эМВ.

Для ее оценки мы использовали клотинговый и оптический методы. При этом изучали антитромбиновую активность в эМВ, как стимулированную гепарином, так и наличие гепарин-независимой антитромбиновой активности. Известно, что гепарин ускоряет действие антитромбина, как и кофактора гепарина II. При отсутствии активации гепарином медленно прогрессирующее подавление тромбиновой активности проявляет антитромбин и $\alpha 2$ -макроглобулин. Установлено, что МВ обладают как быстро-, так и медленно-прогрессирующим антитромбиновым действием, которое усиливается в процессе консервации красных клеток крови (табл. 2,3).

Таблица 2 – Антитромбиновая активность в эритроцитах и МВ по U. Abildgaard с добавлением гепарина

Время консервации, сут	МВ из неотмытых эритроцитов, с n=12	Неотмытые эритроциты, с n=12	МВ из отмытых эритроцитов, с n=12	Отмытые эритроциты, с n=12
	1	2	3	4
0 (контроль)	17,7±0,2	17,7±0,2	17,7±0,2	17,7±0,2
1	18,0±0,2	18,8±0,2*	19,6±0,2* ^o	18,5±0,2
7	18,9±0,3*	19,2±0,2*	20,9±0,4* ^o	18,8±0,2*
14	21,4±0,6*	19,4±0,3*	22,0±0,3*	19,2±0,5*
21	22,7±0,5*	19,7±0,3*	26,7±0,4* ^o	20,6±0,4* ^o
28	24,8±0,5*	20,3±0,2*	31,1±0,4* ^o	22,4±0,3* ^o

Примечания: $p < 0,05$, сравнение внутри групп, критерий Фридмана;

* – $p < 0,05$ в сравнении показателей 1, 7, 14, 21 и 28 суток с контролем, критерий Ньюмана-Кейлса; ^o – $p < 0,05$ в сравнении показателей 1, 7, 21 и 28 суток между группами 1 и 3, 2 и 4, критерий Манна-Уитни.

Таблица 3 – Антитромбиновая активность в эритроцитах и МВ по U. Abildgaard без добавления гепарина

Время консервации, сут	МВ из неотмытых эритроцитов, с n=12	Неотмытые эритроциты, с n=12	МВ из отмытых эритроцитов, с n=12	Отмытые эритроциты, с n=12
	1	2	3	4
0 (контроль)	16,8±0,2	16,8±0,2	16,8±0,2	16,8±0,2
1	22,3±0,2*	18,5±0,3*	22,5±0,2*	19,3±0,2* ^o
7	24,8±0,3*	19,1±0,2*	24,1±0,5*	20,5±0,3* ^o
14	25,6±0,2*	24,8±0,3*	25,6±0,8*	24,8±0,3*
21	30,3±0,3*	25,2±0,4*	29,6±0,5*	26,5±0,4* ^o
28	32,5±0,4*	25,3±0,3*	31,3±0,6*	27,4±0,3* ^o

Примечания: $p < 0,05$, сравнение внутри групп, критерий Фридмана;

* – $p < 0,05$ в сравнении показателей 1, 7, 14, 21 и 28 суток с контролем, критерий Ньюмана-Кейлса; ^o – $p < 0,05$ в сравнении показателей 1, 7, 21 и 28 суток между группами, 2 и 4, критерий Манна-Уитни.

Показано, что замедление образования сгустка фибрина более выражено при использовании МВ из отмытых эритроцитов, особенно поздних сроков консервации ($p < 0,05$), (табл. 2). При изучении действия на

скорость образования фибринового сгустка самих эритроцитов, из которых выделяли МВ, было установлено, что в этих же условиях красные клетки крови в процессе консервации замедляли время фибринообразования в значительно меньшей степени, чем выделенные из них МВ (табл. 2,3).

При исследовании антитромбиновой активности с помощью оптического метода были получены сходные результаты.

Более высокая антитромбиновая активность МВ, выделенных из отмытых эритроцитов, по-видимому, связана с тем, что при отмывании клетки крови повреждаются и процесс дальнейшего их «старения» в процессе консервации происходит быстрее и выраженнее. Поэтому на них экспонируется больше отрицательно заряженных фосфолипидов, с которыми связывается большее количество антитромбина.

Одной из причин более низкой антитромбиновой активности в МВ, выделяемых из неотмытых эритроцитов, может являться происходящая в них генерация тромбина (Salzer U. et al., 2008). При отмывании эритроцитов факторы, участвующие в этом процессе, вероятно, в значительной степени удаляются и тромбообразование может или замедляться, или совсем прекращаться.

Установлено, что в процессе консервации эритроцитов в выделяющихся из них МВ повышается антитромбиновая активность ($p < 0,05$) (табл. 2,3). Это может быть связано с тем, что по данным, полученным в опытах с хромогенным субстратом и клотинговым методом (без гепарина), такое же увеличение активности наблюдается и в самих эритроцитах. В процессе консервации нарушается асимметрия фосфолипидов и эритроциты приобретают дополнительный отрицательный заряд. Это может являться важной причиной увеличения количества антитромбина на мембране хранящихся эритроцитов, так как положительно заряженные участки антитромбина могут связываться с отрицательно заряженными фосфолипидами мембран (ФС) и, как следствие, с высвобождающимися из них МВ.

Таким образом, эМВ обладают антитромбиновой активностью, которая может быть связана с наличием антитромбина, кофактора гепарина II и $\alpha 2$ -макроглобулина на их мембранах. Было показано, что антитромбиновая активность МВ, полученных из эритроцитов, увеличивается в процессе их консервации. Это может иметь важное значение при гемотрансфузиях.

