Тромбоз Гемостаз Реология

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Выпускается один раз в квартал
Основан в 2000 г.

Quaterly
Since 2000

№ 4

Декабрь 2006 г.

Научное общество **«Клиническая гемостазиология»**
Научное общество **«Клиническая гемореология»**

Учредитель: Е.В.Ройтман
Издатель: ООО «Гемостаз и реология» лиц. ИД № 05534
Журнал зарегистрирован Министерством печати и информации РФ
Свидетельство о регистрации ПИ №779636
Тираж 1500 экз.

Цена свободная
Подписной индекс Роспечать «Журналы России»
для организаций — 18363
для индивидуальных подписчиков — 18362

Информационная поддержка: Интернет-сайт «Гемостаз и реология» *www.hemostas.ru*

Контактный адрес: *Е.В.Ройтман* — РНЦХ РАМН, Россия, 119992, Москва, Абрикосовский пер. 2;
Тел./факс: (495)248-0662, 8 903 144-4634, e-mail: **hemostas@aha.ru**

В конце декабря 2006 года от нас ушел Зиновий Соломонович Баркаган.

Где взять такие слова, которые могли бы отразить горечь этой потери? Как оценить глубину скорби об этом Человеке, Учителе и Друге? Нет таких слов!

Мы искренне соболезнуем родственникам, друзьям и ученикам Зиновия Соломоновича.

Мы изменили содержание №4: в нем публикуется только биография Зиновия Соломоновича и его последняя статья, поступившая в журнал.

Продолжение дела Зиновия Соломоновича будет лучшим памятником Великому Гемостазиологу, и мы выпускаем этот номер журнала, объединив его с №1, 2007.

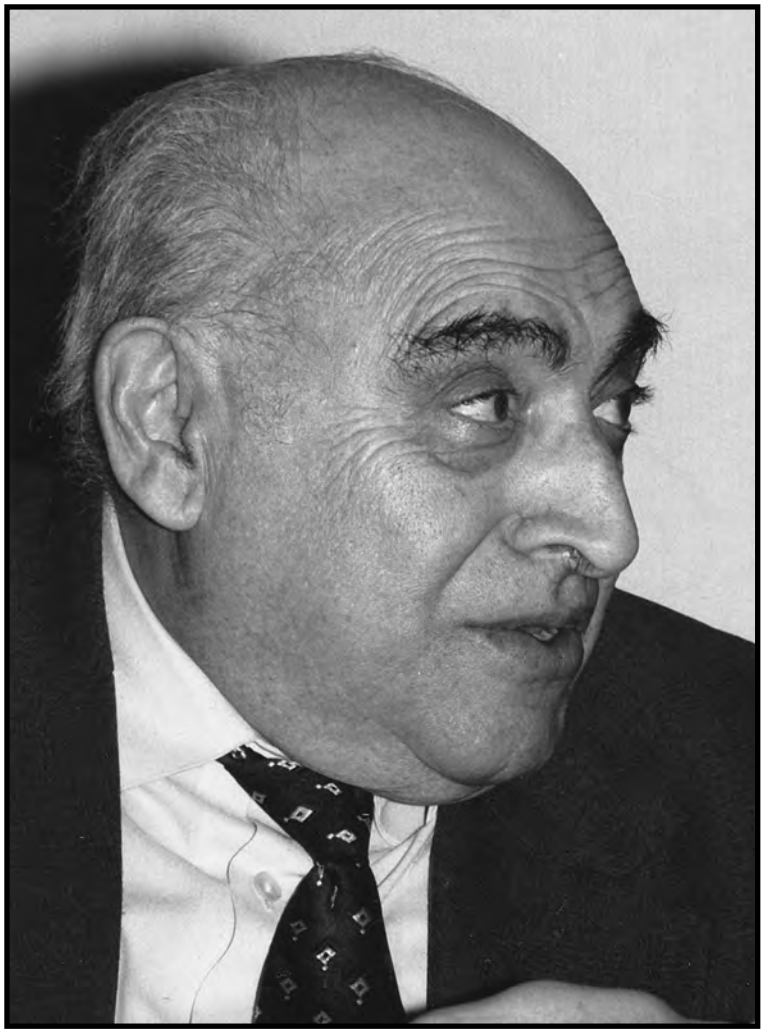
Скорбим и помним Вас, Зиновий Соломонович!

Редколлегия
Редакция
Издатель

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

БИОГРАФИЯ



БАРКАГАН ЗИНОВИЙ СОЛОМОНОВИЧ

Заслуженный деятель науки РФ, лауреат государственной премии СССР, член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор, директор Алтайского филиала ГУ ГНЦ РАМН, научный руководитель Федерального центра по диагностике и лечению нарушений гемостаза при ЦНИЛ Алтайского медицинского университета.

Родился 25 апреля 1925 года в г. Одессе в семье известного профессора-терапевта. Отец — Баркаган Соломон Львович (1891–1967). Мать — Баркаган Минна Александровна (1902–1966).

В 1946 году З. С. Баркаган окончил лечебный факультет Одесского медицинского института. До 1950 года работал врачом-лаборантом и ординатором клиники госпитальной терапии под руководством академика М. А. Ясиновского и профессора Л. А. Дмитренко. После защиты кандидатской диссертации на тему: «Исследование сосудодвигательной реактивности на холод при предгипертонических состояниях, гипертонической болезни и других внутренних заболеваниях», в которой был обоснован способ выявления генетической предрасположенности к артериальной гипертензии, в 1950 году переехал в Душанбе, где прошел путь от ассистента до заведующего кафедрой госпитальной терапии Таджикистанского медицинского института (1950–1956). В этот период им был внесен фундаментальный вклад в расшифровку патогенеза и разработку новых эффективных методов лечения отравлений ядами змей и членистоногих Средней Азии. Труды автора по этой проблеме пе-

реиздавались в ряде зарубежных стран, они были отмечены избранием З. С. Баркагана членом Лондонского королевского общества естествоиспытателей (1955). В 1963 году защитил докторскую диссертацию на тему: «Диагностика, клиника и лечение отравлений ядами змей и членистоногих Средней Азии». В 1955 году организовал кафедру пропедевтики внутренних болезней Алтайского медицинского университета, которой руководил до 1997 года. С 1997 года почетный профессор этого университета и научный руководитель Академического центра по патологии гемостаза при ЦНИЛ Алтайского медицинского университета. С 2003 года — директор Алтайского филиала Центрального института гематологии (ГНЦ РАМН).

З. С. Баркаган внес большой вклад в развитие отечественной гемостазиологии, в том числе, в изучение патогенеза, клиники, диагностики ДВС-синдрома, а также тромбофилий. В 60-х годах он впервые предложил применение свежезамороженной плазмы для лечения ДВС-синдрома. Этот метод терапии, снизивший летальность больных в 3–5 раз, остается основополагающим и широко применяется при лечении критических и терминальных состояний. Исследования З. С. Баркагана по терапии ДВС-синдрома при критических и терминальных состояниях отмечены присуждением ему Государственной премии СССР (1987). Им впервые была определена также ранее неизвестная закономерность трансформации асептических форм ДВС-синдрома в септические, установлена связь этого феномена с нарушением барьерной функции кишечника, что послужило основанием к применению в процессе лечения ДВС-синдрома санации кишечника, чем подавляются рецидивы процесса и снижается летальность больных.

В спектр интересов З. С. Баркагана постоянно входят проблемы клиники и лечения различных видов кровоточивости и тромбофилических состояний. Под его руководством разработаны новые методы диагностики и лечения гемофилических артропатий, создана оригинальная методика артрофонографии, обосновано использование радионуклидов и магнитно-резонансной томографии в диагностике гемофилических артрозов, изучены свойства синовиальной жидкости на разных этапах воспалительного процесса в суставах, впервые в мировой литературе описан и детально изучен «вторичный ревматоидный синдром» гемофилического генеза (синдром Баркагана-Егоровой).

Большой вклад внесен З. С. Баркаганом в развитие учения о геморрагических мезенхимальных дисплазиях, определены наиболее частые виды этой патологии, типовые нарушения при них разных звеньев системы гемостаза, методы патогенетической терапии больных.

З. С. Баркаган внес существенный вклад в изучение и разработку методов лечения различных видов тромбофипий и онкотромбозов.

Им и его сотрудниками создана первая отечественная классификация этих состояний, разработана и внедрена в практику система оригинальных методов диагностики и лечения антифосфолипидного синдрома, успешного преодоления при этом синдроме упорного невынашивания беременности. Использование данной методики позволило почти в 100 % случаев завершать беременность рождением здоровых доношенных детей.

Работы З. С. Баркагана по зоотоксикологии и гематологии отмечены присуждением ему Международной премии имени П. Эрлиха.

Значительна роль З. С. Баркагана в качестве организатора здравоохранения. Еще в 60-х годах он организовал один из первых в стране центр по диагностике и лечению нарушений гемостаза. На базе этого центра в 80–90-х годах был налажен выпуск отечественных диагностических тест-систем, что расширило возможности врачей в выявлении и успешном лечении многих видов патологии системы гемостаза.

З. С. Баркаган автор более 500 статей в периодической печати, 32 монографий и глав в руководствах и справочниках, 24 изобретений и патентов. Основные монографии и руководства: «Ядовитые змеи и их яды» (1967), «Геморрагические заболевания и синдромы» (1980, 1988), главы в руководствах по гематологии (1979, 1985, 2005) и онкогематологии (2006), монографии: «Основы диагностики нарушений гемостаза» (1999), «Очерки антитромботической фармакопрофилактики и терапии» (2000), главы в «Справочнике практического врача» (2000), «Справочнике врача общей практики» (2003), «Справочнике по неотложной помощи» и др.

В 1992 году он избран членом-корреспондентом РАМН и является руководителем секции биотоксинологов РАН.

Под его руководством выполнены 35 докторских и 82 кандидатских диссертаций. Он является членом правления Всероссийского общества гематологов и трансфузиологов, членом правления Московского общества терапевтов, членом Международной

ассоциации биотоксинологов (1975), председателем Проблемной комиссии РАМН и МЗ РФ «Патология гемостаза» (1980), членом Международной ассоциации по гемостазу и тромбозам (1998), членом правления Европейской ассоциации трансфузиологов (1999). Выступал с лекциями в зарубежных университетах (Германия, США, Китай и др.).

Является членом редакционных коллегий и советов журналов: «Проблемы гематологии и переливания крови», «Гематология и трансфузиология», «Клиническая лабораторная диагностика», «Международный журнал медицинской практики», «Сибирский медицинский журнал», «Патология кровообращения и кардиохирургия», «Тромбоз, гемостаз и реология», «Вопросы гематологии/онкологии и иммунологии в педиатрии», соредактором раздела «Гематология и переливание крови» Большой медицинской энциклопедии (III изд.).

Заслуженный деятель науки РФ (1982), лауреат Государственной премии СССР (1987), лауреат премии имени И. И. Демидова (1984, 2005), лауреат академической премии имени М. П. Кончаловского (1989), премии имени И. И. Ползунова (2002), награжден почетной медалью и дипломом имени П. Эрлиха за особые достижения в медицине (2005). Почетный профессор Алтайского медицинского университета (1997), лауреат премии Алтайского края (1999), почетный гражданин г. Барнаула (2002).

КОМПЛЕКСНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СКРИНИНГОВОГО И КОМПЕНСИРУЮЩЕГО ЛЕБЕТОКСОВОГО ТЕСТА В ВЫЯВЛЕНИИ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА

З. С. Баркаган, Г. В. Сердюк, Л. П. Цывкина, А. П. Момот

Алтайский филиал ГНЦ РАМН, г. Барнаул

THE USAGE OF THE SCREENING AND THE COMPENSATIVE LEBETOX TESTS FOR REVEALING OF LUPUS ANTICOAGULANT

Z. S. Barkagan, G. V. Serduk, L. P. Tsyvkina, A. P. Momot

Altay Branch of HRC RAMS, Barnaul

Для идентификации эффектов «волчаночных антикоагулянтов» (ВА) в диагностике антифосфолипидного синдрома (АФС) широко используются скрининговые тесты с фосфолипидзависимыми коагулазами змеиных ядов — разведенным ядом гадюки Расселла (*Vipera Russelli*) или гюрзы среднеазиатской (*Vipera lebetina turanica*).

Исследование авторов показали, что в качестве подтверждающей (коррекционной) лебетоксовой пробы может быть использован тромбоцитарно-ядовый компонент, приготовленный на основе использования яда гюрзы в диагностике ВА при АФС.

The importance of the antibody to β2-glycoprotein-I determination for recognizion of risk thrombosis in the antiphospholipid syndrome

The screening effects of lupus anticoagulant (LA) used tests with the dilute Russelli viper venom time and dilute Vipera lebetina turanica venom time of the diagnostics antiphospholipid syndrome (APS). The authors of the research showed of the possibility to use lebetox- platelets of the reagent in the identification LA.

Key words: *lupus anticoagulant — antiphospholipid syndrome — dilute Russelli viper venom time — dilute Vipera lebetina turanica venom time.*

ВВЕДЕНИЕ

В диагностике антифосфолипидного синдрома (АФС) важное место занимает использование коагуляционных тестов со змеиными ядами, выявляющих эффекты волчаночных антикоагулянтов (ВА). Из них по современным данным наиболее специфичными и информативными являются скрининговые тесты с ядами, активирующими факторы свертывания крови X и V. Для этого используется либо разведенный яд гадюки Расселла (*Vipera*

Russelli), либо гюрзы среднеазиатской (*Vipera lebetina turanica*) [1–19].

Вместе с тем, согласно международным рекомендациям при выявлении гипокоагуляции в этих ядовых тестах выполняются дополнительные коррекционные тесты, что позволяет дифференцировать эффекты ВА и дефицит факторов X, V и II. С этой целью выполняются дополнительные (компенсирующие) ядовые тесты, в которых для ингибиции эффектов ВА используется насыщение исследуемой плазмы фосфолипидными мембранами, полученными из взвеси разрушенных тромбоцитов здорового человека. В этих условиях в нарушенных ядовых тестах происходит нормализация времени свертывания.

Нами в течение ряда лет широко используется в выявлении ВА этот комплекс тестов со змеиными ядами [1–7].

