

На правах рукописи



ПЕШКОВА АЛИНА ДМИТРИЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КОНТРАКЦИИ
СГУСТКОВ КРОВИ И ЕЕ НАРУШЕНИЙ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2020

Работа выполнена на кафедре биохимии, биотехнологии и фармакологии в научно-исследовательской лаборатории «Белково-клеточные взаимодействия» Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Литвинов Рустем Игоревич

Официальные оппоненты: **Набатов Алексей Анатольевич** – доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела спортивной биохимии и генетики ФГБОУ ВО «Поволжская государственная академия физической культуры, спорта и туризма».

Киселев Сергей Васильевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры общей и органической химии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева»

Защита диссертации состоится «24» сентября 2020 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета КФУ.03.07. при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» <https://kpfu.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



О.А. Кравцова

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Настоящее исследование выполнено на стыке общей и клинической биохимии, клеточной биологии и гематологии. Оно направлено на расшифровку биологических механизмов гемостаза и повышение эффективности борьбы с кровотечениями и тромбозами.

Известно, что кровь способна свертываться, т.е. загустевать с образованием желеобразного сгустка. Свертывание крови, или гемокоагуляция, — это биологическая реакция, которая является одним из главных механизмов гемостаза, т.е. остановки кровотечения. Система гемостаза, с одной стороны, должна поддерживать нормальную текучесть крови в физиологических условиях, а, с другой стороны, — быстро реагировать на нарушение целостности сосудистого русла путем образования сгустка, чтобы остановить истечение крови в месте повреждения кровеносного сосуда [Атауллаханов, 2015]. Нарушение гемостатического баланса, т. е. равновесия между жидкой и свернувшейся кровью, встречается часто при самых разных патологических состояниях (травмы, онкологические и сердечно-сосудистые заболевания, хирургические операции и т. д.) и может привести к кровопотере или, наоборот, угрожать закупоркой кровеносных сосудов, т.е. тромбозом [Panteleev, 2015].

Гемостаз и тромбоз – два противоположных по последствиям жизненно важных результата свертывания крови, которые определяют исключительное значение этого процесса для биологической науки и медицинской практики. Кровотечения и другие гемостатические нарушения являются доминирующими причинами инвалидности и смертности [Previtali, 2011]. По данным ВОЗ, в мире за год от сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с нарушениями гемостаза, умирает около 17,5 млн. человек, что составляет 31% всех случаев смерти [Jankovic, 2015].

Сравнительно много известно о начальных реакциях свертывания крови, формировании сгустка крови и его ферментативном растворении (фибринолизе). Гораздо менее изучен процесс структурной реорганизации сгустка крови, известный под названием контракции, или ретракции. Контракция сгустка крови – это активное сжатие, или сокращение, сгустка с отделением сыворотки крови. Если контракция происходит *in vivo*, она может предотвращать или уменьшать потерю крови за счет стягивания краев раны сразу после повреждения и восстанавливать кровоток в обход сгустка или тромба, закупоривающего просвет кровеносного сосуда. Несмотря на биологическую и медицинскую значимость этого процесса, контракция сгустков крови изучена недостаточно, отчасти из-за несовершенства существующих методик объективной регистрации и количественной оценки этого процесса.

Исходя из сказанного, **цель** работы - исследование молекулярных и клеточных механизмов механохимической контракции (ретракции) сгустков крови.

Основные задачи исследования:

- 1) разработать методику количественного анализа кинетики контракции сгустка крови *in vitro*;
- 2) изучить зависимость контракции сгустков крови от вариаций клеточного и белкового состава крови;
- 3) изучить роль тканевого фактора на моноцитах в контракции сгустков крови;
- 4) изучить влияние контракции сгустков крови на фибринолиз;

- 5) определить параметры контракции сгустков крови у пациентов с острым ишемическим инсультом и венозными тромбоэмболическими осложнениями по сравнению с кровью условно здоровых людей;

Научная новизна. Разработана методика изучения контракции сгустков крови, которая апробирована в клинико-диагностической лаборатории как новый интегральный тест гемостаза. Изучена зависимость кинетики контракции сгустков крови от патологических вариаций белкового и клеточного состава крови. Установлены механизмы изменений контракции сгустков крови при тромбозах, которые объясняют патогенетическое значение контракции и её нарушений, а также подводят научную базу под использование кинетики контракции сгустков крови как лабораторного теста, имеющего прогностическое и диагностическое значение.

Обнаружена способность активированных моноцитов стимулировать контракцию сгустков крови путем экспрессии тканевого фактора с последующей генерацией тромбина, что является дополнительным доказательством прямой связи между тромбозом и воспалением.

Установлена зависимость протеолитического расщепления (фибринолиза) сгустков крови от степени их контракции. Показано, что сгустки, претерпевшие полную контракцию, подвержены ускоренному (пато)физиологическому фибринолизу изнутри, но в то же время становятся устойчивыми к внешнему, или наружному, фибринолизу, аналогичному тромболитической терапии.

Выявлено нарушение контракции сгустков крови при тромботических состояниях у людей и установлен механизм этого патологического феномена. Разработана новая схема патогенеза тромбообразования с учетом антитромботической роли контракции сгустков крови и тромбов и протромботических последствий ее нарушений.

Теоретическая и практическая значимость работы. Новая методика изучения кинетики контракции сгустков крови может быть использована как тест для интегральной характеристики гемостаза и его нарушений как в научно-исследовательских, так и в клинико-диагностических лабораториях. Определены нормальные характеристики контракции сгустков крови у здоровых доноров и параметры контракции, которые характеризуют патологические изменения в сторону гиперкоагуляции и (пред)тромботических состояний.

Изучение контракции сгустков крови у пациентов при ряде тромботических состояний (ишемический инсульт, венозный тромбоз, тромбоэмболия легочной артерии) показало, что способность сгустков крови к сжатию ослаблена вследствие биохимической активации тромбоцитов в кровотоке, их энергетического истощения и вторичной дисфункции, включая снижение сократительного потенциала. Это указывает на важную патогенетическую роль прижизненной контракции внутрисосудистых сгустков крови при тромбозах, что может определять течение и исход тромботических состояний. Так, при нарушении контракции несжатые тромбы могут перекрывать просвет сосуда и тормозить кровоток, в отличие от полностью контрактированных, менее окклюзивных тромбов. Важный патогенетический аспект контракции сгустков и тромбов связан с тем, что нарушение контракции, независимо от причин, прямо коррелирует с риском легочной эмболии при венозном тромбозе.

Практическое значение работы состоит в том, что полученные результаты позволяют

рассматривать кинетику контракции сгустков крови *in vitro* как новый клинико-лабораторный тест для оценки риска тромбоза. Кроме того, тест кинетики контракции сгустков крови в комбинации с другими лабораторными тестами может использоваться для ранней диагностики (пред)тромботических состояний и контроля за эффективностью проводимого лечения.

Учитывая малоудовлетворительные результаты профилактики и лечения тромботических осложнений во всем мире, результаты исследования дают основание считать контракцию сгустков и тромбов недооцененной и практически важной проблемой в области гемостаза и тромбоза, заслуживающей дальнейшего изучения.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Кинетика контракции сгустков крови *in vitro* – информативный лабораторный тест, характеризующий изменения коагуляционного и тромботического потенциала.
2. Кинетика контракции сгустков крови зависит от патологических изменений клеточного и белкового состава крови.
3. Тромботические состояния у людей сопровождаются нарушением контракции сгустков крови и тромбов вследствие хронической активации, энергетического истощения и дисфункции тромбоцитов, включая их пониженную способность к сокращению.

Достоверность результатов исследования определяется тщательным выбором и характеристикой объектов исследования, большим количеством экспериментальных данных, полученных на современном оборудовании, и детальным анализом результатов, в том числе с использованием обоснованных методов статистической обработки. Все результаты исследования представлены и обсуждены на многочисленных научных конференциях с участием ведущих специалистов и опубликованы в рецензируемых российских и зарубежных изданиях.

Внедрение в практику. Результаты работы внедрены в повседневную работу следующих научных и клинических подразделений: научно-исследовательской лаборатории «Белково-клеточные взаимодействия» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, клинико-диагностической лаборатории №1 Университетской клиники Казанского федерального университета, клинико-диагностической лаборатории Межрегионального клинико-диагностического центра (г. Казань) и лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (г. Москва). Материалы диссертации используются в учебном процессе при преподавании курса «Введение в молекулярную патологию» на кафедре биохимии, биотехнологии и фармакологии Казанского федерального университета.

Апробация работы. Основные научные результаты исследований были представлены на 8-м и 10-м Всероссийских конгрессах молодых биологов с международным участием «Симбиоз-Россия» (Новосибирск, 2015; Казань, 2017); на конгрессах Международного общества по тромбозу и гемостазу (Торонто, Канада, 2015 и Берлин, Германия 2017); на 19-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века» (Пущино, 2015); на Международной научно-практической конференции «Трансляционная медицина – 2016» (Казань, 2016); на

Всероссийских конференциях по клиническому гемостазу и гемореологии (Москва, 2016 и Санкт-Петербург, 2018); на 6-ой Международной конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (Казань, 2017); на 23-м съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017); на итоговых ежегодных научных конференциях Казанского федерального университета (Казань, 2017, 2018, 2020); на Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы патологии гемостаза» (Санкт-Петербург, 2018); на 52-ой ежегодной международной научной конференции Европейского общества клинических исследований (Барселона, Испания, 2018); на 5-ой международной конференции ПОСТГЕНОМ'2018 «В поисках моделей персонализированной медицины» (Казань, 2018); на 2-ой Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биохимия - основа наук о жизни» (Казань, 2019); на 6-ом Съезде биохимиков России (Сочи, 2019).

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора исследования. Работа выполнена в рамках программы научных исследований кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии и НИЛ «Белково-клеточные взаимодействия» при финансовой поддержке Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального (Приволжского) университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 18-415-160004 и 19-015-00075).