Для оценки роли МВ, выделяемых в процессе консервации эритроцитов, в гемостазе мы исследовали их участие не только в плазменном, но и в тромбоцитарном гемостазе.

Как показали проведенные исследования, МВ, выделенные из предварительно отмытых эритроцитов, снижали спонтанную агрегацию тромбоцитов ($p < 0,05$). Однако МВ, выделенные из хранящихся в

гемоконсерванте неотмытых эритроцитов, не только не уменьшали, но и в значительной степени усиливали спонтанную агрегацию тромбоцитов в ОТП ($p < 0,05$), (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние эМВ различных сроков консервации на спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию тромбоцитов

Время консервации, сут	МВ, выделенные из отмытых эритроцитов		МВ, выделенные из неотмытых эритроцитов	
	Ма, усл. ед.	A ₁₈₀ , усл. ед.	Ма, усл. ед.	A ₁₈₀ , усл. ед.
	1	2	3	4
0 (контроль)	1333,2± 82,2	885,0± 55,8	1333,2± 82,2	885,0± 55,8
14	1126,8± 62,4*	664,4± 54,0*	1283,9± 93,6	765,3± 49,2*
21	1068,6± 69,6*	630,2± 49,7*	1398,1± 79,6°	1054,4± 75,3*°
28	999,4± 53,3*	510,5± 40,1*	1705,1± 111,9*°	1263,1± 89,9*°

Примечания: $p < 0,05$, сравнение внутри групп 1–4, критерий Фридмана;

* – $p < 0,05$ в сравнении показателей 14, 21 и 28 суток с контролем, критерий Ньюмана-Кейлса; ° – $p < 0,05$ в сравнении показателей 21 и 28 суток между группами 1 и 3, 2 и 4, критерий Манна-Уитни.

При этом происходило образование не только тромбоцитарных агрегатов, но и нитей фибрина, что могло способствовать усилению агрегации тромбоцитов. В процессе хранения эритроцитов наблюдалось усиление фибринообразования под влиянием выделенных из них МВ.

Для того чтобы выяснить участвует ли в образовании фибрина фибриноген плазмы или фибриноген, связанный с мембранами МВ, аналогичные исследования проводили с использованием отмытых тромбоцитов, ресуспендированных в сыворотке крови, то есть при отсутствии плазменного фибриногена.

Установлено, что и в этом случае, МВ, выделенные из неотмытых эритроцитов, способствовали усилению агрегации тромбоцитов в искусственном сдвиговом потоке с образованием тяжей из нитей фибрина ($p < 0,05$), а МВ, выделенные из отмытых эритроцитов, снижали агрегацию тромбоцитов в ауто-сыворотке крови без фибринообразования ($p < 0,05$) (рис. 2).

Стоит отметить, что выраженность агрегации и количество нитей фибрина в сыворотке, в 12 исследованиях из 13, визуально были выше, чем в плазме крови.

На основании полученных данных можно заключить, что в образовании нитей фибрина в искусственном сдвиговом потоке более

важную роль играет фибриноген, связанный с мембраной МВ, а не содержащийся в плазме.

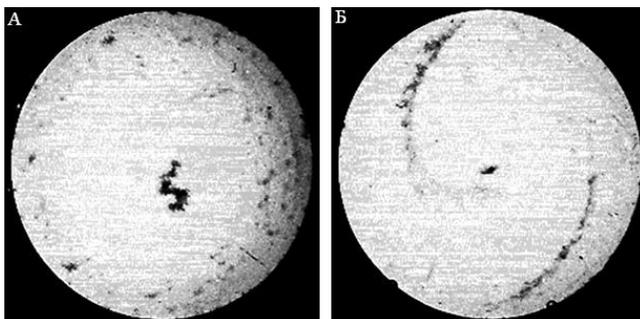


Рисунок 2 – Влияние эМВ на спонтанную агрегацию тромбоцитов в сыворотке крови. **Обозначения:** А – агрегация тромбоцитов в сыворотке крови при добавлении МВ из предварительно отмытых эритроцитов. Б – агрегация тромбоцитов в сыворотке крови при добавлении МВ из неотмытых эритроцитов.

Можно полагать, что в условиях образования МВ из неотмытых эритроцитов с отрицательно заряженными мембранами МВ может связываться не только фибриноген, но и факторы, участвующие в генерации тромбина (Va и Xa), что и приводит к образованию нитей фибрина в искусственном сдвиговом потоке. Для оценки наличия этих факторов на мембране МВ были проведены исследования спонтанной агрегации тромбоцитов с использованием МВ и образцов плазмы, не содержащих этих факторов. Установлено, что при добавлении МВ, выделенных из неотмытых эритроцитов, к ОТП, не содержащей V или X факторов, происходила не только агрегация тромбоцитов, но и образование нитей фибрина. При этом при использовании МВ, выделенных из отмытых эритроцитов, агрегация тромбоцитов происходила без образования нитей фибрина. Согласно полученным нами данным, МВ, выделенные из неотмытых эритроцитов, вероятнее всего, содержат X и V факторы, что может приводить в условиях искусственного сдвигового потока к активации этих факторов, генерации тромбина и к образованию нитей фибрина из фибриногена, присутствующего на мембранах МВ. При этом МВ, выделенные из отмытых эритроцитов, этих факторов не содержали, так как, вероятно, в процессе неоднократного отмывания эти факторы могут в значительной степени удаляться.

Показано, что агрегация тромбоцитов под влиянием МВ, выделенных из неотмытых эритроцитов, усиливалась в процессе их консервации ($p < 0,05$). Одной из возможных причин является, вероятно, и значительное

снижение фибринолитической активности МВ, выделяемых в процессе консервации эритроцитов.