Цель настоящей работы — продемонстрировать эффективность использования указанных тестов, выполненных с разведенным ядом гюрзы (лебетокс) до и после добавления к бедной тромбоцитами плазме (БТП) больного фосфолипидных мембран, полученных из разрушенных тромбоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлены результаты обследования скринингового и подтверждающего теста с разведенным ядом гюрзы на образцах плазмы 15 больных (4 мужчин и 11 женщин, средний возраст — 35,0 ± 2,1 года) с первичным АФС. Комплексная диагностика ВА базировалась как на ядовых тестах, так и на других фосфолипидчувствительных пробах [2; 4; 7].

У пациентов с первичным АФС тромбозы отмечались у 7 больных, невынашивание беременности (2 и более выкидыша) — у 8 женщин.

В контрольную группу вошли 50 практически здоровых людей (30 женщин и 20 мужчин в возрасте от 22 до 45 лет, средний возраст — 36,4 ±3,2 года).

Все исследования проводили на оптическом коагулометре «Thrombotimer — 4» фирмы «Behnk Elektronik».

Статистическую обработку результатов исследования проводилась с использованием статистических программ «Statistica» с использованием t критерия Стъюдента.

Реактивы

1. Лебетокс (стандартизованный, лиофильно высушенный яда гюрзы среднеазиатской). Для приготовления маточного раствора лебетокса навеску яда гюрзы разводят дистиллированной водой. Этот маточный раствор оставляют на сутки при +2 ° … +8 °С для стабилизации активности «созревания». Из маточного раствора, путем последовательных разведений дистиллированной водой, готовят рабочий раствор лебетокса с конечной концентрацией, дающей свертывание при смешивании с БТП нормальной плазмы в отношении 1:1 за 35–40 с.
2. Лиофильно высущенный тромбоцитарно-ядовый компонент.
   Для стандартизации подтверждающего теста использовались отмытые и разрушенные тромбоциты, взвесь которых смешивалась с рабочим раствором яда гюрзы, активностью 35–40 с и подвергалась лиофильной сушке.
   Отмытые и разрушенные тромбоциты здорового человека готовили следующим образом: стабилизированную 3,8 % раствором цитрата натрия венозную кровь (1: 9) центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. В полученной богатой тромбоцитами плазме подсчитывали количество тромбоцитов в камере Горяева и с помощью трис HCI-буфера (0,05 М рН 7,4) доводили количество тромбоцитов в реагенте до 100×10^9/л. Плазму с тромбоцитами центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. Полученные в осадке тромбоциты дважды отмывали в трис буфере, доводя его объем до первоначального объема плазмы. Суспензию тромбоцитов замораживали при – 16…– 20 °С в течение 30 мин и размораживали на водяной бане при +37 °С. Процедуру замораживания и оттаивания повторяли трижды. Суспензию отмытых и разрушенных тромбоцитов смешивали с образцами рабочего раствора яда гюрзы и лиофильно высушивали. Для приготовления рабочего раствора тромбоцитарно-ядовый компонент разводили в 5,0 мл дистиллированной воды.
3. Хлорид кальция 0,277 % раствор.
4. Бедная тромбоцитами плазма (БТП) здорового.
5. БТП исследуемого больного с АФС и положительным скрининговым лебетоксовым тестом.

Ход определения

Скрининговая проба. В кювету вносили 0,1мл БТП исследуемого и добавляли 0,1 мл рабочего раствора яда гюрзы (лебетокса). Смесь инкубировали 5 мин

Таблица 1

Результаты комплексного применения лебетоксового (скринингового и компенсирующего) теста в выявлении эффектов волчаночного антикоагулянта

Ф. И. О., возраст	Лебетоксовый тест					
	Скрининговый			Подтверждающий (с тромбоцитарными фосфолипидами)		
	Время свертывания, сек		Индекс удлинения времени свертывания Б/К	Время свертывания, сек		Индекс удлинения времени свертывания Б/К
	Контроль (К)	Больной (Б) 1		Контроль (К)	Больной (Б) 2	
1. К. Л.,45	36	48	1,3	30	34	1,1
2. К. Е., 26	34	50	1,5	29	36	1,2
3. В. М.,27	33	43	1,3	31	33	1,1
4. Е. М.,38	34	42	1,2	30	31	1,0
5. К. С.,29	35	48	1,4	29	30	1,0
6. Т. А.,43	34	63	1,9	30	34	1,1
7. Г. Н., 29	33	46	1,4	28	31	1,1
8. К. А., 44	34	49	1,4	31	37	1,2
9. М. А., 26	34	51	1,5	31	35	1,1
10. Б. Л., 30	34	41	1,2	32	30	0,9
11. И. Н., 28	34	54	1,6	30	38	1,2
12. Х. Е., 37	35	74	2,1	29	36	1,2
13. Л. М., 41	35	66	1,9	29	38	1,3
14. Ч. О., 39	34	45	1,3	31	30	0,9
15. К. Л., 44	33	44	1,3	28	29	1,0
X±m	34,1±0,7	50,9±2,3*	1,5±0,06*	29,9±0,3	33,5±0,3*	1,08±0,03*
Рк		<0,001	<0,001		>0,5	>0,5

*Примечание: * p <0,01 достоверное различие между группами.*

при +37 °С, затем в кювету вносили 0,1 мл раствора хлорида кальция и регистрировали время свертывания. Аналогичным образом исследовали БТП здоровых людей (контроль).

Компенсирующая проба. Проводили при выявлении гипокоагуляции в скрининговом тесте. В кювету вносили 0,1 мл БТП больного и добавляли 0,1 мл рабочего раствора тромбоцитарного — ядового компонента. Смесь инкубировали 5 мин при +37 °С, затем в кювету вносили 0,1 мл раствора хлорида кальция и регистрировали время свертывания. Аналогичные исследования проводили на БТП здорового (контроль).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты исследования приведены в **таблице 1**, из которой видно, что у всех обследованных больных с ВА отмечалось достоверное удлинение свертывания в скрининговом лебетоксовом тесте ($p < 0,001$).

При проведении компенсирующей пробы с тромбоцитарно-ядовым компонентом в компенсирующей пробе отмечалась нормализация или значительное и достоверное, по сравнению с контролем укорочение времени свертывания. Это наблюдалось у всех больных с АФС и исходно нарушенным временем свертывания в скрининговом лебетоксовом тесте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали возможность использования тромбоцитарно-ядового компонента в компенсирующей лебетоксовой пробе с разведенным ядом гюрзы среднеазиатской (*Vipera lebetina turanica*) в распознавании эффектов ВА.

ЛИТЕРАТУРА:

1. *Баркаган З. С., Цывкина Л. П., Мамаев А. Н., Цеймах И. Я. Анализ участия микромембран в гемокоагулирующих эффектах змеиных ядов//В кн: Актуальные*

проблемы герпетологии и токсинологии. Тольятти, 1995. — вып.1. — С.15–21.

2. Баркаган З. С., Сердюк Г. В., Цывкина Л. П., Момот А. П. Основы диагностики и терапии антифосфолипидного синдрома//М: Ньюдиамед. — 2003. — 45с.
3. Баркаган З. С., Сердюк Г. В., Цывкина Л. П., Момот А. П. Сравнительные данные о выявлении эффектов антикоагулянтов волчаночного типа с помощью ядов гадюки Расселла и гюрзы среднеазиатской//Бюллетень сибирской медицины. — 2004– Т.3. — № 1. — С.44–46.
4. Баркаган З. С. Антифосфолипидный синдром//Руководство по гематологии под редакцией А. И. Воробьева. М: Ньюдиамед, 2005. — Т..3. — С.142-147.
5. Сердюк Г. В., Дорохов А. Е., Цывкина Л. П. Динамика показателей ядовых коагуляционных тестов в плазме больных с волчаночными антикоагулянтами//Проблемы клинической и прикладной токсинологии. Ашхабад. — 1992. — С.36.
6. Сердюк Г. В. Новые аспекты диагностики и терапии первичного антифосфолипидного синдрома и его осложнений//Автореф. дис. … докт. мед. наук. — Барнаул, 2005. — 44 С.
7. Цывкина Л. П. Клинико-диагностическое значение герпетотоксинов в распознавании основных видов патологии системы гемостаза//Автореф. дис. … докт. мед. наук. — Барнаул, 1997. — 36 С.
8. Ames P. R., Iannaccone L., De Iasio R. et al. Improved comfirmation of weak lupus anticoagulants by employing sentitive reagents to the lupus anticoagulant//Blood coagul. Fibrinolysis. 2001. — V.12. — P.563-567.
9. Arnout J Antiphospholipid syndrome: diagnostic aspects of lupus anticoagulants//Thromb. Haemost, 2001. — V.6. — P.83–91.
10. Brandt J. T., Barna Z. K., Triplett D. A. Laboratory identification of lupus anticoagulants: Resalts of the Second international Workshop for identification of lupus a anticoagulants//Thromb. Haemost, 1995. — V.74. — №. 6. — P.1597–1603.
11. Cappucci G., Grandone E., Guiliani N. etal. Use of a commercial PNP as confirmatory test for delute Russelli viper venom time (dRVVT)//Thromb. Haemost, 1997. — Suppl. — Abstr. PS. — 1332–1362.
12. Exner T., Papadopulas G., Koutts J Use of a simplified delute Russel's viper venom time (dRVVT) confirms heterogeneity among»lupus anticoagulants"//Blood Coag. Fibrinol. — 1990. — №.1. — P.259-266.
13. Exner T., Triplett D. A., Taberner D., Machen S. Y. Guidelines for testing and revised criteria for the lupus anticoagulants. SSC subcommittee of the standartization of Lupus Anticoagulants//Thromb. Haemost., — 1991. — V.65. — P.320-325.
14. Exner T., Sochinsky C. L. Evalution of the DVV test IDW confirm system of diagnosis of Lupus anticoagulants//Thromb. Haemost. — 1993. — V.69. — №6. — P.1034.
15. Galli M., Dlott J., Norbis F. et al. Lupus anticoagulants are thrombosis: clinical of the assotiation of deferent coagulation immunologic tests//Thromb. Haemost. — 2000. — V.84. — P.1012–1016.
16. Jenings I., Mackie J., Arnout J. et al. Lupus anticoagulant testing using plasma spiked with monoclonal antibodies: performance in the UK NEQAS proficiency testing programme//Thromb. Haemost. — 2004. — V.2. — P.2178–2184.
17. Luddington R., Scales C., Baglin T Snake venom based assays for detection of the lupus anticoagulant|/Thromb. Haemost. — 1997. — suppl. — PS.1360. — P.332.
18. Thiagarajan P., Pengo V., Shapiro S. S. The use of the dilute Russelli viper venom time for the diagnosis of Lupus anticoagulants//Blood, 1986. — V.68. — №4. — P.869-874.
19. Triplett D. A. Coagulatoin Assay for the lupus anticoagulant: Review and critigue of current methodology//Stroke, suppl. 1, 1992. — V.23. — №2. — P.11–14.

Тромбоз Гемостаз Реология

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Выпускается один раз в квартал
Основан в 2000 г.

Quaterly
Since 2000

№ 1

Март 2007 г.

Учредитель: Е.В.Ройтман
Издатель: ООО «Гемостаз и реология» лиц. ИД № 05534
Журнал зарегистрирован Министерством печати и информации РФ
Свидетельство о регистрации ПИ №779636
Тираж 1500 экз.

Цена свободная
Подписной индекс Роспечать «Журналы России»
для организаций — 18363
для индивидуальных подписчиков — 18362

Информационная поддержка: Интернет-сайт «Гемостаз и реология» *www.hemostas.ru*

Контактный адрес: *Е.В.Ройтман* — РНЦХ РАМН, Россия, 119992, Москва, Абрикосовский пер. 2;
Тел./факс: (495)248-0662, 8 903 144-4634, e-mail: **hemostas@aha.ru**

СОДЕРЖАНИЕ

НОВОСТИ

ОБЗОР

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПРАКТИКА

CONTENTS

NEWS

REVIEW

ORIGINAL PAPERS

PRACTICS

НОВОСТИ

III ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕМОСТАЗИОЛОГИЯ И ГЕМОРЕОЛОГИЯ В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ» (С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ)

состоялась в Москве, 1–3 февраля 2007 года.
Конференцию организовали
Научный Центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН
и Научное Общество «Клиническая гемостазиология».
Председателем форума был Академик РАМН Л.А.Бокерия,
сопредседателями — д.м.н. Н.Н.Самсонова, д.б.н. Е.В.Ройтман, проф. И.И.Дементьева

Конференция началась с кратких выступлений и минуты молчания в память о Зиновии Соломоновиче Баркагане.

Далее в течение трех дней в залах НЦ ССХ им.А.Н.Бакулева РАМН прошли 10 пленарных и секционных заседаний, на которых были рассмотрены наиболее акуальные вопросы клинической и экспериментальной гемостазиологии, гемореологии и микроциркуляции. В этом ставшем уже традиционным мероприятии приняли участие большинство ведущих специалистов России, Белоруссии, Украины. Также приятно отметить участие гостей из Израиля, Грузии, Казахстана и Узбекистана.

В рамках конференции состоялись два сателлитных симпозиума, организованных компаниями «ГлаксоСмитКляйн» и «Пфайзер», работала выставка ведущих фармацевтических и лабораторных компаний.

В последний день конфренции были подведены итоги IV конкурса научно-практических работ молодых ученых на приз журнала «Тромбоз, гемостаз и реология». Лауреаты и номинанты выступили с краткими докладами и были премированы дипломами и денежными призами. Также нескольким молодым ученым были выделены Дорожные гранты. По традиции работы молодых ученых будут опубликованы в журнале в 2007–2008 гг.

Конференцию завершил Круглый стол, посвященный проблемам развития гемостазиологии и гемореологии на ближайший два года. Следующая конференция запланирована на 2009 год.

Одним из итогов конференции стало значительное пополнение рядов Научного Общества «Клиническая гемостазиология».

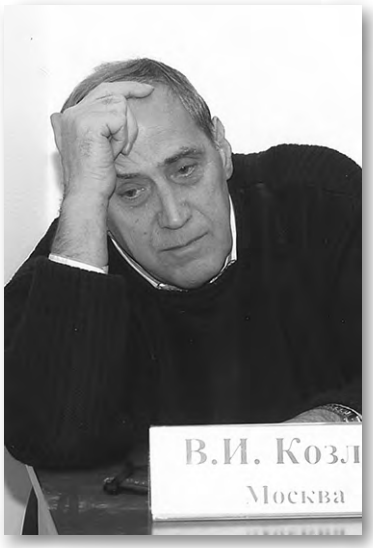
Информационным спонсором конфренции стали журнал и сайт «Тромбоз, гемостаз и реология».