Цель и задачи исследования сформулированы совместно с научным руководителем. Разработка метода изучения контракции сгустка крови, подбор оптимальных условий постановки теста, определение роли клеточного состава крови выполнены автором самостоятельно. Автор лично провел исследования по изучению роли моноцитов в контракции сгустков крови, по исследованию кинетики внешнего и внутреннего фибринолиза контрактированных и неконтрактированных сгустков крови. Работа по изучению контракции сгустков крови при ишемическом инсульте проводилась совместно с заведующим отделением интенсивной терапии к.м.н. Т. В. Деминым и заведующим неврологическим отделением к.м.н. М. В. Сайхуновым на базе Межрегионального клиничко-диагностического центра, г. Казань. Изучение роли контракции сгустков крови при венозных тромбоэмболических осложнениях проводилось совместно с заведующим отделением сосудистой хирургии д.м.н. Р. А. Бредихиным и врачом отделения Д.В. Малясёвым на базе Межрегионального клиничко-диагностического центра, г. Казань. Сканирующая электронная микроскопия церебральных и венозных тромбов проводилась совместно с аспирантом кафедры общей патологии Казанского медицинского университета Р. Р. Хисматуллиным и аспирантом Валери Татвилер (Valerie Tutwiler) в лаборатории Джона Вайзела (John Weisel) Медицинского факультета Пенсильванского университета. Автор лично участвовал на всех этапах обработки результатов, их анализа и подготовки публикаций.

Публикации результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 26 работ, в том числе 10 научных статей, среди них 4 статьи в российских рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, и 6 статей в международных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и WoS. Кроме того, по материалам диссертации получен 1 патент.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их

обсуждения, общего заключения, списка цитированной литературы и приложения. Работа изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 43 рисунка и 9 таблиц в основном тексте и 2 дополнительные таблицы. Библиография включает 139 наименований, из них 126 иностранных источника.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю д.м.н., профессору Р. И. Литвинову за выбор темы и постоянную помощь в процессе выполнении работы; сотрудникам НИЛ «Белково-клеточные взаимодействия» И. А. Андриановой, Н. Г. Евтюгиной, Ж. Ле Минь, Э. Р. Мордахановой за повседневную помощь на всех этапах работы; ООО «ГемаКор» за предоставление регистратора тромбодинамики, использованного в данной работе; врачам Т. В. Демину, М. В. Сайхунову, Р. А. Бредихину и Д. В. Малясеvu за помощь в работе с клиническим материалом; аспиранту кафедры общей патологии КГМУ Р. Р. Хисматуллинu за помощь в проведении сканирующей электронной микроскопии церебральных и венозных тромбов; заведующей кафедрой биохимии, биотехнологии и фармакологии, д.б.н., профессору Р.Г. Киямовой, доценту кафедры Т.А. Невзоровой и всем сотрудникам кафедры за постоянную поддержку и помощь в процессе обучения в аспирантуре и в ходе выполнения научной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Основным материалом исследования была венозная кровь людей. Всего было исследовано 410 образцов крови, в том числе 270 образцов крови здоровых доноров и 140 образцов крови пациентов, включая 85 пациентов с острым ишемическим инсультом и 55 пациентов с венозными тромбоэмболическими осложнениями. Все исследования проводились согласно протоколам, утвержденным Этическим комитетом ГАУЗ «Межрегиональный клинико-диагностический центр», г. Казань (протокол № 59 от 10.09.2015 г. и протокол № 70 от 30.01.2016 г.).

Получение стабилизированной крови и ее фракций. Эритроциты выделяли из цитратной крови путем центрифугирования при 200g в течение 10 минут при комнатной температуре и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) с pH 7,4 путем трехкратного центрифугирования. Богатая тромбоцитами плазма (PRP) была получена путем центрифугирования цитратной крови при 200g в течение 10 минут. Бедную тромбоцитами плазму (PPP) получали путем центрифугирования PRP при 2000g 10 минут. Бестромбоцитную плазму (PFP) получали путем центрифугирования PRP при 10000g в течение 10 минут.

Сканирующая электронная микроскопия тромбов. Церебральные и венозные тромбы, полученные при тромбэктомии, были промыты в физиологическом растворе и зафиксированны в 2% глутаровом альдегиде. После разрезания образцы обезвоживали, повышая объемную долю этилового спирта от 30% до 100%, после чего замещали спирт гексаметилдисилазаном (HMDS). Образцы напыляли золотом и палладием на приборе Polaron, e5100 Sputter Coater (Quorum Technologies, Великобритания) и исследовали на сканирующем электронном микроскопе FEI Quanta 250 (FEI, США) или Merlin (Zeiss, Германия).

Выделение моноцитов и их характеристика. Цитратную кровь центрифугировали при 200g в течение 10 минут при комнатной температуре. Осадок клеток крови ресуспендировали в соотношении 1:1 буфером PBS, содержащим 1 mM EDTA и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), и центрифугировали на среде Ficoll-Paque™

Premium (GE Healthcare Biosciences) при 1100g при комнатной температуре в течение 20 минут для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Собирали фракцию PBMC и трижды промывали в буфере PBS-EDTA-BSA центрифугированием при 300g в течение 10 минут при температуре 4°C. Затем PBMC вновь суспензировали в буфере PBS-EDTA-BSA и выделяли моноциты методом негативной иммунной сепарации с помощью набора Dynabeads Untouched Human Monocytes Kit в соответствии с протоколом производителя. Изолированные моноциты промывали в буфере PBS-EDTA с последующим центрифугированием при 300g в течение 10 минут при температуре 4°C и ресуспендировали в PBS без EDTA.

Чистоту клеток определяли с помощью проточной цитометрии на приборе FACSCalibur (BD Biosciences) с использованием флуоресцентно-меченых антител против CD14 (маркер моноцитов) и CD41 (маркер примеси тромбоцитов). Препараты содержали 98-100% моноцитов от всех мононуклеарных клеток, а примесь тромбоцитов варьировала от 10 до 27 тромбоцитов на 1 моноцит. Клетки использовались в течение 6 часов после выделения. Жизнеспособность выделенных клеток была определена с помощью пропидия йодида и трипанового синего и составляла 91-100%. Число клеток было определено с помощью анализатора ABX Micros 60 (Horiba) или путем подсчета в камере Горяева.

Биохимическая активация моноцитов и ингибирование экспрессии тканевого фактора. Изолированные моноциты активировали с помощью 50 нг/мл фобол 12-миристан 13-ацетата (PMA) в течение 15 минут при 37°C и затем промывали двойным центрифугированием для удаления PMA. Экспрессию тканевого фактора (TF) ингибировали, блокируя сигнальные пути с помощью 250 мкМ агониста PPAR α (WY-14643) [Neve, 2001] при 37°C в течение 10 минут перед добавлением PMA, и отмывали клетки двойным центрифугированием для удаления PMA. Для того, чтобы блокировать прокоагулянтную активность TF, использовали 20 мкг/мл кроличьего IgG-антитела против человеческого TF, которое было добавлено к PMA-активированным моноцитам с последующей инкубацией в течение 5 минут при комнатной температуре. Изолированные моноциты ресуспендировали в PBS, pH 7,4, содержащем 0,1% BSA и добавляли обратно в цитратную цельную кровь в конечной концентрации, равной изначальному количеству моноцитов в цельной крови, после чего определяли кинетику контракции сгустка крови.

Оценка экспрессии тканевого фактора на активированных моноцитах. Для количественной оценки уровня экспрессии TF (CD142) моноциты инкубировали при 4°C в течение 30 минут с 5 мкл мышинового антитела, меченого фикоэритрином (PE), против человеческого белка CD142 (BD Biosciences) и 3 мкл мышинового антитела, меченого PerCP, против человеческого белка CD14 (BD Biosciences). После инкубации с мечеными антителами, клетки анализировали с помощью проточного цитометра FACSCalibur (BD Bioscience).

Выделение тромбоцитов с помощью гель-фильтрации и их характеристика. Изолированные тромбоциты получали из PRP гель-фильтрацией на Сефарозе 2B, уравновешенной буфером Тироде. Подсчет выделенных тромбоцитов проводили в камере Горяева в микроскопе PrimoStar с увеличением 400 \times . Тромбоциты использовали в течение 3-х часов после взятия крови. Жизнеспособность тромбоцитов составляла ~97% по сохранности митохондриального трансмембранного потенциала, определенного методом проточной цитометрии с помощью флуоресцентного красителя MitoTracker DeepRed FM.

Определение молекулярных маркеров активации тромбоцитов методом

проточной цитометрии. Функциональное состояние изолированных тромбоцитов анализировали по их способности экспрессировать Р-селектин и активный интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa) до и после активации гексапептидом (TRAP-6), активирующим тромбиновый рецептор PAR1. Проточную цитометрию проводили на цитометре FACSCalibur (BD Bioscience), оборудованном программой BD CellQuest™. Полученные данные анализировали с помощью программы FlowJo X.

Сканирующая электронная микроскопия тромбоцитов. Изолированные тромбоциты, суспендированные в буфере Тироде без BSA, фиксировали 2% глутаровым альдегидом на буфере Тироде в течение 1 часа. Клетки осаждали центрифугированием при 150g 7 минут на поликарбонатном фильтре (размер пор 0,4 мкм) и дополнительно фиксировали раствором 2% глутарового альдегида в течение ночи при 4-8°C. Образцы дегидратировали растворами этанола в восходящей концентрации от 30об% до 100об%, высушивали гексаметилдисилазаном (HMDS) и напыляли слой золота с палладием (Polaron, e5100 sputter coater). Морфологию тромбоцитов изучали на сканирующем электронном микроскопе Quanta 250G (FEI, США) или Merlin (Zeiss, Германия).

Исследование кинетики внутреннего фибринолиза. Кинетику внутреннего фибринолиза определяли с помощью оптической регистрации размера сгустка крови во времени на приборе «Регистратор Тромбодинамики» производства компании «ГемаКор» (Москва). Внутренний фибринолиз инициировали добавлением тканевого активатора плазминогена (t-PA) (75 нг/мл) в цитратную кровь, затем вызывали образование сгустка и его последующее сжатие (контракцию) добавлением 2 мМ CaCl_2 и 1 Ед/мл тромбина. После активации тромбином образцы крови быстро переносили в двухканальную пластиковую измерительную кювету размером 12x7x1мм, которую предварительно ополаскивали 4%-ным раствором Тритона X-100 на 150 мМ NaCl для предотвращения прилипания фибрина к стенкам кюветы. Размеры сгустка регистрировали каждые 100 секунд в течение 3,5 часов. Контрольный образец крови того же донора без добавления t-PA измеряли параллельно, чтобы оценить уменьшение сгустка, вызванное контракцией без фибринолиза.