Для оценки изменения ее в процессе консервации эритроцитов были проведены исследования с использованием клоттингового и оптического методов. Показано, что эМВ значительно ускоряют время лизиса эуглобулинового сгустка донорской плазмы и увеличивают количество продуктов расщепления хромогенного субстрата, то есть они обладают достаточно высокой фибринолитической активностью (табл. 5, 6).

Таблица 5 – Влияние эМВ на время лизиса эуглобулинового сгустка в тесте на ХПа-зависимый фибринолиз

Время консервации, сут	МВ из отмытых эритроцитов, с n=12	МВ из неотмытых эритроцитов, с n=12
0 (контроль)	551±5,2	551±5,2
1	183±4,2*	387±4,4*°
7	200±3,8*	400±3,6*°
14	228±4,9*	426±5,2*°
21	249±3,3*	451±5,8*°
28	283±5,1*	472±2,9*°

Примечания: p<0,05, сравнение внутри групп, критерий Фридмана; * – p<0,05 в сравнении показателей 1, 7, 14, 21 и 28 суток с контролем, критерий Ньюмана-Кейлса; ° – p<0,05 в сравнении показателей 1, 7, 14, 21 и 28 суток между группами, критерий Вилкоксона.

Таблица 6 – Изменение количества продуктов расщепления хромогенного субстрата под влиянием эМВ

Время консервации, сут	МВ из отмытых эритроцитов, Е n=12	МВ из неотмытых эритроцитов, Е n=12
1	0,0143±0,0012	0,0177±0,0015°
7	0,0421±0,0018*	0,0916±0,0029*°
14	0,0473±0,0022*	0,1002±0,0025*°
21	0,0722±0,0031*	0,1163±0,0038*°
28	0,1047±0,0021*	0,1757±0,0033*°

Примечания: p<0,05, сравнение внутри групп, критерий Фридмана; * – p<0,05 в сравнении показателей 7, 14, 21 и 28 суток с результатами полученными после первых суток консервации, критерий Ньюмана-Кейлса; ° – p<0,05 в сравнении показателей 1, 7, 14, 21 и 28 суток между группами, критерий Вилкоксона.

При этом фибринолитическая активность МВ, выделенных из отмытых эритроцитов, была почти в 2 раза выше, чем полученных из неотмытых красных клеток крови во все сроки консервации ($p < 0,05$). В процессе хранения фибринолитическая активность МВ, выделенных как из отмытых, так и из неотмытых эритроцитов, уменьшалась, о чем свидетельствует прогрессивное замедление лизиса эуглобулинового сгустка (табл. 5). Однако в опытах с использованием хромогенного субстрата показано, что количество продуктов его расщепления нарастает под действием МВ, полученных в процессе консервации эритроцитов (табл. 6).

Причина различия действия эМВ на фибриновый сгусток и на хромогенный субстрат может быть связана с разницей в действии Глу-плазминогена, который способен катализировать лишь хромогенные субстраты, но не фибринолиз и Лиз-плазминогена (Зубаиров Д. М., 2000). Можно предполагать, что в процессе консервации эритроцитов содержание в МВ Глу-плазминогена увеличивается, а Лиз-плазминогена, соответственно, снижается. Эти изменения могут быть связаны, в частности, с большей продолжительностью жизни Глу-плазминогена (Binder В. R., 1995). Вероятнее всего, плазминоген в Глу-форме и переходит в МВ.

В связи с тем, что присутствие донорской плазмы не давало возможности оценить, с чем связана фибринолитическая активность МВ, с наличием в них проактиваторов, активаторов или самого плазминогена, проводились исследования, в которых донорская плазма не использовалась ни в оптическом, ни в клотинговом методах.

При добавлении стрептокиназы и хромогенного субстрата к суспензии МВ, полученным в результате консервации неотмытых эритроцитов в течение 7 дней, появлялись продукты расщепления хромогенного субстрата. Это может свидетельствовать о наличии плазминогена и/или его активаторов в эМВ. Для выявления присутствия активаторов плазминогена на эМВ, были проведены исследования фибринолитической активности оптическим методом, но в котором вместо стрептокиназы в инкубационную смесь добавляли плазминоген. Установлено, что добавление эМВ к раствору плазминогена и хромогенного субстрата не приводило к появлению продуктов расщепления хромогенного субстрата. Это может свидетельствовать об отсутствии в эМВ активаторов плазминогена. Можно заключить, что МВ, выделенные в результате консервации эритроцитов, обладают фибринолитической активностью, которая, вероятнее всего, связана с наличием в них плазминогена.

Таким образом, нами установлено, что эМВ обладают не только прокоагулянтными свойствами, но и антитромбиновой и фибринолитической активностью. В процессе консервации эритроцитов

гемокоагуляционные свойства выделяющихся из них МВ изменяются – усиливается антитромбиновая активность, снижается фибринолитическая и в меньшей степени увеличивается прокоагулянтная активность. Усиливается и сам процесс микровезикуляции эритроцитов. Нами показано, что количество МВ, выделенных из отмытых эритроцитов на 7 сутки консервации в 2,7 раза превышало их количество, по сравнению с первыми сутками консервации ($p<0,05$), а количества МВ, выделенных из неотмытых эритроцитов – в 2 раза ($p<0,05$).

Эти данные дают основания полагать, что переливание консервированных эритроцитов может вызывать меньшее количество тромботических осложнений, которые могут быть приняты во внимание, учитывая только прокоагулянтную активность эритроцитов и выделенных из них МВ. Эффект гиперкоагуляции в определенной степени может нивелироваться в связи с наличием антитромбиновой активности не только в самих эритроцитах, но и, в первую очередь, в выделяющихся из них МВ.