Отдельная благодарность компании «ГлаксоСмитКляйн», выступившей Генеральным спонсором конференции и оказавшей значительную помощь в организации.

Ниже мы публикуем фотоотчет.


А.В. Аршинов
Ярославль


Э.С. Мач
Москва


В.И. Козл
Москва


П.В. Свири


Т.В. Вавилова


В.Г. Нонова
Москва
А.Ш. Бышевский
Тюмень


ПОДПИСКА
НА

ОБЗОР

PLASMA CRP, TGF-B1, SCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, SP-SELECTIN, T-PA, SVCAM-1 AND COMPLEMENT C3 IN RESISTANT ARTERIAL HYPERTENSION AND ROSUVASTATIN'S INFLUENCE ON THESE PARAMETERS

Magen Eli [1,2,3], MD; Mishal Joseph [2], M.D; Viskoper Reuven [1], MD

[1]WHO Collaborative Center for Prevention of CVD, [2]Medicine B Department, Barzilai medical Center;

[3]Allergy and Clinical immunology Unit, Barzilai medical Center; Ben Gurion University of Negev, Ashkelon, Israel

BACKGROUND

Refractory or resistant arterial hypertension (RAH) is conventionally defined as systolic or diastolic blood pressure that remains uncontrolled above 140/90 mmHg despite sustained therapy with at least three different classes of antihypertensive agents. RAH is estimated to affect less than 5 % of the general population with hypertension; however, its prevalence increases with increasing severity of blood pressure [1]. Patients presenting with refractory hypertension usually have progressed from mild, to moderate, to severe hypertension because of lack of or inadequate treatment. Other common contributing factors include obesity, medical nonadherence, suboptimal medical regimens, excessive dietary salt ingestion, secondary forms of hypertension, sleep apnea, and ingestion of substances that interfere with treatment. Combination therapy that includes appropriate doses of a diuretic is recommended for treatment of refractory hypertension [2]. But a significant percent of these subjects remain with uncontrolled hypertension despite the nonpharmacological and pharmacological interventions [3, 4]. Several short-term studies have shown that statins can improve endothelial function and the endothelium-dependent arterial vasodilatation that are typically altered in persons with increased plasma cholesterol levels [5–8]. Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase or statins constitute the most powerful class of lipid lowering drugs, widely used in medical practice. During the past several years additional actions of statins unrelated to cholesterol reduction have been identified which includes antiinflammatory and immunomodulatory properties [9].

Is there any link between chronic inflammation and arterial hypertension?

A possible link between chronic vascular inflammation and arterial hypertension is now an object of intensive studies. A rise in blood pressure (BP) causes chronic inflammation of the endothelium, which, in turn may be responsible for further damage of endothelium and worsening of BP control. On the other hand, several metabolic abnormalities such as dyslipidemia, hyperinsulinemia/ insulin-resistance, diabetes, and obesity cause inflammation followed by a later rise in arterial BP [10]. It is also known, that systolic BP and pulse pressure, but not diastolic BP, are predictors of higher plasma C-reactive protein (CRP) concentrations in patients with newly diagnosed, never-treated hypertension, irrespective of the potential proinflammatory action of traditional cardiovascular risk factors [11].

Transforming growth factor-β_1 and arterial hypertension

The immunological mechanisms of so cold «low-grade systemic vascular inflammation» may have an important impact in pathogenesis of RAH An important role in maintenance of the «pro-inflammatory state» is related to transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1). This multifunctional cytokine regulates cell growth, differentiation and matrix production and induces fibrosis in kidneys, heart and blood vessels [12]. Moreover, its overproduction has been linked with the target organ damage of hypertension, including left ventricular hypertrophy, [13] vascular remodeling, [14] and progressive renal disease [15]. It is also possible that TGF-β_1 may determine BP levels, because TGF-β_1 stimulates the expression of mRNA encoding endothelin in vascular endothelial cells [16] and increases renin release from juxtaglomerular [17] cells in the kidney. Additionally, TGF-β_1 and angiotensin II regulate the expression of each other [17]. The observed TGF-β_1 overproduction in hypertension can be attributed to increased fluid shear stress. Higher plasma TGF beta-1 concentration is found in hypertensive patients with microalbuminuria (18). In these patients, AT-1 R antagonism and ACEI reduced plasma TGF beta-1 levels significantly [18].

Complement in arterial hypertension

Lin et al have recently described selective expression of the complement protein complement 3 (C3) in arterial cells from the spontaneously hypertensive rat (SHR) and clear involvement of this protein in mediating enhanced arterial smooth muscle growth and blood pressure elevation in the SHR (19). The authors followed this lead to demonstrate that exogenous C3 could change the phenotype of smooth muscle, could stimulate a higher level of growth in the SHR and was necessary for the enhanced growth/ synthetic phenotype of the SHR cells. This was based on the observations that reduction of C3 expression by antisense oligonucleotide administration altered the phenotype and growth of these cells. The possible role of C3 or complement in hypertension has largely been studied in the kidney, where C3 or complement plays a role in IgA nephropathy (20), is deposited in small arteries and arterioles of SHRs given deoxycorticosterone acetate (DOCA) and salt (21), and is necessary for renal injury in DOCA — salt mice. C5-deficient mice administered DOCA and salt do not develop as severe a renal injury as wild-type mice treated with DOCA and salt (22). C3 has been implicated in the left ventricular perivascular inflammation found in renovascular hypertensive rats (23) and as a stimulus of pulmonary vascular constriction (24). In the human, elevated levels of C3 have been associated with the essential hypertension with concomitant left ventricular hypertrophy (25).

Our preliminary results

1. In the previous study we have checked an influence of statins on blood pressure of subjects with RAH. 48 hyperlipidemic subjects with RAH were randomized into three groups and an influence of Atorvastatin 20mg/ day, vitamine C 500 mg/ d and Placebo, given on addition to their antihypertensive medications for 8 weeks have been checked. Using high-resolution ultrasound brachial artery flow mediated dilation (FMD) was calculated and in addition 24-hour ambulatory blood pressure monitoring was performed at study entry and after 8 weeks. Atorvastatin caused to significant reductions of systolic (ΔSBP1–213,7±5,6 mm/ Hg, p <0.001), diastolic (ΔDBP1–27,8±5,7mm/ Hg, p < 0.01) blood pressure, LDL (ΔLDL1–267,7±28,3 mg/ dl, p <0,001) and improvement brachial artery FMD (ΔFMD2–14,2 ±2,6 %) were observed while no significant changes of blood pressure, LDL and FMD were seen in the groups treated by vitamin C and Placebo. So, we concluded that in subjects with resistant arterial hypertension and dyslipidemia Atorvastatin 20mg/ d may assist to a better blood pressure control and endothelial function improvement over 8-week treatment period (26).
2. In another study we tested the hypothesis whether pharmacological control of low grade systemic inflammation in coexistent allergic rhinitis and arterial hypertension could assist to better blood pressure control. 68 subjects with allergic rhinitis and arterial hypertension were randomized into two groups to receive in addition to their antihypertensive medications: *Treatment group* (n = 34) Fluticasone nasal 50 mcg/ spray bid and Fenoxifenadine 180 mg tablets qd, and *Control group (n = 34)* 0,9 % NaCl nasal drops bid. Office BP and allergic rhinitis severity (using the Relative Quality of Life Questionnaire (RQLQ)) and high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) were measured at study entry and after eight weeks in both groups, without changing of antihypertensive medications. In Treatment group an improvement in RQLQ, significant reduction of systolic BP (SBP) (ΔSBP 7.4 ± 4.3 mmHg, p=0.006) and reduction of hs-CRP level (ΔCRP 2. 05 ± 1.08 mg/ L; p < 0.028) were observed, while diastolic BP (DBP) remained unchanged (ΔDBP 0.9 ±1.7 mmHg, p=0.7). There was a significant correlation between ΔRQLQ and ΔSBP (r = 0. 86; p <0.019) and between ΔCRP and ΔSBP (r = 0. 56; p <0.027). No statistically significant changes of RQLQ, BP and CRP were observed in Control group. So we concluded that in patients with of arterial hypertension, medicamentous intervention attenuating low-grade systemic inflammation can lower BP (27).
3. We also found significant improvements in endothelial function and BP control by the use of aspirin but only in hypertensive patients who were taking several statins, such as simvastatin (71 %), pravastatin (19 %) and atorvastatin (10 %). Of note, the beneficial effects of aspirin were not found in patients who were not taking statins (control group of 20 subjects). These observations move up us to a hypothesis that there is the possibility of synergistic anti-inflammatory effects between aspirin and statins and these beneficial effects on BP are mediated via a reduction of systemic inflammatory mediators and enhancement of endothelial function (28).

Objectives of the study

In the current investigation, we intend to explore three hypotheses:

1. That in patients with RAH circulating levels of TGF-β_1 protein, hs-CRP, sCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, sP-

Selectin, t-PA, sVCAM-1 and complement protein C3 are higher than in those with controlled arterial hypertension.

2. That Rosuvastatin calcium addition to their antihypertensive treatment can render RAH to be controlled.
3. There is a link between plasma levels of C-reactive protein (CRP), TGF beta-1, C3, sCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, sP-Selectin, t-PA, sVCAM-1 and blood pressure control in patients with arterial hypertension.

METHODS

Patients

Patients will be recruited from Israeli primary care centers.

Inclusion criteria

- Age at least 18 years old
- Arterial (essential) hypertension
- Treatment with antihypertensive therapy for more than 90 days at study entry.

Exclusion criteria

- Pregnancy
- Secondary arterial hypertension
- Alanine aminotransferase or aspartate aminotransferase levels more than three times the upper limit of normal.
- Plasma creatinine level more than 2 mg/ dl
- Inability to give written informed consent
  Low compliance to treatment

Study Design

The study will be a randomized, open, comparative study.

The primary goal of the study is to compare plasma CRP, TGF beta-1, C3 through before Rosuvastatin calcium treatment. The secondary goal will be the correlation of changes of SBP, DBP, LDL with the changes of plasma CRP, TGF beta-1, C3 levels through 8 weeks of Rosuvastatin calcium treatment.

Treatment Regimens

Patients will be recruited according the inclusion/ exclusion criteria into two groups:

Group A (20 patients) → > 140/85 mmHg notwithstanding treatment with 3 antihypertensive medications, including diuretic (>for 3 months).

Group B (20 patients) → < 140/85 mmHg on ≤ 3 antihypertensive medications (>for 3 months).

All the patients will be treated by Rosuvastatin calcium 10 mg/d for 12 weeks (in addition to their antihypertensive medications).

Assessment and Monitoring

The patients will be evaluated at base line and on the week 12.

At each visit will be performed:

- An interim history
- A physical examination
- BMI assessment
- Office blood pressure measurement
- Plasma lipids (Total cholesterol, LDL)
- Plasma levels of CRP, TGF-β_1, sCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, sP-Selectin, t-PA, sVCAM-1 and Complement C3

Patients' rates of adherence to the regimens were determined by pill counts at each study visit.

Determination of plasma factor-β_1 levels

Venous blood (5 mL) will be immediately placed on ice after collected in precooled EDTA-containing tubes. The samples will be centrifuged for 30 minutes to remove platelets; the top 0.6 mL of the platelet-poor plasma will be preserved. The plasma TGF-β_1 concentration will be determined using quantitative sandwich enzyme immunoassay specific for TGF-β_1 (R & D systems, Inc., Minneapolis, USA) according to the manufacturer's instructions. To activate the latent TGF-β_1 into the immunoreactive form, the samples will be activated by acid and neutralized thereafter. 0.5 mL sample was briefly acidified with 0.5 mL 1.25 mol/ L acetic acid/10 mol/ L urea plus 50 mg of phenylmethyl-sulfonyl fluoride; 5 samples will be neutralized with 0.5 mL of 2.7 mol/ L NaOH/0.1 mol/ L HEPES free acid. Serially diluted standards and samples with calibrator diluents in the immunoassay kit will be incubated in a 96-well plate coated with TGF-β_1 receptor type II After washing away any unbound protein, a polyclonal antibody specific for TGF-β_1 conjugated to horseradish peroxidase will be added to the wells to sandwich the TGF-β_1, which will be immobilized during the first incubation. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution will be added to the wells and the color development at 450 nm will be measured. The TGF-β_1 content will be determined by extrapolation of a standard curve.

Complement studies

C3 concentrations will be measured by the ABICAP assay (Biognosis, Jülich, Germany). Briefly, C3 neoepitope-specific anti-human C3 monoclonal antibodies (MAbs) will be coupled to CNBr-Sepharose and packed into small polystyrol columns (ABICAP). The sample will then be applied to the column, diluted 1:2 in phosphate-buffered saline (PBS). After antigen capture, the column will be washed with PBS and a complex consisting of a biotinylated detection MAb and streptavidin-fluorescein isothiocyanate (FITC) will be applied to the column. C3 concentrations will be determined by eluting the immune complex comprising the corresponding antibody, and the streptavidin-FITC and subsequently determining the fluorescence intensity.

Determination of plasma sCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, sP-Selectin, t-PA, sVCAM-1 levels

Determination of plasma sCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, sP-Selectin, t-PA, sVCAM-1 levels will be measured by the ELISA assay (Bender, Germany brought by Almog Diagnostics, Israel), according with manufacturers instructions, using standard ELISA method.

Statistical Analysis

The planned sample size of 20 patients per treatment group is planned in the study, at the two-sided 0.05 level of significance, with 80 percent power to detect an absolute difference of 10 percent in the CRP, TGF Beta-1 C3 levels. Treatment groups will be compared by Fisher's exact test. A one-way ANOVA analysis of variance will be used to evaluate mean changes from base line. All statistical tests will be two-sided.