Исследование кинетики внешнего фибринолиза. Чтобы оценить кинетику внешнего фибринолиза, цельную цитратную кровь смешивали с небольшим количеством ^{125}I -меченого фибриногена (PerkinElmer). Образование и контракцию сгустка крови инициировали добавлением 1 Ед/мл тромбина и 2 мМ CaCl_2 (конечные концентрации). Сгустки, образованные в течение 30 минут, переносили в боросиликатные трубки, содержащие 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) с t-PA (конечная концентрация 75 нг/мл). Образцы инкубировали при 37°C и оценивали скорость фибринолиза по высвобождению растворимых радиоактивных продуктов расщепления фибрина, отбирая по 10 мкл буфера через 30 минут, 1, 2, 3, 4 и 24 часа. Радиоактивность продуктов расщепления фибрина определяли с использованием гамма-счетчика (PerkinElmer). Результаты представляли как количество меченого фибрин(огена) в отобранных образцах буфера относительно общего количества радиоактивно-меченого фибрина в сгустке.

Статистическая обработка результатов. Нормальность распределения выборок оценивали по критериям Д'Агостино и Шапиро-Уилка. При условии нормального распределения, различия между выборками оценивали с помощью непарного двустороннего метода Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (One Way

ANOVA). Описательную статистику нормально распределенных данных приводили как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего. При отклонении от нормального распределения, оценку статистических различий между двумя независимыми выборками осуществляли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни и однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса.

Целью корреляционного анализа был поиск возможных функциональных взаимосвязей между различными показателями. С учетом симметричного распределения данных, корреляционный анализ проводили по методу Пирсона. Если нормальное распределение не подтверждалось, использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Уровень статистической значимости при всех типах анализа был равен 95% ($p < 0,05$). Для расчетов применяли статистический программный пакет GraphPad Prism 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка методики изучения кинетики сокращения сгустков крови *in vitro*

Существующие методики изучения сокращения сгустков крови основаны на полуколичественном измерении полноты сокращения. К ним относятся тесты, в которых степень сокращения определяется или путем сравнения размера сгустка до и после сжатия, или по объему выделившейся сыворотки. Преимущество этих методик – в их простоте, а недостаток – в неточности измерений и отсутствии данных о кинетике процесса сокращения.

В основе разработанной нами методики (патент РФ № 2596926 от 15.08.2016) лежит *динамическое* измерение размера сгустка крови с помощью оптического «Регистратора тромбодинамики» производства фирмы «ГемаКор» (Москва). Прибор оснащен термостатом, в который помещается плоская двухканальная измерительная кювета с исследуемым образцом цельной крови (рисунок 1). Кювета освещается источником красного света и регистрируется цифровой фотокамерой в рассеянном свете, что позволяет осуществлять динамическую регистрацию сжатия сгустка крови.

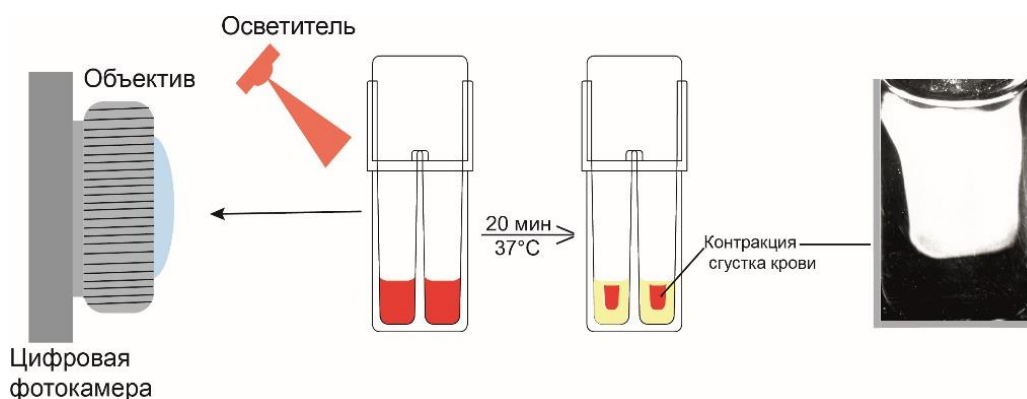


Рисунок 1.
Схема
аппаратной
методики
изучения
сокращения
сгустков крови.

Для проведения теста берется двухканальная измерительная кювета, внутренняя поверхность которой ополаскивается 4 об% раствором тритона X-100 на 150 мМ NaCl, после чего остатки детергента тщательно удаляются. Эта процедура необходима для предотвращения прилипания сгустка к стенкам кюветы. Кювета устанавливается в термостатируемый отсек (37°C) прибора. К цитратной крови добавляют 2 мМ кальция хлорида для частичной рекальцификации с последующей инкубацией при температуре 37°C в течение 3 минут. Образование сгустка и активация тромбоцитов инициируются добавлением к 400 мкл рекальцифицированной цитратной крови 10 мкл

свежеразмороженного α -тромбина человека (40 Ед/мл) до конечной концентрации 1 Ед/мл. После тщательного перемешивания 80 мкл образца переносится в измерительную кювету, которая помещается в термостатируемую камеру прибора. После включения режима регистрации прибор фиксирует изображения сгустка каждые 15 секунд в течение 20 минут.

Для построения кинетической кривой контракции и расчета параметров используется специальная программа, которая определяет площадь сгустка в каждом изображении и представляет его как долю от площади исходного, несжатого сгустка. Автоматически определяются следующие параметры: (а) конечная степень контракции сгустка крови (в процентах); (b) лаг-период (в секундах) - время, необходимое для инициации процесса контракции; (с) площадь над кривой (в условных единицах) (рисунок 2). Кроме того, определяется средняя скорость контракции сгустка за время измерения как среднее значение первой производной.

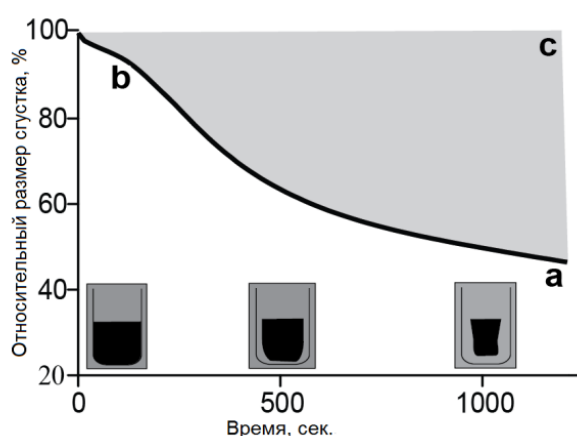


Рисунок 2. Типичная кинетическая кривая контракции сгустка крови и ее параметры: (а) – конечная степень контракции; (b) – лаг-период; (с) – площадь над кривой.

Оптимизация условий формирования и контракции сгустков крови in vitro

Ввиду того, что тромбоциты чувствительны к протеазе тромбину и ионам кальция, сначала было необходимо определить их оптимальные концентрации для использования в дальнейшей работе. Конечную концентрацию хлорида кальция варьировали от 0 до 10 мМ в 25 образцах цельной крови при инициировании свертывания добавлением 1 Ед/мл тромбина.

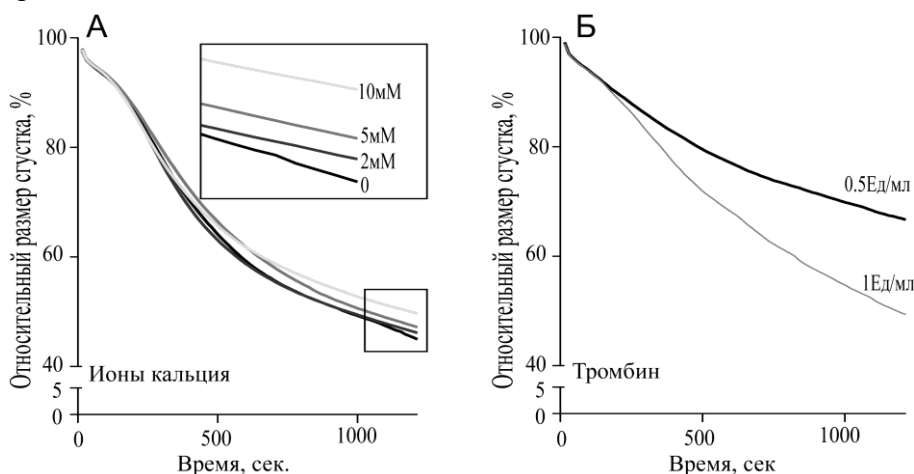


Рисунок 3. Кинетика контракции сгустка крови при разных условиях. (А) Образцы крови с 1 Ед/мл тромбина в присутствии разных концентраций хлорида кальция. (Б) Образцы крови, содержащие 2 мМ хлорида кальция с концентрацией тромбина 0,5 Ед/мл или 1 Ед/мл.

Результаты показали, что экзогенный Ca^{2+} не является необходимым для образования и контракции сгустков крови (рисунок 3), однако без хлорида кальция сгустки были нестабильны и характеризовались выпадением эритроцитов из сгустка в

процессе контракции в $\sim 1/3$ образцов, что, скорее всего, обусловлено неполной ковалентной «сшивкой» фибрина под действием фактора XIIIa [Byrnes, 2017]. Добавление хлорида кальция в конечной концентрации 2 мМ и 5 мМ приводило к стабилизации сгустка, предотвращало выпадение эритроцитов, но не оказывало заметного влияния на его способность к контракции. В концентрации 10 мМ хлорид кальция частично тормозил процесс, снижая среднюю скорость и степень контракции сгустка крови (рисунок 3А).

Зависимость контракции сгустков крови от активности тромбина также изучалась параллельно на одних и тех же образцах с добавлением 2 мМ хлорида кальция, но с разным количеством внесенного тромбина. Добавление 0,5 Ед/мл тромбина вело к снижению степени и скорости контракции по сравнению с 1 Ед/мл тромбина (рисунок 3Б).

На основании полученных результатов, конечные концентрации 2 мМ хлорида кальция и 1 Ед/мл тромбина были признаны оптимальными и использовались во всех последующих экспериментах.

Зависимость контракции сгустков крови от состава крови и функции тромбоцитов

Чтобы исследовать роль тромбоцитов в контракции сгустков, были получены изолированные тромбоциты, которые добавлялись в разных концентрациях к бестромбоцитной плазме крови (PFP), что позволило сохранять постоянным концентрацию фибриногена и других плазменных белков. При количестве тромбоцитов ниже 150000/мкл наблюдалась слабая контракция сгустка, которая мало отличалась от контракции при уровне тромбоцитов 75000/мкл. Когда количество тромбоцитов возрастало до 250000-300000/мкл, наблюдалось увеличение степени контракции сгустка на 15% по сравнению с 75000/мкл. При увеличении количества тромбоцитов до 500000/мкл и более наблюдалось увеличение степени контракции сгустка на 30% (рисунок 4А). Таким образом, степень контракции сгустков крови прямо зависит от количества тромбоцитов.