Одним из проявлений изменения эритроцитов в процессе консервации является ухудшение их деформируемости (Cluitmans J. C. et al., 2012; Frank S. M. et al., 2013). В связи с существенной ролью Hb, особенно HbA_{1c}, в деформируемости эритроцитов (Cluitmans J. C. et al., 2012), проводили изучение его концентрации в эритроцитах.

По результатам проведенных исследований установлено, что доля HbA_{1c} по отношению к общему Hb в эритроцитах, выраженная в процентах, к 28 суткам хранения увеличивалась как в неотмытых (примерно в 1,5 раза ($p<0,05$)), так и в отмытых эритроцитах (в 2 раза ($p<0,05$)).

Кроме того, исследовали содержание HbA_{1c} непосредственно в самих мембранах эритроцитов. Установлено, что оно также нарастало в процессе консервации. Увеличение концентрации HbA_{1c} в мембранах неотмытых эритроцитов происходило в большей степени, чем в мембранах отмытых эритроцитов ($p<0,05$) (содержание HbA_{1c} в мембранах отмытых эритроцитов нарастало с $6,15\pm 0,14$ до $9,97\pm 0,23$ ($p<0,05$), а в мембранах неотмытых эритроцитов – с $6,15\pm 0,14$ до $11,16\pm 0,21$ ($p<0,05$)).

Было изучено содержание HbA_{1c} и в эМВ. Выявлено, что концентрация HbA_{1c} нарастала в МВ, выделенных в процессе консервации эритроцитов ($p<0,05$). При этом установлено, что степень нарастания HbA_{1c}, выраженная в г/л, выше в МВ, выделенных из отмытых эритроцитов ($p<0,05$). Это и является по-видимому, основной причиной того, что именно в мембранах отмытых эритроцитов содержится меньшее количество HbA_{1c}, – он переходит на МВ, число которых больше, чем выделяется из неотмытых эритроцитов ($p<0,05$).

В связи с важной ролью концентрации Hb, а особенно HbA_{1c} в ригидности эритроцитов, мы исследовали динамику их деформируемости в

процессе консервации отмытых и неотмытых красных клеток крови. Как показали проведенные исследования, деформируемость эритроцитов снижалась уже к 7 суткам консервации, причем более значительно у предварительно отмытых красных клеток крови ($p < 0,05$), (табл. 7, рис. 3).

Таблица 7 – Изменение деформируемости эритроцитов в процессе их консервации

Время консервации, сут	Отмытые эритроциты			Неотмытые эритроциты		
	Д 2 ст., %	Д 1 ст., %	Н, %	Д 2 ст., %	Д 1 ст., %	Н, %
	1	2	3	4	5	6
0 (контроль)	41±5,4	38±3,2	21±3,2	41±5,4	38±3,1	21±3,2
7	22±1,1*	33±4,1	45±4,1*	35±4,3°	29±2,3*	36±3,4*°
14	20±3,2*	33±3,5	47±3,4*	33±4,4°	30±2,1*	37±4,2*°
21	9±1,3*	20±5,3*	71±5,3*	19±2,1*°	34±2,5°	47±2,1*°
28	8±2,4*	21±1,1*	71±2,1*	9±1,2*	24±3,4*	67±4,3*

Примечания: $p < 0,05$, сравнение внутри групп 1–6, критерий Фридмана;

*– $p < 0,05$ в сравнении показателей 7, 14, 21 и 28 суток с контролем, критерий Ньюмана-Кейлса; °– $p < 0,05$ в сравнении показателей 7, 14 и 21 суток между группами 1 и 4, 2 и 5, 3 и 6, критерий Манна-Уитни.

Д-деформированные, Н-недеформированные.

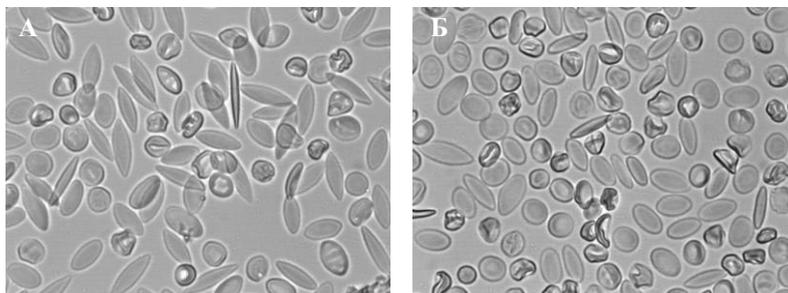


Рисунок 3 – Изменение деформируемости эритроцитов в процессе консервации. **Обозначения:** А – Деформируемость свежесывающихся эритроцитов. Б – Деформируемость отмытых эритроцитов на 28 сутки хранения.

Нами установлена высокая корреляционная взаимосвязь между изменением деформируемости эритроцитов и содержанием HbA_{1c} , как в самих эритроцитах, так и в их мембранах. В процессе консервации красных клеток крови сильная корреляционная связь выявлена между деформируемостью эритроцитов в процессе консервации и изменением концентрации HbA_{1c} как в самих эритроцитах, так и в мембранах отмытых эритроцитов – $r = -0,95$ ($p < 0,05$). Чуть меньший коэффициент корреляции выявлен между этими показателями в неотмытых эритроцитах ($r = -0,87$, $p < 0,05$). Таким образом, показана четкая взаимосвязь между гликированием Hb в процессе консервации эритроцитов и ухудшением деформируемости красных клеток крови.