Study budget

Human TGF-b1 instant ELISA 128 wells 472 € + VAT
Human C3 instant ELISA kits 128 wells 472 € + VAT
Human cardiovascular 7plex (sCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, sP-Selectin, t-PA, sVCAM-1) 7X96 tests 1215 € + VAT

REFERENCES:

1. *Alper AB Jr, Calhoun DA Contemporary management of refractory hypertension. Curr Hypertens Rep 1999 Oct; 1 (5): 402–7.*
2. *Townsend RR Refractory or resistant hypertension. J Clin Hypertens 2002; 4 (1): 61.*
3. *Martell N, Rodriguez-Cerrillo M, Grobbee DE, Lopez-Eady MD, Fernandez-Pinilla C, Avila M, Fernandez-Cruz A, Luque M High prevalence of secondary hypertension and insulin resistance in patients with refractory hypertension. Blood Press. 2003; 12 (3): 149–54. 1].*
4. *Ouzan J, Perault C, Lincoff AM, Carre E, Mertes M The role of spironolactone in the treatment of patients with refractory hypertension. Am J Hypertens. 2002 Apr; 15 (4 Pt 1): 333–9.*
5. *Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. Circulation. 1998; 97: 1129–1135.*
6. *O'Driscoll G, Green D, Taylor RR Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. Circulation. 1997; 95: 1126–1131.*
7. *Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD Changes in flow-mediated brachial artery vasoactivity with lowering of desirable cholesterol levels in healthy middle-aged men. Am J Cardiol. 1996; 77: 37–40.*
8. *Egashira K, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Inou T, Takeshita A Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. Circulation. 1994; 89: 2519–2524.*
9. *Shovman O, Levy Y, Gilburd B, Shoenfeld Y Antiinflammatory and immunomodulatory properties of statins. Immunol Res. 2002; 25 (3): 271-85.*
10. *Barbieri M, Ferrucci L, Corsi AM, Macchi C, Lauretani F, Bonafe M, Olivieri F, Giovagnetti S, Franceschi C, Paolisso G Is chronic inflammation a determinant of blood pressure in the elderly? Am J Hypertens. 2003 Jul; 16 (7): 537-43.*
11. *Schillaci G, Pirro M, Gemelli F, Pasqualini L, Vaudo G, Marchesi S, Siepi D, Bagaglia F, Mannarino E Increased C-reactive protein concentrations in never-treated hypertension: the role of systolic and pulse pressures. J Hypertens. 2003 Oct; 21 (10): 1841-6.*
12. *Border WA, Nobel NA Transforming growth factor-β in tissue fibrosis. N Engl J Med. 1994; 331: 1286-1292*
13. *Villarreal FJ, Dillmann WH Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF, fibronectin, and collagen. Am J Physiol.. 1992; 262: H1861 — H1866*
14. *Sarzani R, Brecher P, Chobanian AV Growth factor expression in aorta of normotensive and hypertensive rats. J Clin Invest. 1989; 83: 1404-1408*
15. *Ketteler M, Noble NA, Border WA Increased expression of transforming growth factor-beta in renal disease. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1994; 3: 446-452*
16. *Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Hamaoki M, Kato H, Yazaki Y Transforming growth factor β stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1989; 159: 1435-1440*

17. Border WA, Noble NA Interactions of transforming growth factor-β and angiotensin II in renal fibrosis. Hypertension. 1998; 3 (part 2): 181-188.
18. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Association between transforming growth factor-beta and hypertension. Am J Hypertens. 2003 Jul; 16 (7): 604-11.
19. Lin A-H, Fukuda N, Jin X-Q, Yao E-H, Ueno T, Endo M, Saito S, Matsumoto K, Mugishima H Complement 3 is involved in the synthetic phenotype and exaggerated growth vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 2004: 44; 42-47
20. Zwirner J, Burg M, Schulze M, Brunkhorst R, Gotze O, Koch KM, Floege J. Activated complement C3: a potentially novel predictor of progressive IgA nephropathy. Kidney Int. 1997; 51: 1257-1264.
21. Takagi M, Kimura K, Atarashi K, Ikeda T, Matsuoka H, Ishii M, Sugimoto T. Immunohistochemical study of vascular lesions in severe hypertension induced by DOCA and salt administration to spontaneously hypertensive rats. Am J Hypertens. 1990; 3: 838-845.
22. Raij L, Dalmasso AP, Staley NA, Fish AJ. Renal injury in DOCA-salt hypertensive C5-sufficient and C5-deficient mice. Kidney Int. 1989; 36: 582-592.
23. Nicoletti A, Mandet C, Challah M, Bariety J, Michel JB. Mediators of perivascular inflammation in the left ventricle of renovascular hypertensive rats. Cardiovasc Res. 1996; 31: 585-595.
24. Morganroth ML, Schoeneich SO, Till GO, Ward PA, Horvath SJ, Glovsky MM. C3a55-57, a C-terminal peptide, causes thromboxane-dependent pulmonary vascular constriction in isolated perfused rat lungs. Am Rev Respir Dis. 1990; 141: 296-300.
25. Lefkos N, Boura P, Boudonas G, Zacharioudaki E, Efthimiadis A, Tsougas M, Epivatianos P. Immunopathogenic mechanisms in hypertension. Am J Hypertens. 1995; 8: 1141-1145.
26. Magen E, Berezovsky A, Priluk R, Laszt A, London D, Altshuler A,. Viskoper JR. Resistant arterial hypertension and hyperlipidemia, Atorvastatin, not vitamin C for blood pressure control. Isr Med Assoc J. 2004 Dec 6 (12): 742-6
27. Magen E, Yosefy C, Viskoper RJ, Mishal J. Treatment of allergic rhinitis can improve blood pressure control. J Hum Hypertens. 2006 Sep 7; [Epub ahead of print]
28. Magen E, Viskoper JR, Mishal J, Priluk R, London D, Yosefy C. Effects of low-dose aspirin on blood pressure and endothelial function of treated hypertensive hypercholesterolaemic subjects. J Hum Hypertens. 2005 Sep; 19 (9): 667-73.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У ДЕКОМПЕНСИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА

Кузник Б. И., Бышевский А. Ш., Витковский Ю. А., Галян С. Л., Колесниченко Л. Р., Ключерева Н. Н., Малеева Н. В., Рудзевич А. Ю., Шаповалова Е. М., Шмидт А. В., Хамаева Ц. Б.

Читинская государственная медицинская академия,

Тюменьская государственная медицинская академия

HEMOSTASIS AND LIPID PEROXYDATION IN DECOMPENSATED PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1

Kuznik B.I., Byshevskiy A.Sh., Vitkovskiy Yu.A., Galian S.L., Kolesnichenko L.R., Kliuchereva N.N., Maleyeva N.V., Routzevich A.Yu., Shapovalova E.M., Schmidt A.V., Hamaeva Ts.B.

Chita State Medaical Academy, Tumen State Medaical Academy

Одним из актуальнейших вопросов современной эндокринологии является лечение сахарного диабета (СД). Согласно данным ВОЗ во всём мире с каждым годом возрастает число больных СД [11, 27]. Предполагается, что уже к 2010 году общее число больных СД в Западной Европе превысит 32 млн человек, а общее их количество во всём мире будет около 250 миллионов [26]. Только в России к настоящему времени СД болеют более 8 миллионов людей [9].

Несмотря на предпринимаемое лечение, при СД чрезвычайно высок риск развития таких осложнений, как инфаркт миокарда, инсульт, облитерирующие заболевания нижних конечностей, вплоть до развития гангренозной диабетической стопы [1, 2, 3, 9, 23, 24, 25].

До сих пор окончательно не решен вопрос о том, как изменяется состояние свёртывающей системы крови и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза при СД-1. Нет никакого сомнения, что при этом грозном заболевании создаются благоприятные условия для развития хронической формы ДВС-синдрома [2, 3, 5, 12, 13, 15, 21, 24]. Вместе с тем, окончательный механизм этого явления далёк от разрешения и требует проведения тщательных дополнительных исследований [22, 24, 25, 27].

За последние годы появилось немало работ, свидетельствующих о том, что существует тесная взаимосвязь между усилением процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) и различными показателями системы гемостаза [5, 6, 7, 17, 18, 19]. Однако в отношении больных СД-1 подобные исследования практически отсутствуют [21].

Учитывая сказанное, мы решили изучить, как изменяется состояние свёртывающей системы крови, тромбоцитарного гемостаза, лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии и процессов ПОЛ в мембранах кровяных пластинок при СД-1.

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе с обследуемыми людьми соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, 2000 ред.).

Всего под нашим наблюдением находилось 188 больных — 77 мужчин (41 %) и 111 (59 %) женщин в возрасте от 15 до 73 лет. В качестве контроля обследовано 142 относительно здоровых человека разных возрастных групп.

Все наблюдаемые больные с момента диагностики СД получали генно-инженерный инсулин 3-х ведущих фирм-производителей (Ново Нордиск — Дания, Эли Лили — США, Авентис — Германия).

Помимо инъекций инсулина, всем больным проводилась диетотерапия и обучающая программа с методами самоконтроля. Доза инсулина, применяемая при поступлении, соответствовала от 14 до 80 ЕД в сутки.

Все больные поступали в стадии декомпенсации. С острыми осложнениями и кетозом было 36 паци-

ентов. Поздние осложнения (ретинопатии, нейропатии, энтеропатии и макроангиопатии) диагностированы у 143 больных.

Нами на отечественном агрегометре «Биола» регистрировалась спонтанная агрегация тромбоцитов, а также агрегация на АДФ, коллаген, адреналин и ристомицин. Специальная серия исследований была посвящена определению лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии [8]. Одновременно определялись активированное частичное тромбопластиновое время — АЧТВ, протромбиновое и тромбиновое время, концентрация фибриногена, активность антитромбина III (А-III) и протеина С, хагеманзависимый (XIIa-зависимый) фибринолиз и время появления растворимых фибринмономерных комплексов — РФМК. Все перечисленные методы изучения свёртывающей системы крови и фибринолиза вошли в современные руководства по исследованию системы гемостаза [4, 20].

Кроме того, нами определялось содержание следующих продуктов ПОЛ в клеточных мембранах тромбоцитов: первичных диеновых конъюгатов (ДК), конечных шиффовых оснований (ШО), активность мембранодестабилизирующего фермента — фосфолипазы A_2, активность ферментов антирадикальной защиты в мембранах тромбоцитов — супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики для связанных и не связанных между собой наблюдений, а также вычислен показатель достоверности различий (Р). С этой целью использовалась программа Microsoft Excel 2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В первой серии наблюдений было изучено, как изменяется общая коагуляционная активность крови у больных СД-1 по сравнению со здоровыми людьми, независимо от длительности и тяжести заболевания (**таблица 1**).

Как показали наши наблюдения, у больных СД-1 имеется выраженная гиперкоагуляция. У таких больных значительно сокращено АЧТВ и имеется тенденция к увеличению протромбинового времени (вторичные изменения). Кроме того, у больных резко повышено содержание фибриногена, уменьшена концентрация А-III и протеина С, а также заторможен хагеманзависимый фибринолиз (Р <0,01). В то же время у таких больных почти в 3 раза быстрее появляется положительная реакция на растворимые фибринмономерные комплексы (РФМК).

Таблица 1

Состояние коагуляционного гемостаза у больных СД-1

Изучаемые показатели	Здоровые *n=42*	Больные *n=56*
АЧТВ, с Р	36,8±1,1	29,82±0,52 <0,001
МНО, ЕД	1,05±0,11	1,11±0,04
Тромбиновое время, с	16,9±0,4	15,7±0б4
АТ-III, % Р	96,0±3,0	75,4±3,05 <0,001
Протеин-С, % Р	108±6,2	85,65±2,21 <0,001
Фибриноген, г/литр Р	3,30±0,26	5,03±0,08 <0,001
XIIa-зависимый фибринолиз, мин. Р	10,1±0,63	14,17±1,0 <0,01
РФМК, мин. Р	126,3±4,6	47,19±4,22 <0,001

Представленные данные во многом сходны с наблюдениями других авторов [1, 2, 3, 21, 22, 24, 26] и с несомненностью говорят о том, что у больных СД-1 наблюдается гиперкоагуляционная фаза хронического ДВС-синдрома.

В дальнейшем мы проследили, как изменяются изучаемые нами показатели в зависимости от возраста больных. Для этого все больные были разбиты на 3 группы: от 15 до 20 лет, от 21 до 50 и старше 50 лет.

У больных в возрасте до 20 лет, по сравнению со здоровыми людьми, отмечалось сокращение АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени, увеличение уровня фибриногена, уменьшение концентрации А-III и протеина С и сокращение сроков появления РФМК.

У людей во второй возрастной группе (21–50 лет) со стороны свёртывающей системы крови отмечались те же, но более выраженные, сдвиги, чем в первой (от 15 до 20 лет) группе. Кроме того, у них явно тормозилась фибринолитическая активность крови, а по сравнению с людьми в возрасте от 15 до 20 лет сильнее повышалась концентрация фибриногена.

В третьей возрастной группе (старше 50 лет), по сравнению со второй, сильнее сокращалось протромбиновое и тромбиновое время, резче снижался уровень А-III и протеина С, еще больше возрастал уровень фибриногена и значительнее тормозился фибринолиз.

Таблица 2

Состояние коагуляционного гемостаза у больных СД-1 различного возраста

Изучаемые показатели	Контроль *n=42*	Больные (возраст)		
		1. 16–20 лет *n=15*	**2. 21–50 лет** *n=25*	**3. Старше 50 лет** *n=16*
АЧТВ, с P_1	36,8±1,1	29,48±0,45 <0,001	28,89±0,44 <0,001	27,36±0,59 <0,001
МНО, ЕД P_1 P_3	1,02±0,11	0,91±0,12 <0,001	0,89±0,12 <0,001	0,85±0,14 <0,001 <0,05
Тромбиновое время, с P_1 P_3	16,9±0,40	16,35±0,12	15,02±0,12 <0,001	14,08±0,16 <0,001 <0,01
АТ-III, % P_1 P_3	96,0±3,0	81,4±6,2 <0,05	79,8±6,0 <0,01	65,9±3,2 <0,001 <0,05
Протеин С, % P_1 P_3	108,0±6,2	92,65±4,21 <0,01	90,79±4,13 <0,001	71,23±2,25 <0,001 <0,001
Фибриноген, г/литр P_1 P_2 P_3	3,30±0,26	4,23±0,20 <0,001	5,42±0,25 <0,001 <0,001	6,38±0,28 <0,001 <0,001 <0,001
XIIa-зависимый фибринолиз, мин. P_1 P_3	10,10±0, 63	12,37±1,51	13,36±1,33 <0,05	16,85±1,35 <0,01 <0,05
РФМК, с P_1	126,3±4,6	57,2±4,6 <0,001	46,0±4,5 <0,001	40,2±3,3 <0,001

Примечание: P_1 — достоверность различия между здоровыми и больными, P_2 — между больными 1 и 2 или 1 и 3 группами, P_3 — между больными 2 и 3 группами.