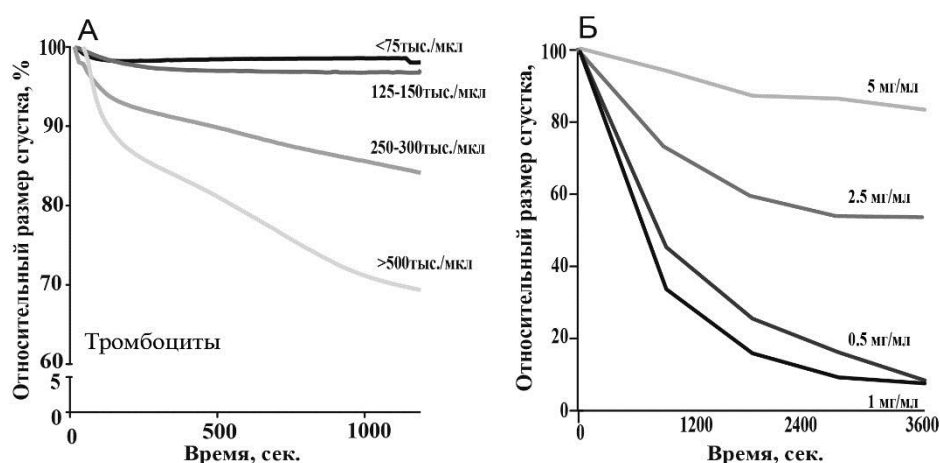


Рисунок 4. (А) Влияние количества тромбоцитов на кинетику контракции сгустков крови. **(Б)** Влияние концентрации фибриногена на кинетику контракции сгустков крови
*** $p < 0,001$.

Наряду с функциональным потенциалом и количеством тромбоцитов, контракция сгустков крови должна зависеть от концентрации белка фибриногена и количества образующегося из него полимера фибрина, т.к. волокна фибрина выполняют роль «кабелей», по которым распространяется сократительная сила тромбоцитов. Чтобы оценить функциональную роль фибрин(огена), изолированные тромбоциты ресуспендировали в растворе очищенного фибриногена – так, чтобы концентрация тромбоцитов была постоянной (около 400 000/мкл), а концентрация фибриногена составляла 0,5 мг/мл, 1,0 мг/мл, 2,5 мг/мл или 5 мг/мл. На рисунке 4Б видно, что при

концентрации фибриногена выше 1 мг/мл степень контракции снижалась на 2/3 и более. Таким образом, более высокое содержание белков фибриногена и фибрина тормозит контракцию сгустков крови.

Для изучения влияния объемной доли эритроцитов (гематокрита) на контракцию сгустков крови отмытые эритроциты ресуспендировали в смеси PRP и PFP в таких соотношениях, чтобы изменялось только количество эритроцитов, в то время как число тромбоцитов и концентрация фибриногена оставались неизменными. При гематокрите 30-40% степень контракции сгустка уменьшалась примерно на 1/3 по сравнению с гематокритом 10% и меньше. Даже сравнительно небольшое увеличение гематокрита (15-20%, 30-40% и >40%) вызывало достоверное снижение степени контракции (рисунок 5). Следовательно, степень контракции сгустка крови обратно пропорциональна количеству эритроцитов.

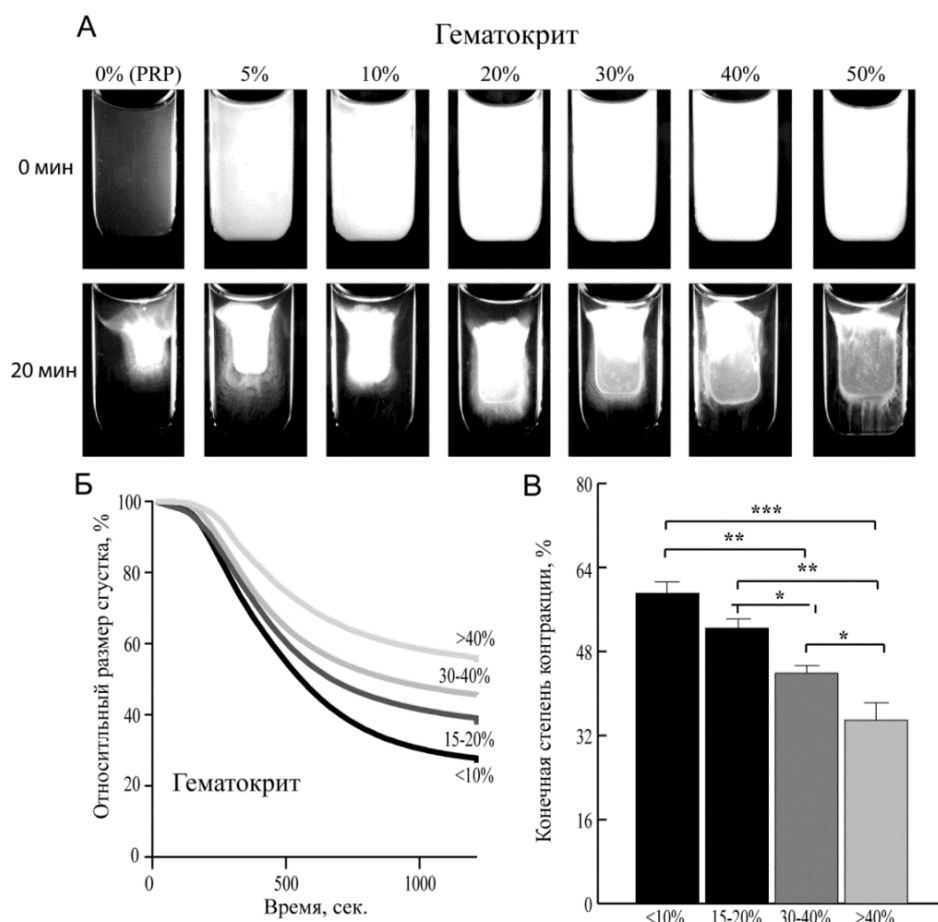


Рисунок 5. Влияние эритроцитов на контракцию (А) Изображения сгустков до (верхний ряд) и после 30 минутной контракции, вызванной 1 Ед/мл тромбина и 2 мМ CaCl_2 . Графики показывают влияние эритроцитов на кинетику (Б) и степень контракции (В) сгустков крови. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

В процессе образования фибрина остатки глутамина и лизина подвергаются дополнительной ковалентной сшивке трансклутаминой - фактором XIIIa, который образуется из неактивного проэнзима (фактора XIII) в результате протеолитического действия тромбина при участии ионов Ca^{2+} . Для оценки роли ковалентных связей внутри фибрина, мы исследовали контракцию сгустков крови в отсутствие и в присутствии йодацетамида и цистамина, ингибиторов активного центра фактора XIIIa. Установлено, что подавление ферментативной активности фактора XIIIa значительно снижает кинетику контракции (рисунок 6 А, Б).

Известно, что сокращение немышечных клеток определяется взаимодействием белков цитоскелета актина и миозина IIa. Чтобы доказать решающую роль миозина IIa и актина в контракции тромбоцитов, сжатие сгустков крови изучалось в присутствии

блебистатина, селективного ингибитора связывания миозина IIa с актином. В концентрациях 25-200 μM блебистатин оказывал дозозависимый ингибирующий эффект на параметры контракции сгустков крови и в максимальной концентрации уменьшал степень контракции на 63% (рисунок 6B), что подтверждает решающую роль актомиозинового комплекса тромбоцитов в контракции сгустков крови.

Чтобы выяснить важность тромбоцитарного интегрина $\alpha\text{IIb}\beta 3$ для контракции сгустков крови, были проведены эксперименты в присутствии пептида арг-гли-асп-сер (RGDS), ингибитора адгезии тромбоцитов. RGDS тормозил контракцию и в концентрации 200 μM уменьшал степень контракции сгустка крови на 49%, конкурентно блокируя взаимодействия тромбоцитов с фибрином, опосредованные интегрином $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (рисунок 6Г).

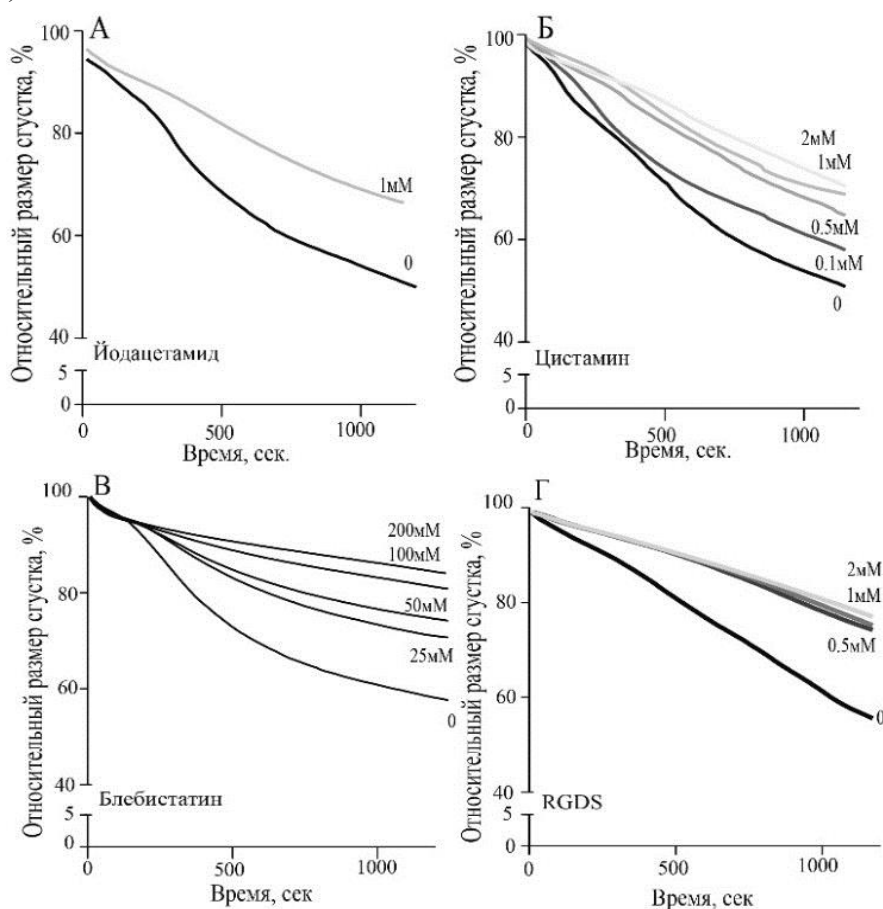


Рисунок 6. Влияние йодацетамида (А), цистамина (Б) блебистатина (В) и пептида RGDS (Г) на кинетику контракции сгустков крови.