Известно, что в процессе консервации эритроцитов происходит накопление МВ, несущих на себе отрицательный заряд (Salzer U. et al., 2008). Можно предположить, что это приводит к снижению отрицательного заряда мембраны самих эритроцитов. Для проверки этой гипотезы проведены исследования электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) в процессе их консервации.

Как показали проведенные исследования, ЭФПЭ значительно снижалась уже к 7 суткам консервации, приблизительно в 2 раза ($p < 0,05$), причем более значительно в предварительно отмытых эритроцитах, хранящихся в консерванте. В дальнейшем ЭФПЭ, несмотря на некоторые колебания динамики, оставалась на низком уровне.

При исследовании изменения морфологии эритроцитов установлено, что в процессе консервации прогрессивно уменьшалось количество дискоцитов, нарастало число сфероцитов, эхиноцитов и стоматоцитов, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При небольших сроках консервации диск-сферическая трансформация эритроцитов была значительно более выражена в отмытых красных клетках крови ($p < 0,05$ в сравнении с неотмытыми красными клетками крови). В поздние сроки (к 21 суткам хранения), морфология отмытых и неотмытых эритроцитов практически сравнивалась.

Одной из причин снижения ЭФПЭ и диск-сферической трансформации эритроцитов может являться образование МВ в процессе консервации. Значительное увеличение микровезикуляции при хранении эритроцитов отмечено в ряде исследований (Lawrie A. S. et al., 2009; Rubin O. et al., 2010a).

Нами установлено, что количество МВ, выделенных из отмытых эритроцитов было больше, чем выделенных из неотмытых эритроцитов ($p < 0,05$), что и обуславливает, вероятнее всего, разницу в выраженности снижения ЭФПЭ и морфологических изменений этих эритроцитов.

Полученные нами данные об изменениях гемокоагуляционных свойств эМВ и выраженности микровезикуляции в процессе консервации

эритроцитов позволяют предположить, что такого рода изменения могут происходить и при целом ряде патологических состояний. Мы исследовали изменение гемокоагуляционных свойств эМВ на модели термической травмы. Эту модель мы использовали в связи с тем, что при ожоговой болезни возникает гиперкоагуляция (Simon T. L. et al., 1977; Lavrentieva A. et al., 2008) и ухудшаются реологические свойства крови (Levin G. Y., Egorihina M. N., 2010; Bekeyarova G. et al., 1996). Кроме того, известно, что при ожоговой болезни происходит нарушение функции печени (Andel H. et al., 2003; Nugent N. et al., 2004), основного органа, утилизирующего МВ. Это может провоцировать значительное увеличение их количества в крови. При ожоговой болезни часто проводят гемотрансфузии, что также может являться источником МВ. Данных, посвященных изменению количества и свойств эМВ при термической травме, в открытой литературе мы не встретили.

Как показали результаты исследований, при ожоговой болезни наблюдается значительное усиление микровезикуляции эритроцитов. После 24-часовой инкубации эритроцитов ожоговых больных количество МВ в 3,5 раза превышало количество МВ, высвобождаемых в тех же условиях эритроцитами здоровых доноров ($p < 0,05$).

При исследовании влияния МВ, выделенных из эритроцитов больных с термическими ожогами, на показатели ТЭГ установлено, что они в большей степени укорачивали параметр «R» ТЭГ (на 33%, $p < 0,05$) по сравнению с эМВ, полученными из крови здоровых доноров (на 14%, $p < 0,05$). Такая же тенденция выявлена при изучении действия эМВ на показатель «K» ТЭГ.

Одной из причин более значимого влияния ожоговых эМВ на показатели ТЭГ являлось, вероятнее всего, их большая концентрация. Для исключения влияния количественного фактора эМВ, были проведены исследования влияния стандартизованного и нестандартизованного числа эМВ на тромбиновое время. Как показали проведенные исследования, действие эМВ в стандартизованных пробах было менее выраженным, чем в нестандартизованных, однако принцип действия сохранился.

При исследовании конечного пути свертывания крови установлено, что эМВ, выделенные из крови ожоговых больных, не влияли на тромбиновое время как донорской плазмы, так и плазмы крови ожоговых больных, в отличие от эМВ из донорской крови. Это могло быть связано с тем, что с первых часов после тяжелой термической травмы в плазме крови больных существенно снижается антитромбиновая активность (Garcia-Avello A. et al., 1998). Нами установлено, что антитромбиновый эффект эМВ ожоговых больных также значительно снижен. Это подтверждено как клотинговым, так и оптическим методами исследования (табл. 8).

Таблица 8 – Антитромбиновая активность эритроцитов и эМВ по U. Abildgaard

	Кровь здоровых доноров			Кровь ожоговых больных		
	Конт роль	Микрове зикулы	Эритро циты	Конт роль	Микрове зикулы	Эритро циты
	1	2	3	4	5	6
Опыт с гепари ном, с	17,4± 0,36	23,8± 0,60*	20,1± 0,39*	17,7± 0,26	19,3± 0,31 ^{◊◊}	18,1± 0,62 [◊]
Опыт без гепари на, с	16,8± 0,38	28,4± 1,02*	24,1± 0,56*	16,8± 0,52	24,6± 0,61 ^{◊◊}	22,8± 0,54 ^{◊◊}

Примечания: $p < 0,05$, сравнение внутри групп 1-3 и 4-6, критерий Краскелла-Уолиса; * – $p < 0,05$ сравнение 1 и 2, 1 и 3; ◊ – $p < 0,05$ – сравнение 4 и 5, 4 и 6, критерий Ньюмана-Кейлса; ◊◊ - $p < 0,05$, сравнение 2 и 5, 3 и 6, критерий Манна-Уитни;

Показано также, что эритроциты ожоговых больных, обладали меньшей антитромбиновой активностью, по сравнению с эритроцитами здоровых доноров.