Безусловно, обнаруженные нами факты зависят не только от возраста, но и от тяжести и «стажа» заболевания, дозы применяемого инсулина, а также от присоединившихся осложнений.

В следующей серии наблюдений мы выяснили, как изменяются исследуемые нами тесты в зависимости от длительности заболевания. При этом все больные были разделены на 5 групп: со сроком болезни от 0,5 до 1 года, от 2 до 5 лет, от 6 до 10, от 11 до 15 и более 15 лет (**таблица 3**).

У пациентов с продолжительностью заболевания до 1 года, по сравнению со здоровыми, оказалось сокращенным АЧТВ и слегка удлинённым протромбиновое время, заторможенным хагеманзависимый фибринолиз, довольно значительно увеличенной концентрация фибриногена. Содержание протеина С и А-III в этой возрастной группе оставалось таким же, как и у здоровых людей. Время появления РФМК у больных с диагнозом заболевания до 1 года сокращалось более чем в 2 раза.

Полученные данные говорят о том, что даже в первый год заболевания при СД-1 наблюдаются отчетливые признаки хронического ДВС-синдрома.

Более значительные сдвиги в свёртывающей системе крови наблюдались у людей со «стажем» заболевания от 2 до 5 лет. У них, по сравнению с больными первой группы, отмечалось уменьшение тромбинового времени, резкое снижение уровня протеина С и тенденция к уменьшению концентрации А-III. В этой группе больных ещё сильнее сокращалось время появления РФМК (по сравнению со здоровыми уменьшение более чем в 3,5 раза), тогда как скорость растворения фибринового сгустка (XIIa-зависимый фибринолиз) оставалась такой же, как в группе людей со сроком заболевания до 1 года.

При продолжительности заболевания от 6 до 10 лет, по сравнению со здоровыми, наблюдается сокращение АЧТВ, тенденция к уменьшению тромбинового времени, снижение концентрации А-III и резкое сокращение времени появления РФМК. У пациентов со сроком заболевания до 10 лет изменения в коагулограмме были выражены прибли-

Таблица 3

Состояние коагуляционного гемостаза у больных СД-1 в зависимости от длительности заболевания

Изучаемые показатели	Здоровые *n=42*	Больные — длительность заболевания				
		До 1 года *n=14*	2–5 лет *n=22*	6–10 лет *n=20*	11–15 лет *n=17*	Более 15 лет *n=10*
АЧТВ P_1	36,8±1,1	31,1±2,5 <0,001	31,7±2,8 <0,02	32,2±1,7 <0,05	31,2±3,2	29,0±3,5 <0,05
МНО P_2	1,02±0,1	1,17±0,1	1,13±0,04	1,02±0,05	1,06±0,2	0,92±0,08 <0,05
Тромбиновое время, с P_1	16,9±0,4	16,3±1,2	14,6±0,5 <0,05	14,9±1,0 <0,05	16,5±1,7	19,6±1,2 <0,05
АТ-III, % P_1 P_2	96,0±3,0	97,0±3,7	88,1±8,2	84,3±0,6 <0,01 <0,01	86,5±3,5 <0,01 <0,01	82,0±1,4 <0,001 <0,001
Протеин С, % P_1 P_2	108±6,2	104,4±6,9	91,3±2,1 <0,001		67,5±7,4 <0,001 <0,001	60,0±9,3 <0,001 <0,001
Фибриноген, г/литр P_1 P_2	3,30±0,27	4,85±0,30 <0,001	4,16±0,35 <0,05	3,98±0,33 <0,05	5,82±0,90 <0,001 <0,05	5,54±0,73 <0,001
X11a-зависимый фибринолиз, мин. P_1 P_2	10,1±0,6	18,0±0,6 <0,001	18,7±0,5 <0,001	15,0±0,7 <0,001 <0,001	19,7±0,7 <0,001	15,7±2,2 <0,05
РФМК, с P_1	126,3±4,6	55,3±24,9 <0,001	35,9±12,5 <0,001	55,8±15,6 <0,001	47,0±24,8 <0,001	36,6±10,4 <0,001

Примечания: P_1 — достоверность различий между здоровыми и больными; P_2 — между больными со сроком заболевания до 1 года и старше.

зительно в такой же степени, как и в предыдущей группе.

Наиболее выраженные изменения со стороны гемостаза наблюдаются у длительно болеющих людей (более 10 лет). У них в большей степени сокращается АЧТВ, резче снижается содержание естественных антикоагулянтов, концентрация фибриногена может быть очень высокой (до 9 г/литр), либо очень низкой (1,46 г/литр), что не выявляется в других группах. Фибринолитическая активность крови у таких людей оказалась значительно сниженной, а уровень РФМК очень высок. Полученные данные позволяют говорить о том, что у людей со «стажем» болезни более 10 лет наблюдаются срывы адаптационных реакций со стороны системы гемостаза.

У больных со сроком заболевания более 15 лет отмечались чрезвычайно высокие показатели фибриногена (в среднем 6,54±0,73 г/литр) и РФМК (появление их происходило почти в 4 раза быстрее, чем у здоровых людей и в 2–3 раза быстрее, чем у больных 1 и 2 групп) и очень низкие цифры A-III и протеина С. Разумеется, у таких больных наиболее опасна возможность возникновения не только острого ДВС, но и тромбоэмболических осложнений.

По дозе вводимого инсулина все больные были разделены на 4 группы. В первую вошли пациенты, получавшие от 15 до 30, во вторую — от 32 до 40, в третью — от 42 до 50 и в четвёртую — больше 50 ЕД инсулина в сутки (**таблица 4**).

Мы установили, что независимо от дозы вводимого инсулина АЧТВ сокращалось приблизительно в одинаковой степени. Уровень A-III уменьшался лишь в группах, где доза используемого инсулина колебалась от 32 до 40 или была выше 50 ЕД. У всех больных тормозился фибринолиз. Между тем, чем больше была доза применяемого инсулина, тем меньше изменялась фибринолитическая активность крови, что, несомненно, связано со способностью инсулина стимулировать фибринолиз. И, наконец, у всех больных, независимо от дозы используемого инсулина, значительно удлинялось время появления РФМК.

Таблица 4

Состояние коагуляционного гемостаза у больных СД-1 в зависимости от дозы применяемого инсулина

Изучаемые показатели	Здоровые *n=42*	Больные — применяемая доза инсулина, ЕД			
		15–30 *n=19*	**31–40** *n=18*	**41–50** *n=27*	**50 и более** *n=24*
АЧТВ, с P_1	36,8±1,1	32,1±2,2 <0,05	31,6±3,5 <0,1	30,6±4,8	32,1±4,9
МНО, ЕД	1,02±0,11	1,06±0,06	0,94±0,04	0,92±0,11	1,16±0,37
Тромбиновое время, с	16,9±0,40	15,4±2,9	18,0±3,7	16,4±2,9	14,1±2,9
АТ-III, % P_1 P_2	96,0±3,0	102,5±8,9	82,9±6,5 <0,05 <0,05	93,4±1,3	84,4±5,4 <0,05 <0,05
Протеин С, %	108±6,2	98,6±10,6	85,7±10,9	89,8±3,3	108,4±28,9
Фибриноген, г/литр P_1	3,30±0,27	5,18±0,55 <0,001	5,36±0,52 <0,001	4,66±0,37 <0,001	4,20±0,26 <0,001
XIIa-зависимый фибринолиз, мин. P_1 P_2	10,1±0,6	20,8±0,8 <0,001	21,7±0,6 <0,001	13,9±0,6 <0,01 <0,001	13,7±0,7 <0,01 <0,001
РФМК, с P_1	123,6±6,3	60,0±15,4 <0,001	36,4±6,0 <0,001	45,1±17,3 <0,001	45,2±15,6 <0,001

Примечания: P_1 — достоверность различий между здоровыми и больными; P_2 — между больными, получавшими инсулин в дозе 15–30 ЕД и более.

По осложнениям больные были разделены на 3 группы: 1– пациенты с ретинопатией и полинейропатией; 2– больные, у которых к ретинопатии и полинейропатии присоединилась нефропатия; 3– больные, у которых, кроме указанных ранее, имелись дополнительные осложнения. Контролем для них служили больные СД без осложнений (**таблица 5**).

Нами установлено, что у больных с отсутствием осложнений отмечалось лишь сокращение АЧТВ, снижение уровня протеина С, увеличение концентрации фибриногена (по сравнению с нормой на 110 г/литр), торможение хагеманзависимого фибринолиза и сокращение сроков появления РФМК.

У больных с осложнениями АЧТВ не претерпевало существенных изменений. Сказанное, однако, не означает, что на самом деле АЧТВ, характеризующее состояние внутреннего пути коагуляционного гемостаза, не изменялось. АЧТВ у больных с осложнениями колебалось как в сторону уменьшения, так и увеличения, о чем говорит очень большой разброс полученных данных. Следовательно, если судить по АЧТВ, то у одних больных наблюдалась гипер-, а у других гипокоагуляционная фаза ДВС.

Концентрация фибриногена у больных с осложнениями СД-1 могла быть как резко увеличенной, так и значительно уменьшенной. Таким образом, и по уровню фибриногена можно говорить о наличии у одних больных гипер-, а у других — гипокоагуляционной фазы ДВС.

У больных с осложнениями отмечалось резкое снижение активности А-III и протеина С, а также выраженнее увеличивалось содержание фибриногена.

Все представленные данные говорят о том, что у больных СД-1 наблюдаются явные признаки ДВС. Чем старше больные, чем продолжительнее протекает заболевание, чем выше у них содержание гликированного гемоглобина, чем большую дозу инсулина больные принимают, чем чаще возникают и тяжелее протекают осложнения, тем более выраженные сдвиги наблюдается у них со стороны свёртывающей системы крови и фибринолиза.

В дальнейшем мы решили проследить, как изменяется агрегационная активность тромбоцитов у больных сахарным диабетом 1 типа.

Наши исследования показывают, что у лиц разного возраста (от 20 до 40 лет) спонтанная агрегация тромбоцитов выражена относительно слабо, развивается чрезвычайно медленно и не превышает 1,35 относительных единиц.

Вместе с тем, у всех исследуемых больных СД-1 выявлялась довольно выраженная спонтанная агрегация тромбоцитов, что можно было зарегистрировать по всем изучаемым нами параметрам

Таблица 5

Состояние коагуляционного гемостаза у больных СД-1 в зависимости от наличия осложнений основного заболевания

Изучаемые показатели	Здоровые *n=42*	Больные без осложнений *n=13*	Больные с осложнениями		
			Ретинопатия, полинейропатия *n=16*	Ретинопатия, полинейропатия, нефропатия *n=15*	Ретинопатия, полинейропатия, нефропатия и другие *n=15*
АЧТВ, с P_1	36,8±1,1	32,1±2,1 <0,05	34,0±5,6	30,3±4,7	33,0±4,6
МНО, ЕД P	1,02±0,11	1,05±0,07	1,24±0,06 <0,05	0,97±0,12	0,99±0,15
Тромбиновое время, с	16,9±0,40	16,0±2,49	14,4±3,6	16,4±4,1	15,7±2,8
АТ-III, % P_1	96,0±3,0	97,7±1,6	81,6±2,8 <0,001	85,0±1,7 <0,001	87,4±1,4 <0,001
Протеин С, % P_1	108±6,2	94,6±1,4	87,7±3,9 <0,05	86,5±7,0 <0,05	85,4±2,3 <0,001
Фибриноген, г/литр P_1 P_2	3,30±0,27	4,41±0,35 <0,001	4,86±0,52 <0,001	4,85±0,47 <0,001	5,56±0,44 <0,001 <0,001
X11a-зависимый фибринолиз, мин. P_1	10,1±0,6	18,9±1,7 <0,001	14,8±1,4 <0,001	15,5±0,8 <0,001	16,0±0,5 <0,001
РФМК, с P_1 P_2	123,6±6,3	51,9±22,0 <0,001	40,6±18,7 <0,001	40,8±14,5 <0,001 <0,001	45,7±29,0 <0,001 <0,001

Примечание: P_1 — достоверность различий между здоровыми и больными; P_2 — между больными без осложнений и с осложнениями.

Таблица 6

Спонтанная агрегация тромбоцитов у больных СД-1

Изучаемые показатели	Здоровые *n=10*	Больные *n=15*
СРА. Степень агрегации, ЕД P	1,23±0,24	2,11±0,24 <0,001
СРА. Скорость агрегации, ЕД/мин P	0,42±0,01	0,69±0,07 <0,01
СП. Степень агрегации, % P	1,19±0,05	5,41±0,75 <0,001
СП. Скорость агрегации, %/мин P	2,43±0,6	4,95±0,65 <0,01

Примечания: **СРА** *— средний радиус агрегатов;*
СП *— светопропускание;*

Таблица 7

АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов у больных СД-1

Изучаемые показатели	Контроль n=10	До лечения n=15
СРА. Степень агрегации, ЕД P	7,92±0,44	5,98±0,35 <0,001
СРА. Скорость агрегации, ЕД/мин. P	18,06±0,84	12,75±0,75 <0,001
СП. Степень агрегации, % P	39,53±1,02	30,41±0,82 <0,001
СП Скорость агрегации, %/мин. P_1	61,02±1,58	51,27±1,72 <0,001

Примечания те же, что и к таблице 6.

(**таблица 6**). Уже эти факты говорят о том, что у больных СД-1 отмечается усиление агрегационной активности тромбоцитов. Особенно интенсивно изменялась спонтанная агрегация тромбоцитов у пожилых больных (старше 50 лет), у которых, как правило, сахарный диабет осложнялся поражением почек и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

В следующей серии наблюдений (**таблица 7**) мы проследили, как изменяется агрегация тромбоцитов на АДФ (10 мкг/мл).

Как видно из приведенной таблицы, у больных СД-1 по всем изучаемым параметрам агрегация тромбоцитов на АДФ оказалась сниженной. Сказанное, однако, не означает, что при СД-1 уменьшается способность тромбоцитов образовывать агрегаты. Мы уже указывали, что у исследуемых больных довольно интенсивно проявляется спонтанная агрегация кровяных пластинок. При этом значительная часть тромбоцитов оказывается вовлеченной в агрегаты, благодаря чему уменьшается число тромбоцитов, способных склеиваться между собой.

Особый интерес представляет изучение агрегации тромбоцитов на действие ристоцитина (ристомицина), ибо последний способен оказывать своё влияние только при наличии фактора фон Виллебранда (vWF), а также в присутствии на кровяных пластинках рецепторов к данному белку (**таблица 8**).