Влияние активированных моноцитов на контракцию сгустков крови

Поскольку моноциты играют важную роль в развитии воспалительных тромбозов и могут выступать в качестве модуляторов функции тромбоцитов [von Bruhl, 2012; Ghasemzadeh, 2013; Swystun, 2016], мы исследовали прямое влияние моноцитов на контракцию сгустков крови путем формирования сгустков в присутствии активированных и неактивированных моноцитов. Добавление неактивированных моноцитов в кровь не влияло на параметры контракции сгустка крови по сравнению с контрольными образцами (в присутствии и в отсутствие экзогенных моноцитов степень контракции в среднем равна $51 \pm 3\%$ и $48 \pm 1\%$, соответственно, $p > 0,3$). Напротив, добавление моноцитов после их предварительной биохимической активации под действием РМА, достоверно увеличивало среднюю степень контракции сгустков крови до $56 \pm 2\%$ ($p < 0,01$) (рисунок 7 А, Б).

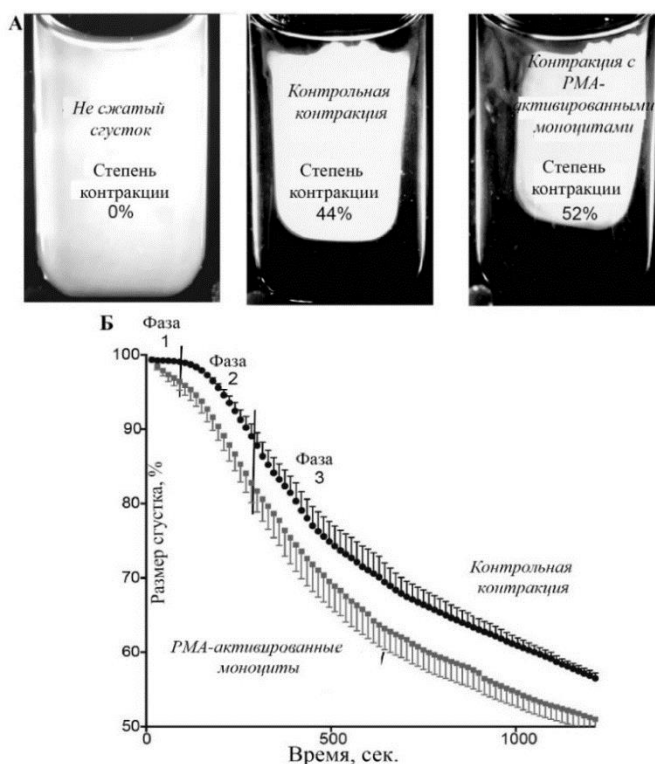


Рисунок 7. Влияние экзогенных активированных моноцитов на контракцию сгустка крови. (А) Исходный несжатый сгусток и сгустки после 20-минутной контракции, полученные из того же образца крови в различных экспериментальных условиях. (Б) Усредненные кинетические кривые контракции сгустков крови (n=8) после добавления РМА-активированных и неактивированных моноцитов.

Активированные моноциты могут экспрессировать воспалительные белки, включая тканевой фактор (TF), инициатор свертывания крови по внешнему пути [Libby, 2001; Eilertsen, 2004], поэтому можно предположить, что активированные моноциты стимулируют контракцию сгустка крови, благодаря экспрессии TF с последующей выработкой эндогенного тромбина. Для ингибирования экспрессии TF посредством блокирования внутриклеточных сигнальных путей, изолированные моноциты инкубировали с агонистом ядерного рецептора PPAR α . Активация этого рецептора подавляет все воспалительные реакции моноцитов, включая экспрессию TF [Neve, 2001; Marx, 2002]. Добавление РМА-активированных моноцитов, предварительно обработанных агонистом PPAR α , приводило к восстановлению параметров контракции сгустка крови до контрольных значений, т.е. в отсутствие моноцитов или в присутствии неактивированных моноцитов (рисунок 8 А, Б).

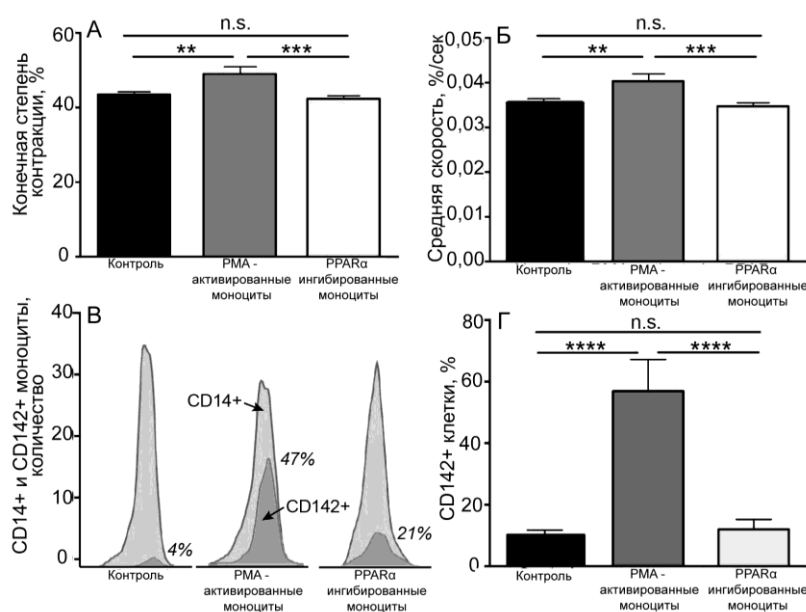


Рисунок 8. Степень контракции (А) и средняя скорость контракции (Б) при добавлении в кровь неактивированных моноцитов (контроль) или РМА-активированных моноцитов до и после инкубации с агонистом PPAR α (n=24). (В, Г) Экспрессия TF (CD142) на поверхности CD14-положительных моноцитов, определенная с помощью проточной цитометрии. (В) Экспрессия TF на поверхности неактивированных моноцитов (контроль) или РМА-активированных моноцитов до и после инкубации с агонистом PPAR α . (Г) Средняя доля моноцитов, экспрессирующих

TF, при тех же условиях (n=3). **p<0.0001; ***p<0.001; ****p<0.0001.

Для подтверждения того, что PMA-активированные моноциты экспрессируют TF, а агонист PPAR α подавляет эту экспрессию, была проведена проточная цитометрия, при которой наличие TF на поверхности клеток определяли с помощью флуоресцентно-меченого антитела к TF (CD142). Было обнаружено, что агонист PPAR α на 78% уменьшал среднее число активированных моноцитов, имеющих на поверхности TF, после 15 минутной инкубации моноцитов с PMA (рисунок 8 В, Г).

Эти результаты свидетельствуют о том, что активированные моноциты усиливают и ускоряют контракцию сгустка через экспрессию на их поверхности TF, вызывающего генерацию эндогенного тромбина, мощного стимулятора сократительного аппарата тромбоцитов.

Влияние контракции сгустков крови на их чувствительность к фибринолизу

Фибринолиз представляет собой ферментативное расщепление белка полимерных фибриновых сетей, которые образуют структурную основу сгустков крови и тромбов. Фибринолиз способствует восстановлению кровотока в закупоренных сгустком сосудах. Вопрос о связи фибринолиза с контракцией сгустков крови не изучен.

Чтобы сравнить фибринолиз контрактированных и неконтрактированных сгустков крови, параллельно исследовали пары сгустков из одного образца крови. Один сгусток претерпевал естественную контракцию, тогда как в другом контракция была подавлена одним из следующих ингибиторов: 1) блебистатином (конечная концентрация 200 мкМ) для ингибирования сократительного белка миозина IIa; 2) латрункулином А (конечная концентрация 4 мкМ) для подавления полимеризации актина; 3) лекарственным препаратом «РеоПро», действующее вещество – абциксимаб (конечная концентрация 100 мкг/мл), для ингибирования взаимодействия фибрина с адгезивным рецептором интегрином α IIb β 3 на тромбоцитах. Все ингибиторы достоверно подавляли контракцию сгустков крови (рисунок 9).

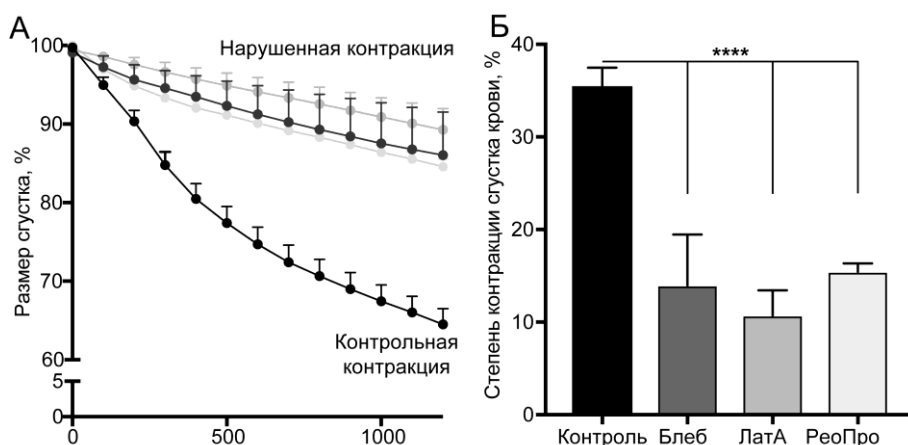


Рисунок 9. Ингибирование контракции сгустков крови под действием РеоПро (абциксимаб), латрункулина А (ЛатА) и блебистатина (Блеб). Результаты представлены в виде усредненных кинетических кривых (А) и конечной степени контракции сгустка крови (Б).

Чтобы воспроизвести внутривенное введение фибринолитических препаратов, которое используется в качестве тромболитической терапии, мы исследовали влияние степени контракции сгустка крови на **внешний фибринолиз**, когда фибринолитический фермент добавляется к сформированному сгустку крови. Значительные различия в скорости высвобождения растворимых продуктов расщепления фибрина наблюдались уже через 30 минут после добавления тканевого активатора плазминогена (t-РА).