Снижение антитромбиновой активности в эМВ и в эритроцитах при ожоговой болезни может быть связано с рядом причин. Значительная гиперкоагуляция, сопровождающаяся тромбинемией приводит к снижению антитромбиновой активности в плазме крови, а отсюда – к уменьшению связывания антитромбинов на мембранах эритроцитов и на образующихся из них МВ. Определенную роль в снижении антитромбиновой активности при ожогах играет также часто проводимая гепаринотерапия.

Известно, что принципиально важную роль в гемокоагуляции играет агрегация тромбоцитов, обуславливающая первичный гемостаз. Ранее было показано, что после термической травмы резко повышается спонтанная (поток-индуцированная) агрегация тромбоцитов (Levin G. Y., Egorihina M. N., 2010). Однако, механизм гиперагрегации тромбоцитов после ожога остается мало изученным. Совершенно неисследованным является вопрос о возможной роли МВ, в частности, эритроцитарных, в развитии гиперагрегационного синдрома после термической травмы.

Показано, что эМВ в значительной степени угнетали спонтанную агрегацию тромбоцитов в ОТП как здоровых доноров, так и ожоговых больных ($p < 0,05$). Однако антиагрегационное действие МВ, выделенных из эритроцитов здоровых людей в ОТП ожоговых больных, было выше, чем эМВ ожоговых больных (в среднем на 6% (степень агрегации) и на 29% (скорость агрегации) ($p < 0,05$)).

Механизм антиагрегационного действия МВ может быть связан с инактивацией молекулы тромбина путем взаимодействия ее анионсвязывающих экзосайтов и фосфотидилсериновых кластеров, расположенных на мембране эМВ, а также с наличием антитромбинов на поверхности МВ. Вероятнее всего, именно сочетанием снижения антитромбиновой активности МВ, выделенных из эритроцитов ожоговых больных с тромбинемией, обусловлен меньший антиагрегационный эффект этих МВ.

Показано, что эМВ обладают достаточно высокой фибринолитической активностью. При этом фибринолитическая активность эМВ у ожоговых больных ниже (на 31%), чем в эМВ здоровых доноров ($p < 0,05$).

Действие МВ, выделяющихся из эритроцитов ожоговых больных, на хромогенный субстрат более выражено (на 20%), чем действие МВ из эритроцитов здоровых доноров ($p < 0,05$).

Это может быть связано с более высоким содержанием в эритроцитах ожоговых больных Глу-плазминогена и, соответственно, меньшим содержанием в них Лиз-плазминогена. Причиной этого может быть снижение t-РА. Имеются данные о том, что в ранний период после термической травмы избыточное содержание PAI-1 приводит к связыванию t-РА, который и переводит Глу-плазминоген в Лиз-плазминоген (Garcia-Avello A. et al., 1998).

Для оценки возможных причин увеличения концентрации эМВ в крови ожоговых больных проводили исследования ЭФПЭ и содержания в них и в выделяющихся из них МВ HbA_{1c}.

Как показали проведенные исследования, после 24-часовой инкубации красных клеток крови содержание HbA_{1c}, выраженное в % от общего Hb, в эритроцитах ожоговых больных и в выделяемых ими МВ, оказалось более высоким (на 42% и на 27%, соответственно), чем в эритроцитах здоровых доноров и в выделяемых ими МВ ($p < 0,05$).

Для оценки влияния гликирования Hb на изменение деформируемости эритроцитов, были проведены дополнительные исследования. Как показали результаты опытов *in vitro*, количество HbA_{1c} в эритроцитах после инкубации их с глюкозой (50 ммоль/л) в течение 24 часов увеличивалось и приближалось к значению HbA_{1c} в эритроцитах ожоговых больных ($p < 0,05$). Деформируемость эритроцитов при этом значительно снижалась ($p < 0,05$).

Как свидетельствуют литературные данные, при ожоговой болезни, особенно в ее ранний период, значительно ухудшается микроциркуляция, одной из причин рассматривают снижение деформируемости эритроцитов (Векуарова G. et al., 1996). Нами установлено, что в повышении ригидности эритроцитов после термической травмы важную роль играет увеличение содержания в эритроцитах HbA_{1c}.

Особо важное значение имеют полученные нами результаты, в которых выявлено увеличение HbA_{1c} , выраженного в г/л от общего Hb , в мембранах эритроцитов после термической травмы (на 74%, $p < 0,05$), что может обуславливать ухудшение эластических и вязкостных свойств мембран.

По результатам опытов *in vitro*, также отмечена достаточно высокая корреляционная зависимость между повышением концентрации HbA_{1c} в инкубированных в растворе глюкозы эритроцитах и снижением количества сильно вытянутых в искусственном сдвиговом потоке красных клеток крови ($r = -0,59$, $p < 0,05$), а также между степенью повышения концентрации HbA_{1c} и увеличением количества невытянутых (недеформированных) эритроцитов ($r = 0,51$, $p < 0,05$).

Можно предположить, что гликирование Hb не только само по себе вызывает ухудшение деформируемости эритроцитов, но и приводит к повышению их ригидности путем увеличения микровезикуляции красных клеток крови. О таком влиянии HbA_{1c} на процесс образования эМВ свидетельствуют исследования F.L. Willekens et al. (2005).

При изучении ЭФПЭ при ожоговой болезни установлено, что она была в 1,8 раза выше, чем ЭФПЭ здоровых доноров ($p < 0,05$). После 24 часовой инкубации эритроцитов ЭФП снижалась, однако при ожоговой болезни ее уровень оставался выше контроля ($p < 0,05$).