Наши наблюдения показали, что если судить по светопропусканию, то агрегация тромбоцитов у больных СД-1 на ристомицин явно увеличивается. При этом особенно резко возрастает скорость агрегации.

Известно, что при травме сосудов всегда обнажаются волокна коллагена, что приводит к адгезии кровяных пластинок. При СД-1 отмечается явная дисфункция эндотелия, сопровождающаяся повреждением сосудов. Вот почему особый интерес при СД-1 представляет изучение коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов (**таблица 9**).

При использовании в качестве индуктора агрегации коллагена у больных СД-1 при поступлении в стационар агрегация тромбоцитов, по сравнению со здоровыми людьми, оказалась заторможенной.

Наконец, в последней серии исследований мы изучили, как у больных СД-1 осуществляется агрегация тромбоцитов под воздействием адреналина (**таблица 10**).

Оказалось, что если в качестве лиганда агрегации тромбоцитов у больных СД-1 использовался адреналин, то способность кровяных пластинок склеиваться между собой уменьшалась.

Таким образом, все представленные данные говорят о том, что у больных СД-1 наблюдается вторичное, обусловленное потреблением кровяных пластинок, снижение агрегационной способности тромбоцитов.

Одним из информативных показателей, характеризующих состояние системы гемостаза, является индекс лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии.

Таблица 8

Ристомицин-индуцированная агрегация тромбоцитов у больных СД-1

Изучаемые показатели	Здоровые *n=10*	Больные *n=15*
СРА. Степень агрегации, ЕД	6,84±0,99	4,96±0,56
СРА. Скорость агрегации, ЕД/мин.	8,53±0,55	7,54±0,65
СП. Степень агрегации, % P_1	67,68±1.36	73,5±1.6 <0,05
СП. Скорость агрегации, %/мин. P_1	40,88±1,65	63,7±1,47 <0,001

Примечания те же, что и к таблице 6.

Таблица 9

Коллаген-индуцированная агрегация тромбоцитов у больных СД-1

Изучаемые показатели	Здоровые *n=10*	Больные *n=15*
СРА. Степень агрегации, ЕД P	4,97±0,81	3,73±0,33 <0,01
СРА. Скорость агрегации, ЕД/мин. P	8,47±1,74	2,69±0,18 <0,01
СП. Степень агрегации, %	41,49±8,13	54,24±3,04
СП Скорость агрегации, %/мин.	60,24±2,4	63,7±1,47

Примечания те же, что и к таблице 6.

Таблица 10

Адреналин-индуцированная агрегация тромбоцитов у больных СД-1

Изучаемые показатели	Контроль *n=10*	Больные *n=15*
СРА. Степень агрегации, ЕД P	5,22±1,13	2,45±0,08 <0,001
СРА. Скорость агрегации, ЕД/мин. P	4,71±1,13	1,26±0,31 <0,001
СП. Степень агрегации, % P	37,9±2,42	16,24±4,24 <0,001
СП. Скорость агрегации, %/мин. P	43,34±2,51	25,3+2,23 <0,001

Примечания те же, что и к таблице 6.

Вот почему мы решили в следующей серии наших наблюдений изучить, как изменяется способность

Таблица 11

Содержание лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов у больных СД-1 (%)

Контроль	Общая группа *n=48*	Без осложнений *n=10*	Осложнения		
			1 *n=8*	2 *n=15*	3 и более *n=15*
14,1±1,1 P_1 P_2 P_3 P_4	12,9±0,8	24,15±0,97 <0,001	16,29±0,71 <0,001	13,85±0,69 <0,001 <0,05	10,23±0,74 <0,01 <0,001 <0,001 <0,05

Примечания: P_1 — достоверность различий между показателями здоровых и больных, P_2 — между больными без осложнений и с осложнениями, P_3 — между больными с 1 осложнением и 2, 3 и более, P_4 — между больными с 2 осложнениями и 3 и более.

тромбоцитов образовывать коагрегаты с лимфоцитами. Эти исследования были проведены на 48 больном.

Проведенные наблюдения показали, что если судить по средним цифрам, то у больных СД-1 число образуемых лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов не отличается от цифр, обнаруженных у здоровых людей (**таблица 11**). Вместе с тем, такое впечатление явно обманчиво. При более детальном анализе выяснено, что если сахарный диабет протекает без осложнений, то количество лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов резко возрастает. Если сахарный диабет осложняется нейропатией, нефропатией или ретинопатией, а также поражениями сердечно-сосудистой системы, то количество коагрегатов снижается. Чем больше осложнений и чем тяжелее они протекают, тем меньше образуется лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов.

Интересно было проследить, как изменяется число лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов в зависимости от их исходного уровня в процессе лечения больных (**таблица 12**).

Оказалось, что, если число агрегатов было больше средней величины, то в процессе лечения оно снижалось, если же меньше, то проявляло тенденцию к увеличению.

Нам кажется, что полученные в процессе терапии сахарного диабета сдвиги лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии вполне закономерны. У одних больных имелось повышенное количество лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов и это является адекватной ответной реакцией на развитие патологического процесса (1 стадия). При тяжелом течении заболевания большинство образующихся коагрегатов отправляются в ткани, где выполняют свои основные функции: осуществление местного иммунитета, усиление репаративных процессов, местный гемостаз

Таблица 12

Влияние применяемой терапии на лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию в зависимости от исходного уровня коагрегатов (%)

Исходный уровень	До лечения	После лечения
Низкий	6,3±0,9	8,3±1,1
Высокий P	15,0±1,5	7,6±0,9 <0,001

P — достоверность различий до и после лечения.

и др. (2 стадия процесса). По аналогии с коагулопатией потребления при развитии ДВС-синдрома, в этом случае мы можем говорить о лимфопатии потребления. Более подробно на данном вопросе мы остановимся в заключительной главе нашей работы.

В заключительной серии исследований нами изучено, как изменяется состояние клеточных мембран кровяных пластинок у больных с неосложнённым и осложнённым течением сахарного диабета. С этой целью были исследованы отдельные показатели перекисного окисления липидов и антирадикальной защиты (**таблица 13**).

Наши наблюдения показали, что в клеточных мембранах тромбоцитов накапливаются в количестве, превышающем обычные, продукты ПОЛ — диеновые конъюгаты и шиффовы основания. Одновременно обнаруживаются изменения активности ферментов антиоксидантной защиты: достоверное снижение активности Г-6-Ф-дегидрогеназы при одновременном повышении активности каталазы и супероксиддисмутазы.

Рост активности каталазы и супероксиддисмутазы можно рассматривать как защитную реакцию, отражающую адаптационные возможности организма больных СД-1 в период, протекающий без осложнений.

Таблица 13

Содержание продуктов ПОЛ, антиоксидантных ферментов и активность фосфолипазы A_2 в мембранах тромбоцитов у здоровых и больных с неосложненным и осложнённым СД-1

Показатели	Здоровые	Больные без осложнений	Больные с осложнениями (микроангиопатиями)
Диеновые конъюгаты, ммоль/мл P_1 P_2	17,30±0,6	25,30±1,11 <0,001	28,36±0,24 <0,001 <0,1
Шиффовы основания, усл. ед. фл. P_1	7,97±0,05	12,24±0,18 <0,001	11,33±0,23
СОД, усл. ед. торм./мг белка P_1 P_2	2,28±0,16	3,82±0,11 <0,001	2,14±0,01 <0,001
Г-6ФДГ, мл. ед. акт/мг белка P_1 P_2	0,35±0,06	0,21±0,02 <0,01	0,16±0,07 <0,001 <0,05
Каталаза, мкмоль/мин на мг белка P_1 P_2	0,84±0,09	0,91±0,01	0,68±0,075 <0,05 <0,01
Фосфолипазная активность, мкмоль/мл/мг белка P_1 P_2	0,61±0,05	0,75±0,02 <0,01	0,95±0,05 <0,001 <0,001

Примечание: P_1 — достоверность различий между здоровыми и больными; P_2 — между больными без осложнений и с осложнениями.

Следует также отметить, что параллельно у больных СД-1 с неосложнённым течением патологического процесса наблюдается увеличение активности мембранодестабилизирующего фермента — фосфолипазы A_2 (относительно показателей у здоровых).

Таким образом, у больных СД-1 даже при отсутствии осложнений наблюдается существенная гипероксидация липидного бислоя мембран тромбоцитов, инициируемая, наряду с другими факторами, значительной активацией фосфолипазы A_2 и изменением активности ферментов антиоксидантной защиты. В совокупности все эти сдвиги создают условия для модификации липидной структуры клеточных мембран.

У больных СД-1 при наличии выраженных сосудистых осложнений (микроангиопатии) имеется тенденция к росту содержания в мембранах тромбоцитов диеновых конъюгатов с одновременной тенденцией к снижению шиффовых оснований. Последнее является неблагоприятным фактором, поскольку образование шиффовых оснований направлено на нейтрализацию липоперекисей [10].

Активность мембранодестабилизирующего фермента — фосфолипазы A_2– значительно повышена у больных СД-1 с микроангиопатиями.

Сравнивая содержание продуктов ПОЛ и активность фосфолипазы A_2 мембран тромбоцитов у больных СД-1 без осложнений и с сосудистыми осложнениями, видим, что мембранодестабилизирующие процессы при СД с микроангиопатиями усилены.

Вместе с тем, у больных СД-1 значительно снижена активность ферментативного звена антиоксидантной защиты — активность СОД и каталазы статистически достоверно ниже по сравнению с показателями здоровых и больных с неосложненным СД-1.

Таким образом, в мембранах тромбоцитов у больных СД-1 с микроангиопатиями происходит значительная активация мембранодестабилизирующих процессов (ПОЛ, фосфолипазы A_2) и существенно истощается антиоксидантная защита. Такое нарушение равновесия между про- и антиоксидантными механизмами клеточных мембран является одной из основных причин структурной перестройки липидной фазы мембран у больных СД-1 с микроангиопатиями.

Все представленные данные говорят о том, что у больных СД-1 наблюдается выраженная спонтанная агрегация тромбоцитов и вторичное снижение способности кровяных пластинок образовывать конгломераты на исследуемые стандартные лиганды. При СД-1 у большинства больных возникает типичная хроническая форма ДВС-синдрома.

При этом одновременно усиливаются процессы пероксидации в тромбоцитах и снижаются факторы антирадикальной защиты.

Нет никакого сомнения, что обнаруженные сдвиги обусловлены дисфункцией эндотелия, увеличением концентрации так называемых «диабетических» цитокинов (IL-1, IL-2, IL-6, TNFα и β и др.), обладающих выраженным прокоагулянтным действием, увеличением уровня гомоцистеина и другими еще далеко не изученными факторами [10, 11, 14, 15, 16, 22, 23, 27].

Сказанное позволяет считать, что для нормализации состояния системы гемостаза у больных СД-1 необходимо применять не только антиагреганты (аспирин, тиклопедин, клопидогрель) и антикоагулянты, но и соединения, обладающие антиоксидантным действием.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Балуда В. П., Балуда М. В., Деянов И. И., Тельпушков И. К. Физиология системы гемостаза. Москва, 1995. С. 250.*
2. *Балуда В. П. Балуда М. В., Гольдберг А. П., Салманов П. Л. Претромботическое состояние. Тромбоз и его профилактика. — Москва-Амстердам: Из-во ООО «Зеркало-М», 1999. — 298 с.*
3. *Балуда М. В., Новикова И. В. Состояние антитромбогенной активности стенки сосудов у больных сахарным диабетом и способы её коррекции. Патология гемокоагуляции. — М., 1995. Часть 1. С. 18–20.*
4. *Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М. «Ньюдиамед», 2001. 300 с.*
5. *Бышевский А. Ш., Умутбаева М. К., Алборов Р. Г. Связь гемостаза с перекисным окислением липидов. Москва, «Медицинская книга». 2003. 96 с.*
6. *Бышевский А. Ш., Умутбаева М. К., Алборов Р. Г. Антиоксиданты в коррекции гемокоагуляционных сдвигов. Москва, «Медицинская книга». 2004. 80 с.*
7. *Бышевский А. Ш., Галян С. Л., Шаповалов П. Я. Витамины, внутрисосудистое свёртывание крови и липидпероксидация. Москва, «Медицина». 2006. 96 с.*
8. *Витковский Ю. А., Кузник Б. И., Солпов А. В. Феномен лимфоцитарно-тромбоцитарного розеткообразования. Иммунология. 1999. № 4. С. 35–37.*
9. *Дедов И. И. Особенности дебюта и прогноза сосудистых осложнений у больных медленно прогрессирующим диабетом взрослых. М, 2003. С. 38.*
10. *Жмуров В. А., Крылов В. И., Кашуба Э. А., Чимаров В. М. Нефропатии (Аспекты мембранологии). Тюмень: Тюменьский гос. ун-т, Тюменьский мед. ин-т. 1993. 360 с.*
11. *Зак К. П., Малиновская Т. М., Тронько Н. Д. Иммунитет у детей, больных сахарным диабетом. Киев, «Книга плюс». 2002. С. 112.*
12. *Ключерева Н. Н. Патогенетическое обоснование применения вилона при сахарном диабете первого типа. Автореф. канд. медицинских наук. 14.00.16. Чита. 2005. С. 24.*
13. *Колесниченко Л. Р. Саногенетические аспекты действия эпиталона на состояние системы гемостаза и уровень инсулина у больных сахарным диабетом 1 типа. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Чита. 2006. 22 с.*
14. *Кузник Б. И., Витковский Ю. А., Солпов А. В. Адгезивные молекулы и лейкоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия. Вестник гематологии. 2006, № 2. С. 42–51.*
15. *Кузник Б. И., Колесниченко Л. Р., Ключерева Н. Н. и др. Влияние тимомиметика вилона на состояние свёртывающей системы крови и фибринолиза у больных сахарным диабетом 1 типа разного возраста. Успехи геронтологии. 2006. В. 19. С. 107-115.*
16. *Макацария А. Д., Пшеничникова Е. Б., Пшеничникова Т. Б., Бицадзе О. В. Метаболический синдром и тромбофилия в акушерстве и гинекологии. М. Изво МИА. 2006. С. 480 с.*
17. *Мищенко В. П., Мищенко И. В. Физиология системы гемостаза. Полтава, 2003. С. 124.*
18. *Мищенко В. П., Ерёмина Е. Л., Мищенко И. В. Физическая активность, гемостаз и здоровье. Полтава. 2004. С. 144.*
19. *Мищенко В. П., Мищенко И. В., Цебржинский О. И. Перекисное окисление липидов, антиоксиданты и гемостаз. Полтава. АСМИ. 160 с.*
20. *Момот А. П. Патология гемостаза. Санкт-Петербург. 2006. 210 с.*
21. *Нелаева А. А. Клинико-патогенетическое значение состояния клеточных мембран элементов крови у больных инсулинзависимым сахарным диабетом Дисс…. доктора медицинских наук. Тюмень. 1997. С. 328.*
22. *Северин А. С., Шестакова М. В. Нарушение системы гемостаза у больных сахарным диабетом. Сахарный диабет. 2004. № 1. С. 62–67.*
23. *Fiorina P., Lanfredini M, Montanari A. et al. Plasma homocysteintc and folate are related to arterial blood pressure in diabetes mellitus. Am. J. Hypertens. 1998. № 9. P. 110-1107.*
24. *Ferroni P., Basili S., Falco A., Davi G Platelet activation in type 2 diabetes mellitus J Thromb. Haemost. 2004. V. 2. P. 1282–1291.*

25. Luscher T. F., Creager J., Beckman A., Cosentino F Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences and medical therapy Circulation. 2003. V. 108. P. 1655–61.
26. Patterson C. C., Dahlguist G., Soltesz G. et al. Is childhood-onset Type 1 diabetes a wealth-related disease? An ecological analysis of European incidence rates. Diabetologia. 2001. V. 44. Suppl. 3. P. 9–16.
27. Zimmet P. Z. Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care. Diabetologia. 1999. V. 42. P. 499-518.