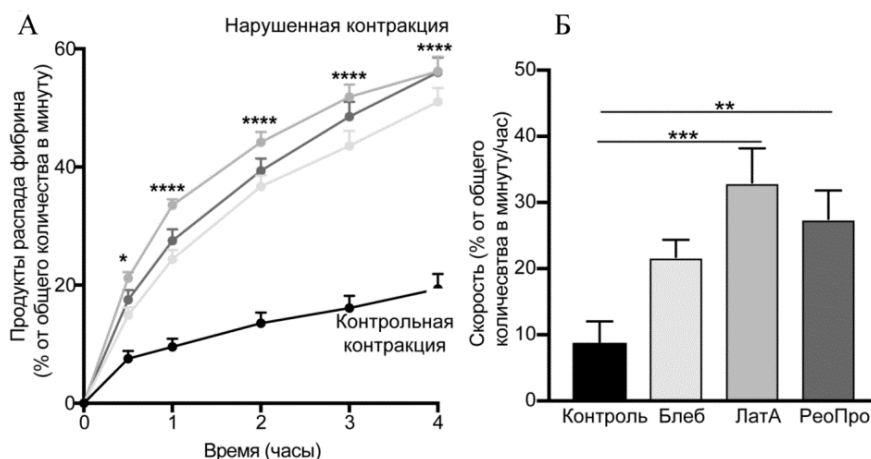


Рисунок 10. Влияние контракции сгустка крови на кинетику (А) и среднюю скорость (Б) внешнего фибринолиза. Активатор t-РА был добавлен через 30 минут после образования сгустка в присутствии и в отсутствие ингибиторов контракции: блебистатина (Блеб), латрункулина А (ЛатА) и РеоПро (абциксимаба).

Сгустки, сформированные в присутствии ингибиторов контракции (неконтрактированные сгустки) высвобождали в 2-4 раза больше продуктов распада в течение первых 30 минут и продолжали лизироваться в 4 раза быстрее, чем сгустки, претерпевшие нормальную контракцию (рисунок 10). Предположительный механизм замедления внешнего фибринолиза после контракции сгустков, скорее всего, связан с уплотнением эритроцитов в сгустке, что делает его менее проницаемым для активатора плазминогена t-РА.

Внутренний фибринолиз происходит за счет эндогенных протеолитических ферментов и является физиологическим процессом расщепления внутрисосудистого сгустка или тромба, направленным на восстановление нарушенного кровотока. Чтобы оценить влияние контракции сгустка крови на внутренний фибринолиз, мы добавляли t-РА к цитратной цельной крови перед внесением тромбина, катализирующего превращение фибриногена в фибрина. Лизис, т.е. растворение, определяли оптически по уменьшению размера и исчезновению сгустка. В присутствии t-РА размер сгустков стремительно уменьшался по сравнению со сгустками, в которых происходила контракция без фибринолиза, это различие было очевидным примерно через 25 минут после начала свертывания крови и активации тромбоцитов тромбином (рисунок 11А). Это время было принято за начальную точку фибринолиза.

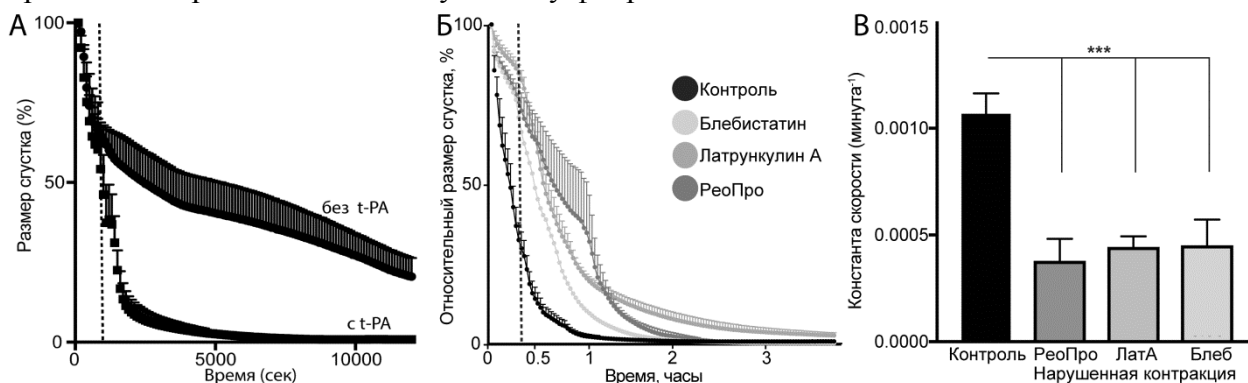


Рисунок 11. Уменьшение размера контрактированного сгустка в отсутствие t-РА (только контракция) и в присутствии t-РА 75 нг/мл (контракция и лизис) (А). Размеры сгустков достоверно отличались примерно на 25-й минуте (отмечено пунктирной линией) после образования сгустка ($p < 0,05$). Влияние контракции сгустка на кинетику (Б) и среднюю скорость (В) внутреннего фибринолиза. 75 нг/мл t-РА добавляли в кровь перед тем, как инициировать свертывание крови, как в отсутствие, так и в присутствии ингибиторов контракции, таких как РеоПро, латрункулин А (ЛатА) и блебистатин (Блеб).

Контрактированные сгустки растворялись сравнительно быстро и полностью, что определялось снижением оптической плотности ниже 5% от исходного уровня, со скоростью, которая была в 4-4,5 раза быстрее, чем в сгустках, образованных в присутствии ингибиторов контракции (рисунок 11 Б, В).

Наблюдаемый эффект ускоренного расщепления контрактированных сгустков при внутреннем фибринолизе прямо противоположен торможению распада сжатых сгустков, которое наблюдается при внешнем фибринолизе. Высокая чувствительность сжатых сгустков крови к внутреннему фибринолизу объясняется тем, что в процессе контракции локальная концентрация t-РА и плазминогена на волокнах фибрина внутри сгустка существенно возрастает, в отличие от неконтрактированных сгустков, а пространственная плотность самих волокон увеличивается, что облегчает их протеолитическое расщепление. Замедление внешнего фибринолиза после контракции сгустков крови объясняется их низкой проницаемостью для t-РА.

Связь между контракцией и фибринолизом имеет большое клиническое значение при тромботических состояниях, т.к. способна определять эффективность естественного или лечебного растворения тромба в зависимости от сроков его формирования, активности и числа тромбоцитов, состава крови и других факторов, прямо и косвенно влияющих на полноту контракции.

Контракция сгустка крови и тромбов при остром ишемическом инсульте.

Непосредственной причиной ишемического инсульта является острая гипоперфузия головного мозга, обусловленная тромбозом или тромбоэмболией мозговых артерий, от локализации и размеров которых прежде всего зависит обширность и тяжесть повреждения. Настоящая работа является первым исследованием контракции сгустков крови при ишемическом инсульте.

Морфологические признаки прижизненной контракции церебральных тромбов

Ранее было показано, что морфологическим признаком контракции сгустков крови, как *in vitro*, так и *in vivo*, является деформация эритроцитов, которые меняют двояковогнутую форму на многогранную [Cines, 2014]. Чтобы убедиться в том, что церебральные тромбы претерпевают прижизненную контракцию, нами были изучен клеточный состав церебральных тромбов у пациентов с ишемическим инсультом, извлеченных с помощью аспирационной тромбэктомии. При электронномикроскопическом исследовании церебральных тромбов обнаружено, что деформированные эритроциты составляют более половины всех форменных элементов крови, причем многогранные эритроциты, или «полиэдроциты», составляли примерно 80% от всех эритроцитов (рисунок 12).

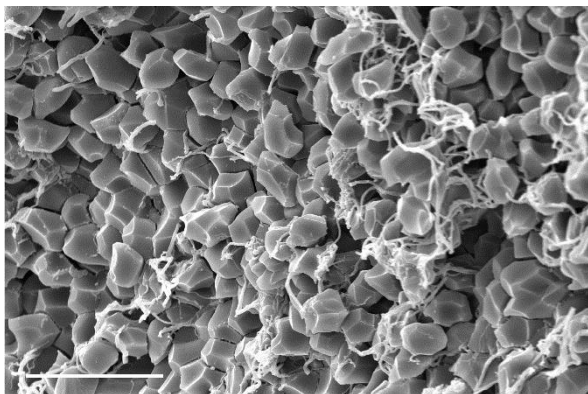


Рисунок 12. Сканирующая электронограмма церебрального тромба, иллюстрирующая высокое содержание эритроцитов многогранной формы (полиэдроцитов) – структурного признака прижизненной контракции тромба. Линейка = 15 μm .

Это подтверждают факт прижизненного сжатия или контракции церебральных тромбов, которые могут быть важным патогенетическим механизмом модуляции кровотока при тромботической окклюзии мозговых артерий.

Результаты исследования контракции сгустков, образованных в крови пациентов с острым ишемическим инсультом, представлены на рисунке 13. Анализ показывает, что интенсивность контракции сгустков в крови пациентов в острой фазе ишемического инсульта достоверно снижена по сравнению с кровью здоровых доноров. Об этом свидетельствуют более чем 2-кратное снижение средней степени и скорости контракции, а также существенное увеличение продолжительности лаг-периода при ишемическом инсульте.

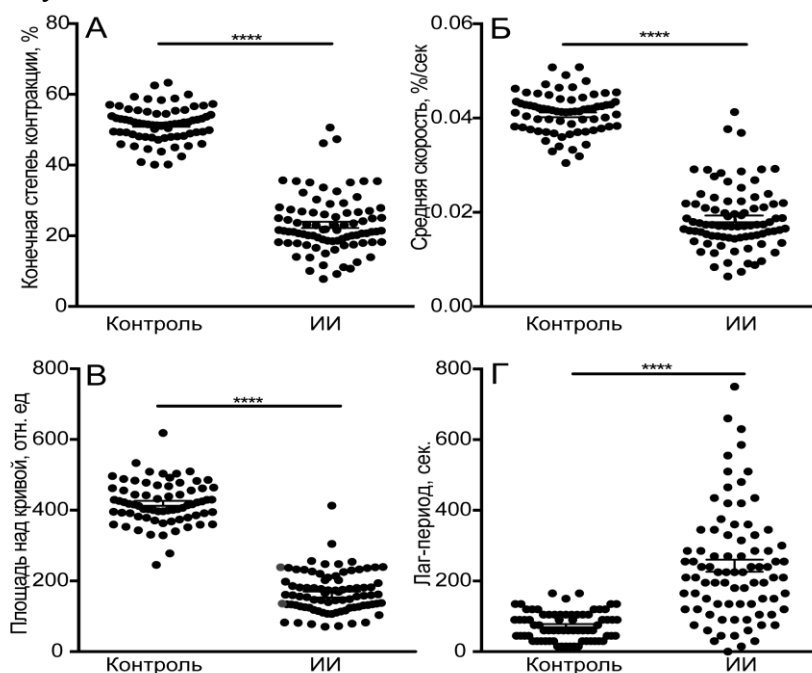
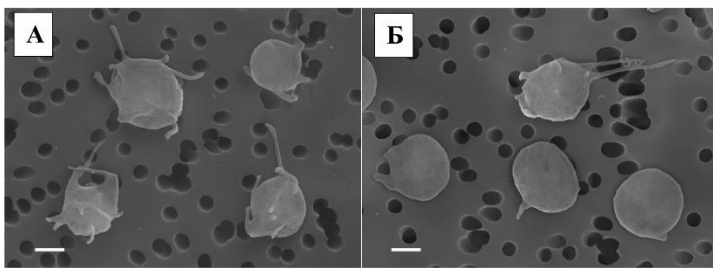