Можно полагать, что показанное в наших исследованиях значительное увеличение ЭФПЭ ожоговых больных связано с происходящим в их мембранах перераспределением фосфолипидов, которое и является одной из важных причин усиления микровезикуляции эритроцитов после термической травмы.

Таким образом, можно заключить, что одной из причин гиперкоагуляционного синдрома при ожоговой болезни является усиление процесса микровезикуляции, происходящего на фоне увеличения прокоагулянтной активности эМВ. В норме прокоагулянтная активность МВ компенсируется их антитромбиновой и фибринолитической активностью, однако при ожоговой болезни нарушается баланс между прокоагулянтной активностью эМВ и их антитромбиновой и фибринолитической активностью.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что эритроцитарные микровезикулы обладают не только прокоагулянтными, но и антикоагулянтными свойствами, связанными с наличием в них антитромбиновой активности. Полученные результаты дают основание полагать, что это связано с присутствием на мембранах эритроцитарных микровезикул антитромбина, кофактора гепарина II и $\alpha 2$ -макроглобулина.

2. Установлено, что эритроцитарные микровезикулы обладают фибринолитической активностью, которая может быть обусловлена наличием в них плазминогена. В процессе консервации эритроцитов фибринолитическая активность выделенных из них микровезикул снижается.

3. Установлено, что микровезикулы, выделенные из отмытых эритроцитов, способны снижать поток-индуцированную агрегацию тромбоцитов. При этом микровезикулы, выделенные из неотмытых эритроцитов, усиливают поток-индуцированную агрегацию тромбоцитов, что в значительной степени связано с активацией ими процесса фибринообразования.

4. Установлено, что в процессе консервации значительно снижается деформируемость эритроцитов и нарастает концентрация HbA_{1c} в эритроцитах, их мембранах и в высвобождаемых из них микровезикулах. Выявлена высокая корреляционная зависимость между этими процессами.

5. Показано, что в ранний период ожоговой болезни усиливается прокоагулянтная, снижается антитромбиновая и фибринолитическая активность эритроцитарных микровезикул. Кроме этого, значительно усиливается микровезикуляция эритроцитов, что может быть в определенной степени сопряжено с увеличением содержания в красных клетках крови HbA_{1c} .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень рекомендованных ВАК РФ изданий:

1. **Сухарева, Е. Г.**, Егорихина, М. Н., Левин, Г. Я. Влияние микровезикул эритроцитов на спонтанную агрегацию тромбоцитов // Ярославский педагогический вестник. – 2012. – Том III (Естественные науки), № 4. – С. 176–181.
2. Левин, Г. Я., **Сухарева, Е. Г.**, Егорихина, М. Н. Влияние эритроцитарных микровезикул на процесс коагуляции плазмы крови // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Том 156, № 7. – С. 41–44.
3. **Сухарева, Е. Г.**, Левин, Г. Я., Крылов В. Н. Влияние эритроцитарных микровезикул на показатели тромбоэластограммы // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2013. – № 4(1). – С. 135–138.
4. **Сухарева, Е. Г.**, Левин, Г. Я. Влияние микровезикул эритроцитов на конечный этап свертывания крови // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2014. – № 1(2). – С. 233–236.

5. **Сухарева, Е. Г.**, Левин, Г. Я. Влияние микровезикул консервированных эритроцитов на агрегацию тромбоцитов и фибринообразование в искусственном сдвиговом потоке // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2014. – № 4(60). – С. 55–58.
6. Левин, Г. Я., **Сухарева, Е. Г.** Связь деформируемости эритроцитов с гликированием гемоглобина и образованием микровезикул // Сибирский научный медицинский журнал. – 2015. – Том 35, № 2. – С. 37–42.
7. Левин, Г. Я., **Сухарева, Е. Г.** Изменение электрокинетических свойств эритроцитов при их консервации // Гематология и трансфузиология. – 2015. – Том 60, № 1. – С. 21–24.
8. Левин, Г. Я., **Сухарева, Е. Г.** Влияние эритроцитарных микровезикул на агрегацию тромбоцитов при ожоговой болезни // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – № 3. – С. 62–68.
9. Левин, Г. Я., **Сухарева, Е. Г.**, Егорихина М. Н. О роли микровезикуляции эритроцитов и гликирования гемоглобина в гемореологических нарушениях при ожоговой болезни // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – № 4. – С. 21–25.

Статьи в иностранных журналах:

1. Levin G. Ya., **Sukhareva E.G.** Antithrombin activity in microvesicles derived from stored red blood cells // Blood Transfusion. – 2015. – №13. – P. 688–689.
2. Levin G. Ya., **Sukhareva E.G.**, Lavrentieva A. Impact of microparticles derived from erythrocytes on fibrinolysis // Journal of thrombosis and thrombolysis. – 2016. № 41(3). – P. 452–458.
3. Levin G., **Sukhareva E.** The influence of thermal trauma on pro- and anticoagulant activity of erythrocyte-derived microvesicles // Burns. – 2016. DOI: 10.1016/j.burns.2016.04.013

Тезисы докладов на конференциях:

1. **Сухарева Е. Г.** Влияние эритроцитарных микровезикул на процесс коагуляции плазмы крови // Материалы 16 международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино. – 2012. – С.447–448.
2. **Сухарева Е. Г.**, Егорихина М. Н. Влияние эритроцитарных микровезикул на спонтанную агрегацию тромбоцитов // Материалы всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии», Пушкино. – 2012. – С.60–61.
3. **Сухарева Е. Г.** Влияние эритроцитарных микровезикул на гемостаз // Материалы 65 ежегодной областной студенческой конференции биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород. – 2012 – С.61–62.
4. **Сухарева Е. Г.**, Егорихина М. Н., Левин Г. Я. Влияние эритроцитарных микровезикул на спонтанную агрегацию тромбоцитов // Материалы II Международной научно-практической конференции студентов и молодых

ученых «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны», Пенза. – 2012. – С.168–170.