РОЛЬ АНАМНЕСТИЧЕСКИХ ДАННЫХ В СИСТЕМЕ СКРИНИНГА ПАТОЛОГИИ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

Т. В. Павлова, Г. Д. Коробов
Самарский государственный медицинский университет, Самарский клинический кардиологический диспансер

THE ROLE OF ANAMNESIS IN SCREENING OF HEMOSTASIS' PATHOLOGY IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

T. V. Pavlova, G. D. Korobov
Samara State Medical University, Samara Regional Cardiac Hospital

В статье представлены результаты анкетирования, проведенного для изучения распространенности геморрагических проявлений среди пациентов с ишемической болезнью сердца. Исследована информированность больных о форме, условиях, сезонности и частоте возникновения геморрагических проявлений, а также семейном анамнезе. Установлена прямая зависимость между длительностью заболевания и информированностью больных о форме и условиях возникновения кровоточивости. Выявлены два сезонных пика геморрагических проявлений (апрель, июль), что требует особой осторожности при планировании оперативных вмешательств.

Article presents the results of the questionnaire design about bleeding sickness in patients with ischemic heart disease. The information distribution about form, conditions, seasonality and frequency of hemorrhagic diathesis were analyzed. The line dependence between duration of ischemic heart disease and form, conditions of hemorrhagic diathesis are established. There are two seasonal peaks of bleeding sickness (April and July), that is very important for planning of surgery.

Ключевые слова*: анамнез заболевания — кровоточивость — ишемическая болезнь сердца.*

Keywords*: medical history — hemorrhagic diathesis — ischemic heart disease.*

Распространенность легких и латентных форм коагулопатий и тромбоцитовазопатий достаточно широка, и нет такой области медицины, где бы врачи не сталкивался с геморрагическими проявлениями. Особенно актуальна эта проблема для хирургических клиник. Точное установление механизма нарушения гемостаза осуществляется в результате углубленного гемостазиологического обследования. В то же время тщательный опрос больного, проводимый по определенному плану, позволяет зачастую поставить предварительный диагноз [Шитикова А. С., 1977; Фермилен Ж., Ферстрате М., 1984; Алексеев Н. А., 2005]. Вследствие этого работа над созданием анкетной формы для интервьюирования больных и ее применение у больных хирургического профиля представляется актуальной.

Цель исследования — изучить распространенность геморрагических проявлений среди пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) с помощью разработанного анкетного листа.

Задачи исследования:

1. выявить осведомленность пациентов с ИБС о гемостазиологических особенностях своего организма;
2. оценить информативный вес анамнестических сведений о предрасположенности к кровоточивости;
3. обосновать необходимость включения углубленного сбора анамнеза в систему скрининг-диагностики патологии гемостаза у пациентов с ИБС.

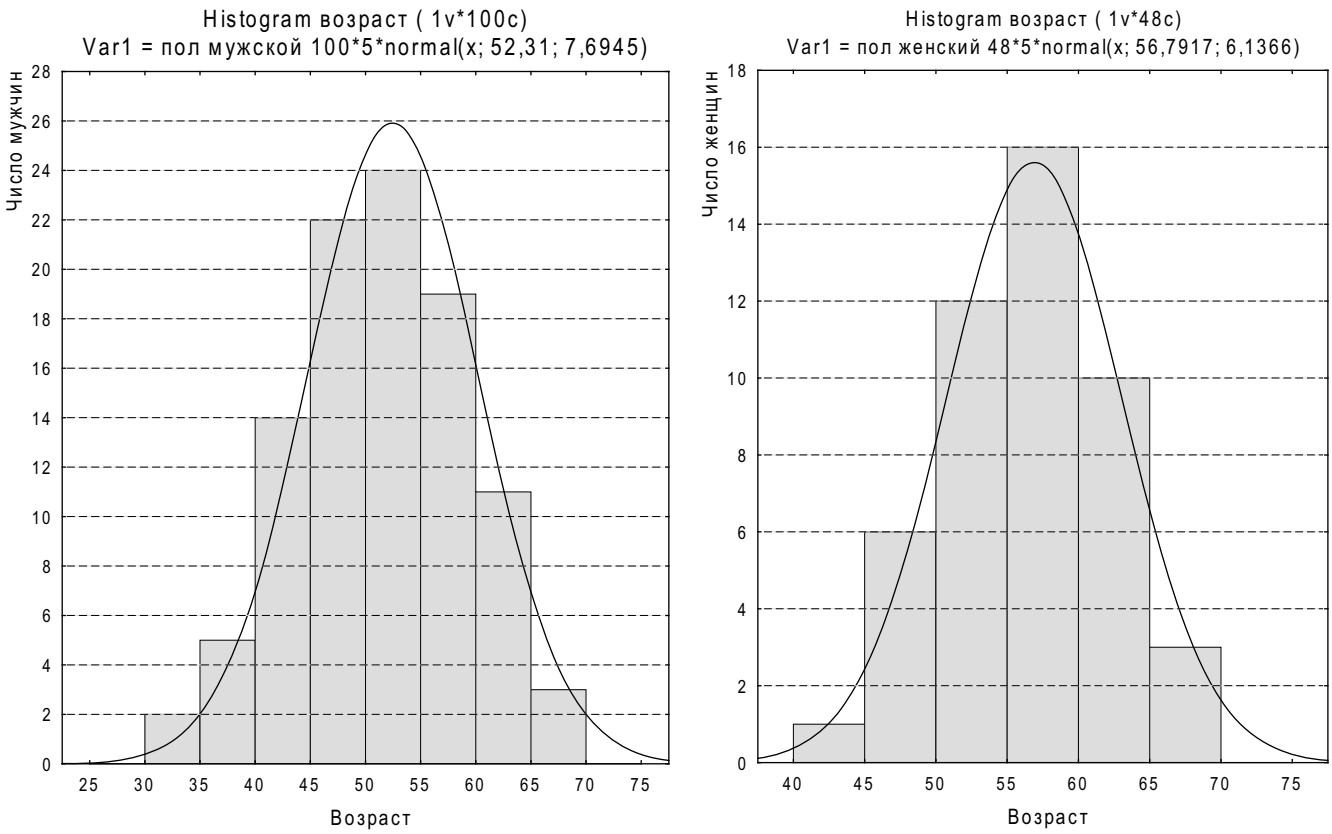


Рис. 1 Распределение пациентов по полу и возрасту

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено анкетирование 148 пациентов с ИБС методом интервьюирования, из них 100 (68 %) мужчин и 48 женщин (32 %). Распределение пациентов по возрасту и у мужчин, и у женщин соответствует характеристикам нормального распределения и составляет 52,3±7,8 года у мужчин и 56,8±6,1 года у женщин (**рис. 1**). Все пациенты поступили в кардиохирургическое отделение СОККД для проведения коронарного шунтирования. Опросный лист для анкетирования больных содержал несколько блоков вопросов: о форме геморрагических проявлений; о частоте и условиях их возникновения; о сопутствующих заболеваниях; о семейном анамнезе.

Полученные данные изучались с использованием «анализа соответствий» (correspondence analyses), представляющего собой разведочный метод анализа, позволяющий визуально и численно исследовать структуры данных с помощью ППП «STATSOFT-RUS 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ зависимости информированности больных о форме геморрагических проявлений от продолжительности ИБС показал, что с увеличением длительности заболевания пациенты более четко представляют себе форму геморрагий (**рис. 2**). Полученная аппроксимирующая логарифмическая кривая описывается уравнением:

$$y = 30{,}062\mathrm{Ln}(x) + 24{,}119, \text{ при } r^2 = 0{,}9345,$$

где x — длительность заболевания.

Анализ зависимости информированности больных об условиях возникновения повышенной кровоточивости также возрастает по мере течения заболевания, однако в более ранние сроки заболевания больные не всегда могут указать на условия, при которых возникают геморрагические проявления (**рис. 2**). Аппроксимирующая полиномиальная кривая описывается уравнением:

$$y = -0{,}0574x^3 + 0{,}8763x^2 + 5{,}8452x + 0{,}6303,$$
$$\text{при } r^2 = 0{,}9731,$$

где x — длительность заболевания.

Таким образом, несмотря на общую сходную динамику, четкую информацию о форме кровоточивости пациенты могут дать в более ранние сро-

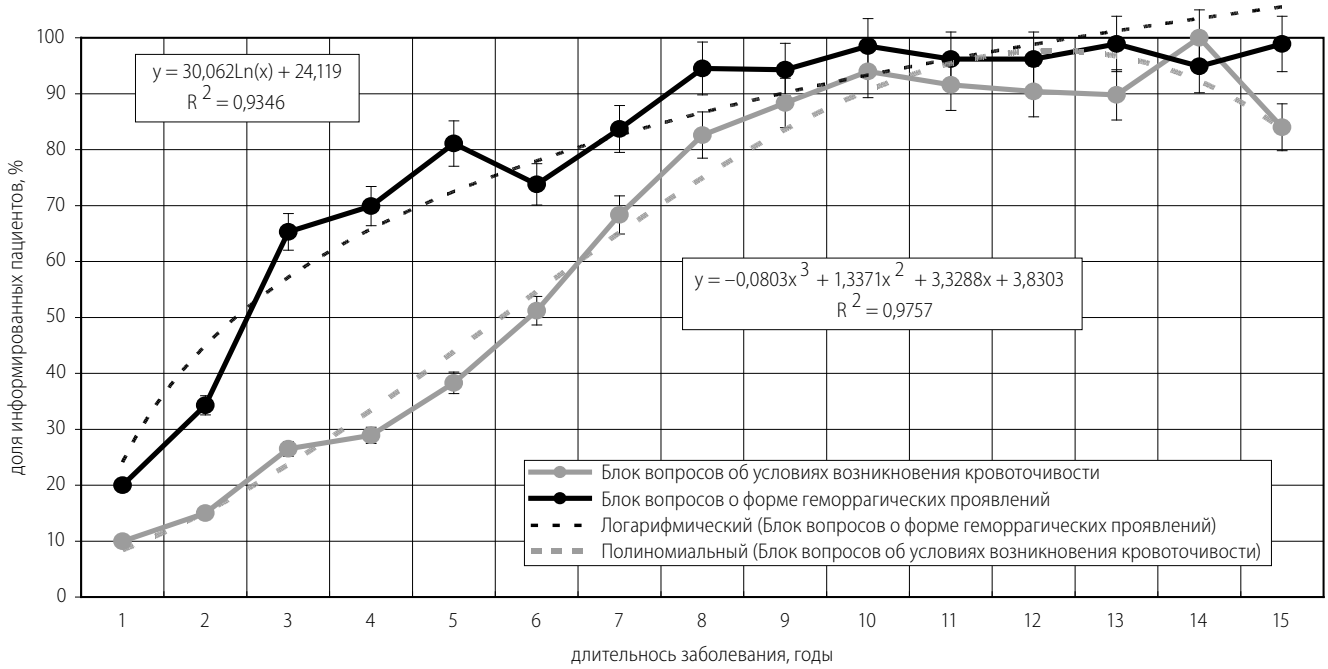


Рис. 2 Зависимость информированности пациентов с ИБС о форме и условиях возникновения геморрагических проявлений от длительности заболевания

ки, тогда как об условиях ее возникновения имеют меньшее представление. Информированность пациентов возрастает по мере увеличения длительности заболевания**.**

В изучаемой группе пациентов наиболее часто встречались следующие сопутствующие заболевания: артериальная гипертензия различной степени — у 71,6 % (106 чел.), гиперлипидемия — 56,8 % (84 чел.), хронический бронхит — 33,1 % (49 чел.), ожирение различной степени выраженности — 21,6 % (32 чел.), сахарный диабет II типа — 8,1 % (12 чел.). Зависимость информированности больных о сопутствующих заболеваниях также увеличивается соразмерно длительности ИБС, однако через 5–6 лет от момента начала заболевания отмечается максимум информированности, который мы связываем с выявлением сопутствующей патологии во время госпитализаций (рис. 3). Полученная зависимость описывается полиномиальным уравнением:

$$y = 0{,}0017x^6 - 0{,}0867x^5 + 1{,}7315x^4 - 16{,}578x^3 + 76{,}755x^2 - \\ - 147{,}34x + 98{,}306, \text{ при } r^2 = 0{,}8449,$$

где x — длительность заболевания.

В то же время информированность о семейной истории заболевания не претерпевает значительных изменений по мере увеличения длительности ИБС (**рис. 3**). Полученная аппроксимирующая полиномиальная кривая описывается уравнением:

$$y = -0{,}1781x^2 + 4{,}8599x + 16{,}824 \\ \text{при } r^2 = 0{,}9484,$$

где x — длительность заболевания.

Кроме того, данные по вопросам семейного анамнеза не коррелируют с информированностью о собственном здоровье пациента. Таким образом, информативный вес сведений о семейном анамнезе не велик.