Рисунок 13. Параметры контракции сгустков крови у пациентов с ишемическим инсультом (n=85) по сравнению со здоровыми донорами (n=80). (А) Степень контракции, (Б) средняя скорость контракции, (В) площадь над кинетической кривой и (Г) лаг-период контракции. ****p<0,0001

Поскольку сократительная функция тромбоцитов имеет решающее значение в контракции сгустков крови, мы изучали функциональное состояние тромбоцитов при ишемическом инсульте с использованием проточной цитометрии. Функцию тромбоцитов оценивали по способности экспрессировать адгезивный белок Р-селектин и связывать фибриноген через активный интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$. По данным проточной цитометрии, у пациентов с ишемическим инсультом доля «спонтанно» активированных тромбоцитов по уровню экспрессии Р-селектина была достоверно повышена по сравнению со значениями здоровых доноров и составляла в среднем $9,9 \pm 5,1\%$ и $3,3 \pm 0,8\%$, соответственно ($p < 0,05$). Однако, на фоне исходной повышенной активации реакция тромбоцитов на стимуляцию под действием активирующего пептида (TRAP) у пациентов была ослаблена. После добавления TRAP у пациентов средняя доля тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, составляла 72%, что достоверно меньше по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров 84% ($p < 0,01$). Активация интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ в ответ на стимуляцию тромбоцитов также была существенно снижена при ишемическом инсульте и составляла в среднем 43% фибриноген-связывающих клеток по сравнению с 58% у здоровых доноров ($p < 0,001$). Результаты сканирующей электронной микроскопии тромбоцитов, выделенных из крови, показали, что у пациентов с острым ишемическим инсультом доля активированных клеток составляла 34%, тогда как в контроле их число не превышало 9% ($p < 0,01$) (рисунок 14).



формы клеток. N>200. Линейка = 1 µm.

Рисунок 14. Сканирующая электронная микроскопия частично активированных тромбоцитов пациента с ишемическим инсультом (А) и покоящихся изолированных тромбоцитов здорового донора (Б). Активация тромбоцитов из крови пациента с ишемическим инсультом выражается в появлении филоподий (мембранных выростов) и изменении

Таким образом, обнаружено снижение контракции сгустков крови при остром ишемическом инсульте, которое объясняется дисфункцией тромбоцитов вследствие их хронической активации. Кроме того, подавление контракции может быть обусловлено нарушением клеточного и биохимического состава крови. Независимо от механизма, нарушение контракции внутрисосудистого сгустка может усугублять тромботическую обструкцию мозговых артерий и играть важную роль в патогенезе ишемического инсульта.

Контракция сгустков крови при венозных тромбоэмболических осложнениях

Венозные тромбоэмболические осложнения включают в себя тромбоз глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей и, как частое и опасное осложнение, - тромбоз легочной артерии (ТЭЛА). Самой общей причиной ВТЭО является сочетание повышенного коагуляционного потенциала крови, изменение гемореологии и локальная дисфункция и/или деструкции эндотелия, образующие классическую триаду Вирхова [Dickson, 2009]. Несмотря на большое число исследований по ВТЭО, роль контракции сгустков крови и сократительной функции тромбоцитов в венозном тромбозе не изучена.

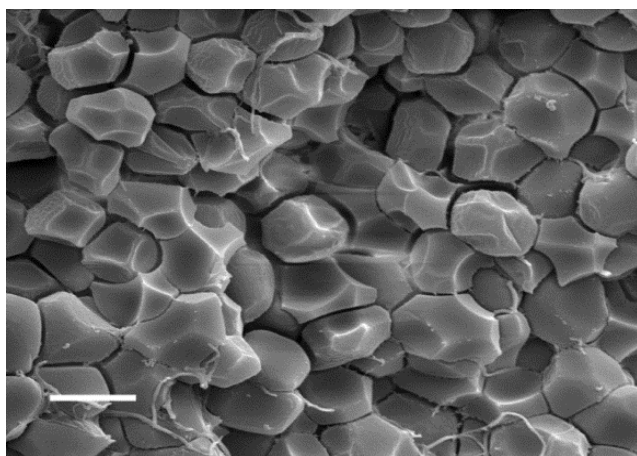


Рисунок 15. Сканирующая электронограмма венозного тромба, показывающая высокое содержание эритроцитов многогранной формы (полиэдроцитов) – структурного признака прижизненной контракции тромба. Линейка – 5 µm.

Структурным доказательством прижизненной контракции венозных тромбов являются деформированные эритроциты (полиэдроциты и промежуточные формы), которые вместе составляли 80% от всех эритроцитов (рисунок 15).

Параметры контракции сгустков в крови пациентов с ВТЭО были достоверно снижены по сравнению с кровью здоровых доноров (рисунок 16). Об этом свидетельствуют достоверное снижение средней скорости, степени контракции сгустка крови, площадь над кинетической кривой и удлинение лаг-периода у пациентов с ВТЭО по сравнению со здоровыми донорами.

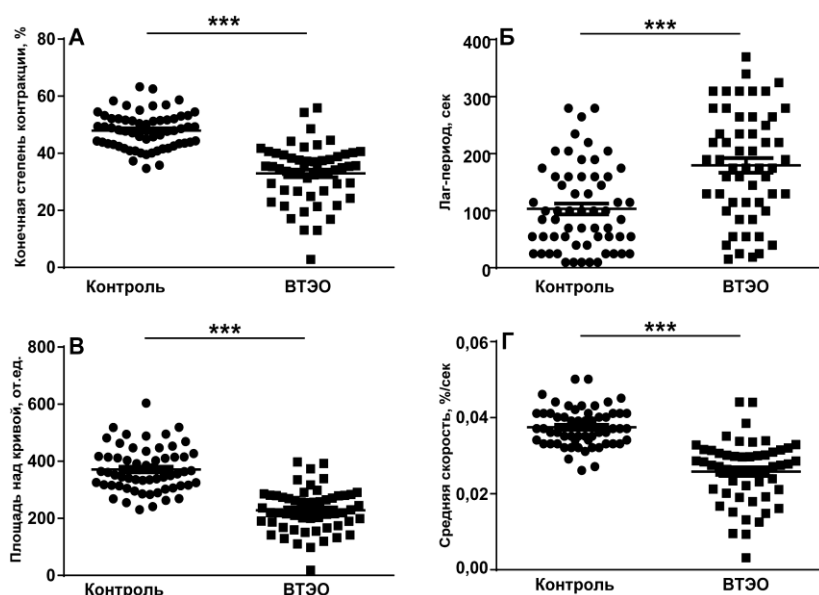


Рисунок 16. Параметры контракции сгустков крови у пациентов с ВТЭО (n=55) по сравнению со здоровыми донорами (n=60). (А) Конечная степень контракции, (Б) лаг-период, (В) площадь над кинетической кривой, (Г) средняя скорость контракции. ***p<0,001

Как и при ишемическом инсульте, при ВТЭО обнаружены достоверные изменения функционального состояния тромбоцитов. По данным проточной цитометрии, на фоне спонтанной активации реакция тромбоцитов из крови пациентов с ВТЭО на стимуляцию под действием TRAP была ослаблена. При ВТЭО после активации средняя доля тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, составляла 30%, тогда как в контроле - 43% (p<0,05). Активация интегрина $\alpha IIb\beta 3$ в ответ на стимуляцию тромбоцитов также была существенно снижена при ВТЭО; доли фибриноген-связывающих клеток при ВТЭО и в контроле составляли 41% и 60%, соответственно (p<0,05).

При изучении морфологических признаков исходной активации покоящихся тромбоцитов оказалось, что при ВТЭО доля спонтанно активированных тромбоцитов составляет порядка 75%, а у здоровых доноров - 21% (p<0,0001) (рисунок 17).

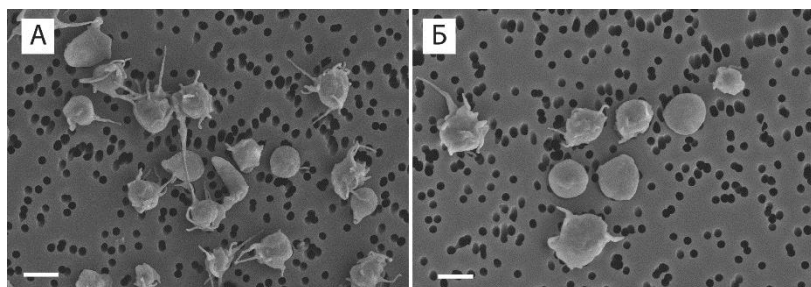


Рисунок 17. Сканирующая электронная микроскопия, показывающая частично активированные тромбоциты пациента с венозным тромбозом (А) и покоящиеся, неактивированные тромбоциты здорового донора (Б). Линейка = 2 μ m.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Явление спонтанного сжатия сгустков крови, называемое контракцией или ретракцией, представляет собой сравнительно малоизученный биохимический и биомеханический процесс структурного ремоделирования гемостатических сгустков и обтурационных тромбов. С использованием оригинальной количественной методики изучения контракции сгустка крови нами установлено, что контракция сгустков крови – это многофазный и многофакторный процесс, который определяется прежде всего числом и функциональным состоянием тромбоцитов, но при этом зависит от клеточного и белкового состава крови. Тест кинетики контракции сгустков крови успешно апробирован в клинических условиях для изучения патогенетической роли контракции сгустков крови при артериальном и венозном тромбозе. Полученные результаты раскрывают новые

биохимические и клеточные механизмы гемостаза и подводят научное основание под разработку новых методов прогноза, профилактики и лечения тромботических состояний.