5. **Сухарева Е. Г.**, Егорихина М. Н., Левин Г. Я. Влияние микровезикул эритроцитов на поток-индуцированную агрегацию тромбоцитов // *Материалы II Международной научно-практической конференции «Современные проблемы отечественной медико-биологической и фармацевтической промышленности. Развитие инновационного и кадрового потенциала Пензенской области*, Пенза. – 2012. – С.550–553.

6. **Сухарева Е. Г.** Влияние микровезикул эритроцитов на спонтанную агрегацию тромбоцитов // *Материалы 17 Нижегородской сессии молодых ученых, Естественные науки, Арзамас.* – 2012. – С. 164–165.

7. **Сухарева Е. Г.**, Егорихина М. Н., Левин Г. Я. Влияние микровезикул эритроцитов на гемостаз // *Материалы VI Всероссийской конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» (с международным участием)*, Москва. – 2013. – С. 402–404.

8. **Сухарева Е. Г.** Влияние микровезикул эритроцитов на гемостаз // *Материалы 17 международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»*, Пущино. – 2013. – С.451–452.

9. **Сухарева Е. Г.**, Егорихина М. Н., Левин Г. Я. Участие микровезикул эритроцитов в регуляции гемостаза // *Материалы IX Международной конференции «Микроциркуляция и гемореология (От ангиогенеза до центрального кровообращения)*, Ярославль. – 2013. – С. 87.

10. **Сухарева Е. Г.** Влияние микровезикул эритроцитов на различные этапы процесса коагуляции // *Материалы 18 Нижегородской сессии молодых ученых, Естественные науки, Арзамас.* – 2013. – С. 144–145.

11. **Сухарева Е. Г.**, Левин Г. Я. Влияние эритроцитарных микровезикул на агрегацию отмытых и не отмытых тромбоцитов // *Материалы межрегионального научно-практического семинара «Наследственная и приобретенная патология свертывания крови – тромбозы и кровотечения: диагностика, профилактика, лечение, экономика»*, Саратов. – 2013. – С.64–66.

12. **Сухарева Е. Г.** Влияние микровезикул эритроцитов на конечный этап свертывания крови // *Материалы форума молодых ученых ННГУ им. Н.И. Лобачевского*, Нижний Новгород. – 2013. – С. 327–329.

13. **Сухарева Е. Г.**, Левин Г. Я. Влияние микровезикул эритроцитов на агрегацию тромбоцитов в норме и при ожоговой болезни // *Материалы IV съезда комбустиологов России*, Москва. – 2013. – С.80–82.

14. Левин Г. Я., **Сухарева Е. Г.**, Егорихина М. Н. Влияние способов выделения эритроцитарных микровезикул на их фибринолитическую активность // *Материалы X Международной конференции «Микроциркуляция и гемореология (От ангиогенеза до центрального кровообращения)*, Ярославль. – 2013. – С. 86.

15. **Сухарева Е. Г.**, Левин Г. Я. Антитромботическая активность эритроцитарных микровезикул // Материалы X Международной конференции «Микроциркуляция и гемореология (От ангиогенеза до центрального кровообращения)», Ярославль. – 2013. – С. 79.
16. **Сухарева Е. Г.**, Левин Г. Я. Влияние микровезикул, выделяемых эритроцитами в процессе хранения, на агрегацию тромбоцитов // Материалы всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», Санкт-Петербург. – 2014. – Вестник гематологии. – Т.Х, №2. – С. 122–123.
17. **Сухарева Е. Г.**, Левин Г. Я. Влияние консервации эритроцитов на фибринолитическую активность выделенных из них микровезикул // Материалы VII Всероссийской конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» (с международным участием), Москва. – 2015. – С.410–411.
18. **Сухарева Е. Г.**, Левин Г. Я. Эритроцитарные микровезикулы и агрегация тромбоцитов // Материалы VI всероссийской школы-конференции по физиологии кровообращения, Москва. – 2016 – С.150–151.
19. Путихина Ю.А., **Сухарева Е.Г.** Влияние эритроцитарных микровезикул на спонтанную агрегацию тромбоцитов // Материалы 69 ежегодной областной студенческой конференции биологического факультета ННГУ им.Н.И. Лобачевского «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород. – 2016. – С.118.
20. Левин Г. Я., **Сухарева Е. Г.** Влияние термической травмы на гемокоагуляционные свойства эритроцитарных микровезикул. // Материалы конференции «Современные аспекты лечения термической травмы», Санкт-Петербург. – 2016. – С.61–62.
- Удостоверение на рационализаторское предложение:** «Способ определения эритроцитарных микровезикул *in vitro*» (№2625 от 25.12.12).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время;
БП – бестромбоцитарная плазма;
ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма;
ТЭГ – тромбоэластограмма;
ФС – фосфатидилсерин;
ЭМВ – эритроцитарные микровезикулы;
ЭФПЭ – электрофоретическая подвижность эритроцитов;
ЭМ – эритроцитарная масса;
HbA_{1c} – гликированный гемоглобин;
Hb – гемоглобин;

Отпечатано в типографии ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России
603155, г. Нижний Новгород, Верхневолжская наб., 18/1

Объем 1 п.л. Тираж 100 экз. Заказ 05/16.

Подписано в печать 16.08.2016.

Ризограф GR-3750