ВЫВОДЫ

1. Разработана новая количественная методика оценки динамики контракции сгустков крови, основанная на автоматическом измерении размера сгустка в процессе его сжатия и определении кинетических параметров.
2. Скорость и полнота контракции сгустков крови зависят от клеточного и белкового состава крови и обусловлены числом и функциональным состоянием тромбоцитов, гематокритом, концентрацией фибриногена, активностью тромбина и фактора XIIIa.
3. Экспрессия тканевого фактора на поверхности активированных моноцитов и последующая генерация эндогенного тромбина стимулируют контракцию сгустков крови.
4. Лизис сгустков крови, претерпевших контракцию, значительно ускорен при внутреннем фибринолизе, но заметно снижен при внешнем фибринолизе
5. Способность сгустков крови к контракции снижена у пациентов с острым ишемическим инсультом и венозными тромбоэмболическими осложнениями вследствие хронической активации, энергетического истощения и дисфункции тромбоцитов.
6. У пациентов с венозными тромбоэмболическими осложнениями снижение контракции сочетается с более высоким риском тромбоэмболии, что указывает на прогностическое значение лабораторного теста контракции сгустков крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. Tutwiler, V. Blood clot contraction differentially modulates internal and external fibrinolysis / V. Tutwiler, **A.D. Peshkova**, G. Le Minh, S. Zaitsev, R.I. Litvinov, D.B. Cines, J.W. Weisel // Journal of Thrombosis and Haemostasis – 2019. – V.17(2). – P.361-370. (Scopus, WoS)
2. Tutwiler, V. Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes / V. Tutwiler, A.R. Mukhitov, **A.D. Peshkova**, G. Le Minh, R.R. Khismatullin, J. Vicksman, C. Nagaswami, R.I. Litvinov, J.W. Weisel // Scientific Reports – 2018. – V.8(1). – P.17907. (Scopus, WoS)
3. **Peshkova, A.D.** Reduced contraction of blood clots in patients with venous thromboembolism is a possible thrombogenic and embologenic mechanism / **A.D. Peshkova**, D.V. Malyasyov, R.A. Bredikhin, G. Le Minh, I.A. Andrianova, V. Tutwiler, C. Nagaswami, J.W. Weisel, R.I. Litvinov // TH Open – 2018. – V.2(1). – P.e104-e115.
4. Хисматуллин, Р.Р. Морфологические признаки прижизненной контракции (ретракции) тромботических эмболов /Р.И. Хисматуллин, А.З. Шакирова, **А.Д. Пешкова**, Р.И. Литвинов // Казанский медицинский журнал – 2018. – Т.99(1). – С.42–47. (ВАК, РИНЦ), автора - 0,2 пл.
5. Бредихин, Р.А. Уменьшение контракции (ретракции) сгустков крови у больных с венозными тромбоэмболическими осложнениями / Р.А. Бредихин, **А.Д. Пешкова**, Д.В. Малясев, М.В. Батракова, Ж. Ле Минь, М.В. Панасюк, Л.С. Фатхуллина, И.М. Игнатьев, Р.Н. Хайруллин, Р.И. Литвинов // Ангиология и сосудистая хирургия – 2018. – Т.24(1). – С.21-28. (ВАК, РИНЦ, Scopus)

6. Tutwiler, V. Blood clot contraction is impaired in acute ischemic stroke / V. Tutwiler, **A.D. Peshkova**, I.A. Andrianova, D.R. Khasanova, J.W. Weisel, R.I. Litvinov // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* – 2017. – V.37(2). – P.271-279. (Scopus, WoS)
7. **Peshkova, A.D.** Activated monocytes enhance platelet-driven contraction of blood clots via tissue factor expression / A.D. Peshkova, G. Le Minh, V. Tutwiler, I.A. Andrianova, J.W. Weisel, R.I. Litvinov. // *Scientific Reports* – 2017. - V.7(1). – P.5149. (Scopus, WoS)
8. **Пешкова, А.Д.** Зависимость контракции (ретракции) сгустка от молекулярного и клеточного состава крови / **А.Д. Пешкова**, А.П. Ложкин, Л.С. Фатхуллина, Д.В. Малясев, Р.А. Бредихин, Р.И. Литвинов // *Казанский медицинский журнал* – 2016. – Т.97(1). – С.70-77. (ВАК, РИНЦ)
9. **Пешкова, А.Д.** Контракция (ретракция) сгустков крови у больных с острым ишемическим инсультом / **А.Д. Пешкова**, М.В. Сайхунов, Т.В. Дёмин, А.П. Ложкин, М.В. Панасюк, Р.И. Литвинов, Д.Р. Хасанова // *Журнал неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова* – 2016. – Т.116(3). – С.9-17. (ВАК, РИНЦ, Scopus)
10. 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, **A.D. Peshkova**, T. Lebedeva, F.I. Ataullakhanov, K.L. Spiller, D.B. Cines, J.W. Weisel / *Blood* – 2016. – V.127(1). – P.149-159. (Scopus, WoS)
11. Патент 2596926 – Российская федерация. Способ оценки динамики и полноты ретракции (контракции) кровяного сгустка. - / Р.И. Литвинов, А.П. Ложкин, Ф.И. Атауллаханов, **А.Д. Пешкова**. - №2514154579/10: заявл. 31.12.2014; опубл. 10.09.16

Материалы и тезисы конференций

1. **Пешкова, А.Д.** Влияние контракции сгустков крови на скорость внешнего и внутреннего фибринолиза / **А.Д. Пешкова**, Р.И. Литвинов // *Материалы 2-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Биохимия – основа наук о жизни»* – Казань, 7-9 ноября 2019. – С.62-63.
2. **Пешкова, А.Д.** Влияние контракции сгустков крови на кинетику их протеолитического расщепления (фибринолиз) / **А.Д. Пешкова**, Р.И. Литвинов // *Материалы объединенного научного форума (VI Съезд Физиологов СНГ; VI Съезд биохимиков России; IX Российский симпозиум «Белки и пептиды»)* – Сочи, 1-6 октября 2019. – Т.2. – С.98.
3. **Пешкова, А.Д.** Нарушение контракции сгустков крови как патогенетический фактор и критерий послеоперационного тромбоза / **А.Д. Пешкова**, Н.Г. Евтюгина, Р.И. Литвинов // *Сборник научных трудов V Международной конференции «Постгеном'2018»*. – Москва - Казань, 29 октября – 2 ноября 2018. – С.292.
4. **Peshkova, A.** A link between continuous immune activation of platelets and impaired contraction of blood clots / **A. Peshkova**, G. Le Minh, I. Andrianova, R. Litvinov // In: *The Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis 2018 jointly with the 9th Russian Conference on Clinical Hemostasiology and Hemorheology*. – Saint Petersburg, 4-6 October 2018. – P.201-202.
5. **Peshkova, A.D.** Contraction (retraction) of blood clots as a pathogenic factor in thrombosis / **A.D. Peshkova**, R.I. Litvinov // *European Journal of Clinical Investigation*. – Barcelona, Spain, 30 May – 1 June 2018. – V.48(1). – P.126.
6. **Пешкова, А.Д.** Контракция (ретракция) сгустка крови как лабораторный тест и патогенетический фактор тромбоза / **А.Д. Пешкова**, Р.И. Литвинов // *Вестник гематологии*. – Санкт-Петербург, 22-23 марта 2018. – Т.14(1). – С.57-58.

7. **Пешкова, А.Д.** Частичная рефрактерность тромбоцитов при тромботических состояниях / **А.Д. Пешкова**, Ж. Ле Минь, И.А. Андрианова // Материалы X Всероссийского Конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-2017». – Казань, 25-28 октября 2017. – С.293-294.
8. **Пешкова, А.Д.** Состав крови модулирует степень контракции (ретракции) сгустка / **А.Д. Пешкова** // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова – Воронеж, 18-22 октября 2017. – С.1536-1538.
9. **Peshkova, A.D.** Contraction of blood clots is promoted by tissue factor-expressing activated monocytes / **Peshkova A.D.**, Le Minh G., Tutwiler V., Andrianova I.A., Weisel J.W., Litvinov R.I. // Research and Practice in Thrombosis Haemostasis. – Berlin, Germany, 8-13 July 2017. – V.1(l). – P.466.
10. **Пешкова, А.Д.** Активированные моноциты усиливают контракцию сгустков: связь воспаления и свертывания крови / **А.Д. Пешкова**, Л.М. Жанг, И.А. Андрианова, Р.И. Литвинов // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Новые механизмы аутоиммунного ответа и развития опухоли». – Казань, 31 мая-2 июня 2017. - С.72-73.
11. **Пешкова, А.Д.** Нарушения контракции (ретракции) сгустков крови при тромбозе / **А.Д. Пешкова**, Д.А. Малясев, Р.А. Бредихин, М.В. Сайхунов, Т.В. Демин, Д.Р. Хасанова, Р.И. Литвинов // Гемостаз, тромбоз и реология. – Москва, 20-22 октября 2016. – Т.3 (67). - С. 332.
12. **Пешкова, А.Д.** Нарушения контракции сгустков крови при остром венозном тромбозе / **А.Д. Пешкова**, Д.В. Малясёва, Р.А. Бредихин, Ле Минь Жанг, Р.И. Литвинов // Сборник тезисов международной конференции «Трансляционная медицина 2016». – Казань, 13-15 октября 2016. - С.81.
13. Ле Минь, Ж. Связь между воспалением и свертыванием крови: активированные моноциты усиливают контракцию сгустка / Ж. Ле Минь, **А.Д. Пешкова**, И.А. Андрианова, V. Tutwiler, Р.И. Литвинов // Сборник тезисов международной конференции «Трансляционная медицина 2016». – Казань, 13-15 октября 2016. - С.59.
14. **Пешкова, А.Д.** Роль фактора Ха и эндогенного тромбина в контракции сгустка крови / **А.Д. Пешкова** // Материалы VIII Всероссийского с международным участием конгресса молодых ученых-биологов. – Новосибирск, 5-9 октября 2015. - С.15.
15. Tutwiler, V. Efficacy and mechanism of clot contraction are determined by blood composition / V. Tutwiler, R.I. Litvinov, A.P. Lozhkin, **A.D. Peshkova**, T. Lebedeva, F.I. Ataulakhanov, D.B. Cines, J.W. Weisel // Journal of Thrombosis and Hemostasis, Toronto, Canada, 20-25 June 2015. – V.13(2). – P.212.
16. **Пешкова, А.Д.** Роль фактора XIIIa и ионов кальция в контракции кровяного сгустка / **А.Д. Пешкова**, А.П. Ложкин // 19 -я Международная Пушкинская школа конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века" Пушкино, 20-24 апреля 2015. - С.362-363.

Адрес для отзывов об автореферате: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, Казанский федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю диссертационного совета КФУ.03.07 к.б.н., доц. Кравцовой Ольге Александровне, e-mail:okravz@yandex.ru

Е-mail автора: alinapeshkova26@gmail.com