На следующем этапе работы мы изучали частоту встречаемости спонтанных геморрагических проявлений у пациентов обследованной группы: петехии и экхимозы встречались у 27 % опрошенных (40 чел); носовые кровотечения — у 12,8 % пациентов (19 чел.); десневые кровотечения — у 27 % (40 чел.) (**рис. 4**). Кровотечения при проведении операций отмечались у 8,1 % опрошенных (12 чел.), после удаления зубов — у 3,4 % (5 чел.), и постинъекционные гематомы — у 4,1 % (6 чел.). Сочетание нескольких видов кровоточивости было выявлено у 12,2 % респондентов (18 чел.).

Кровотечения в родах и раннем послеродовом периоде отмечали 4,1 % опрошенных женщин (2 чел.), также у 4,1 % женщин (2 чел.) выполнение медицинских абортов и диагностических выскабливаний осложнилось кровотечением. 18,9 % женщин (9 чел.) отмечали в анамнезе мено- и метроррагии. Таким образом, частота встречаемости геморрагических проявлений достаточно велика, причем в основном

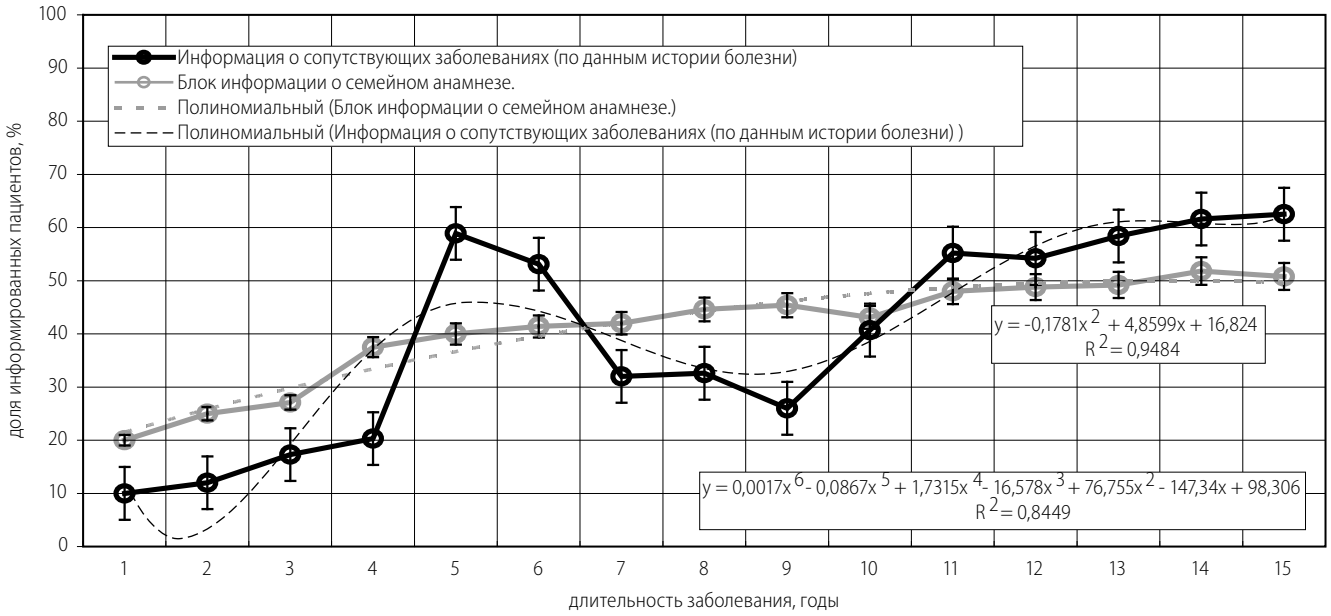


Рис. 3 Зависимость информированности пациентов с ИБС о сопутствующих заболеваниях и о семейном анамнезе от длительности заболевания

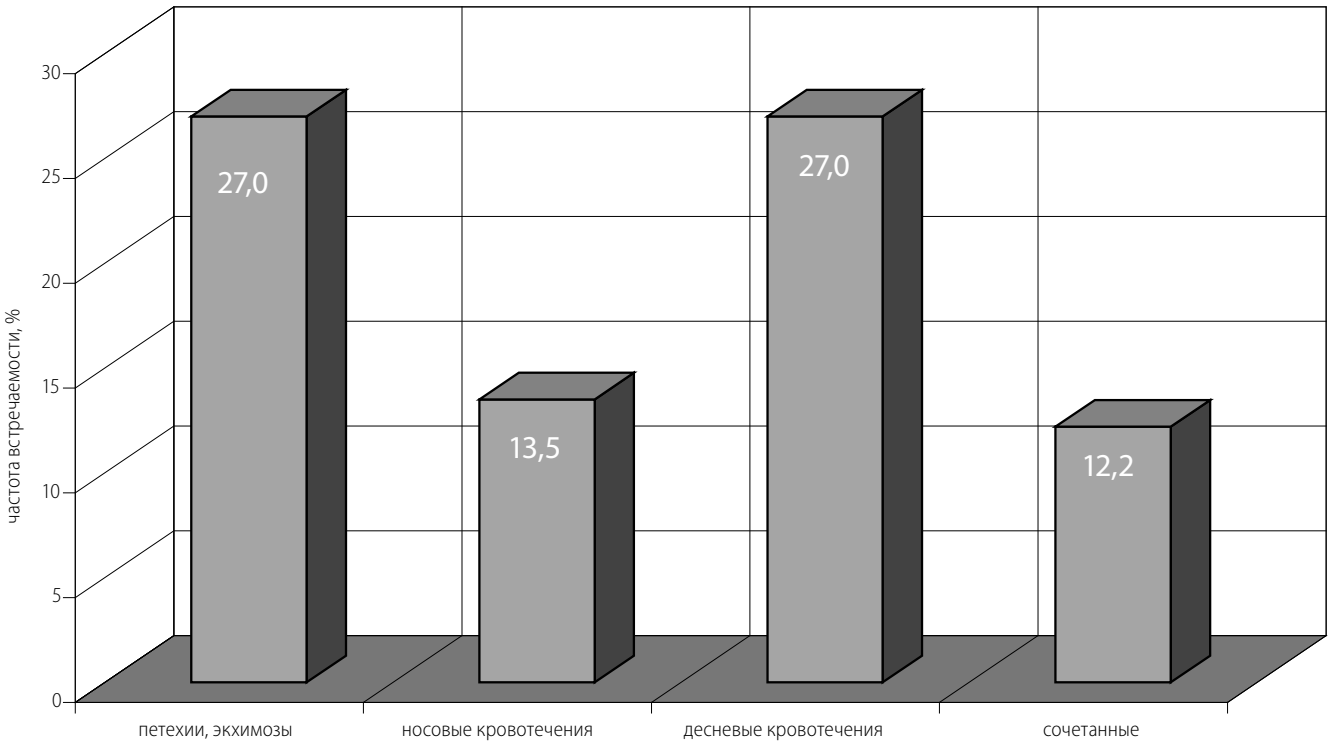


Рис. 4 Частота встречаемости отдельных проявлений кровоточивости среди пациентов с ИБС

за счет нарушений тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза.

Клинические признаки железодефицитной анемии присутствовали у 24,3 % респондентов (36 чел.), из них женщин — 75 % (27 чел.); у 16,2 % (24 чел.) этот диагноз был подтвержден данными лабораторного исследования.

Анкетирование больных позволило выявить 2 сезонных пика геморрагических проявлений: в апреле и июле. Такая информация должна настора-

живать врачей, т.к. свидетельствует о возможном высоком риске развития геморрагических осложнений именно в эти периоды.

ВЫВОДЫ

1. Анамнестические данные представляют большую информативную ценность при планировании хирургического лечения ИБС.
2. Особую осторожность при подготовке к операционному вмешательству необходимо проявлять в весенне-летний период.
3. Осведомленность пациентов о форме и условиях возникновения геморрагических проявлений является наиболее ценной при сборе анамнеза.
4. Сведения об отсутствии у родственников больного геморрагических проявлений нельзя считать достоверными. Отрицательный семейный анамнез не может являться обоснованием отказа от углубленного гемостазиологического обследования при наличии сведений о проявлениях кровоточивости.

ЛИТЕРАТУРА:

1. *Алексеев Н. А. Геморрагические диатезы и томбофилии.//СПб. — 2005. — С. 198-202.*
2. *Боровиков В. П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов.// — СПб. — 2001. — С. 246-318.*
3. *Фермилен Ж., Ферстрате М. Гемостаз.//М. — 1984. — С. 29–34.*
4. *Шитикова А. С. Значение анамнеза при обследовании больных с нарушениями в системе гемостаза//Тер. архив. — 1977. — № 8. — С. 132-136.*
5. *Юнкеров В. И., Григорьев С. Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований.//СПб. — 2002. — 266с.*

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПЕРКАПНИИ НА ГЕМОСТАЗ И ГЕМОРЕОЛОГИЮ

М. Г. Полухина, В. П. Куликов, В. В. Усынин, В. Г. Лычев

Алтайский Государственный Медицинский Университет, Барнаул

HYPOXICAL HYPERCAPNIE INFLUENCE UPON HEMOSTASIS AND HEMORHEOLOGY

M. G. Poluchina, V. P. Kulikov, V. V. Usynin, V. G. Lychev

Altai State Medical University, Barnaul

Key words: *hypoxical hypercapnia — hemostasis — haemorheology.*

ВВЕДЕНИЕ

Повторяющиеся воздействия гипоксии повышают устойчивость организма не только к дефициту кислорода, но и другим стрессорам [27]. Этот эффект перекрестной адаптации давно используют для повышения функциональных возможностей организма, профилактики и лечения ряда заболеваний [11,21]. Однако многочисленные исследования свидетельствуют о том, что гипоксия в сочетании с гиперкапнией обладает значительно большим по сравнению с гипоксией адаптогенным потенциалом [1,9]. Экспериментально установлено, что гипоксическая гиперкапния обладает нейропротективным свойством [7].

Известно, что гипоксия и гиперкапния оказывают выраженное влияние на состояние системы гемостаза [16] и реологию крови [23]. Однако изучению гемостаза и гемореологии при срочной и долговременной адаптации к сочетанному воздействию гипоксии и гиперкапнии посвящены единичные работы [1,22], что не позволяет сделать заключение о влиянии гипоксической гиперкапнии на коагуляционные и реологические свойства крови, а также определить их значимость в механизмах увеличения неспецифической резистентности. Поэтому целью настоящей работы было изучение состояния системы гемостаза и гемореологии при срочной и долговременной адаптации к гипоксической гиперкапнии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для реализации поставленной цели было проведено четыре серии исследований. В качестве объекта исследования использовали 96 крыс — самцов линии Wistar, массой тела 205,8 ± 10,7 г. В первой серии после однократного воздействия гипоксической гиперкапнии определяли показатели коагуляционного гемостаза, во второй — показатели тромбоцитарного гемостаза, гемореологии и свободнорадикального окисления в крови. В третьей серии оценивали влияние тренировок гипоксической гиперкапнией на коагуляционный гемостаз и активность свободнорадикального окисления в крови. У животных четвертой серии после цикла гипоксически-гиперкапнических тренировок определяли показатели тромбоцитарного гемостаза и гемореологии.

Гипоксическую гиперкапнию создавали путем помещения крыс в специальную герметичную камеру с калибровочным отверстием диаметром 3 мм. Концентрация CO_2 во вдыхаемой смеси контролировалась при помощи газоанализатора «Spirolit-2» (Германия) и составляла 4,5 ± 0,3 %, дефицит O_2 –5,6 ± 0,3 %. Однократное воздействие гипоксической гиперкапнии моделировали путем вдыхания газовой смеси в течение 20 минут. Гипоксически-гиперкапнические тренировки проводили ежедневно по 20 минут в течение 30 дней [15]. Животных контрольной группы помещали в аналогичные камеры со свободным доступом атмосферного воздуха на адекватные промежутки времени. Экспериментальная работа проведена в осенне-зимний период. С учетом дневных колебаний устойчивости к гипоксии [30], тренировки крыс проводили с 16 до 18 часов. Все инвазивные манипуляции на животных производили под тиопенталовым наркозом (50 мг/кг, внутрибрюшинно).

Систему гемостаза исследовали стандартными методами с использованием диагностических тест-наборов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия). Исследование гемореологии (определение вязкости крови, плазмы, деформируемости, спонтанной и стимулированной агрегации эритроцитов) осуществляли методом капиллярной вискозиметрии [29]. Для выявления стрессорной значимости выбранного режима воздействия у животных оценивали активность свободнорадикального окисления по следующим параметрам: общая антиоксидантная активность в эритроцитах (ОАА) [6], общая прооксидантная активность (ОПА) [12], концентрация оксида азота (по нитритам — NO_2) и малонового диальдегида (МД) в плазме крови [10].

Полученные результаты обрабатывали статистическими методами на персональном компьютере с помощью пакетов статистических программ Microsoft Excel 2000 и Statistic for Windows 5,0. Для каждой выборки вычисляли среднюю арифметическую (X) и ошибку средней арифметической (m). Достоверность различий исследуемых выборочных оценивали по критерию Стьюдента (t) и значению вероятности (p). Статистически достоверными считались различия, уровень значимости которых был $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Однократное воздействие гипоксической гиперкапнии не оказывало выраженного влияния на тромбоцитарный гемостаз, но вызывало изменения в коагуляционном гемостазе (**табл. 1**). Как можно видеть, у крыс экспериментальной группы (по сравнению с контролем) отмечали укорочение силиконового (на 23,9 %) и каолинового времени (на 14,4 %). Кроме того, при однократном воздействии гипоксической гиперкапнии в плазме крови увеличивалась активность фактора Виллебранда. Срочная адаптация к гипоксической гиперкапнии сопровождалась снижением вязкости крови и увеличением спонтанной агрегационной активности эритроцитов (**табл. 2**). У животных экспериментальной группы установлено увеличение концентрации МА в плазме (9,3 ± 0,4 мкМ/л) по сравнению с контролем (6,6 ± 0,4 мкМ/л). По концентрации нитритов, показателям ОАА и ОПА после однократного воздействия гипоксической гиперкапнией животные не имели значимых межгрупповых отличий.

В отличие от однократного воздействия, тренировки гипоксической гиперкапнией приводили к активации тромбоцитарного гемостаза (**табл. 3**). Время агрегации тромбоцитов у животных экспериментальной группы укорачивалось на 25 %, при этом скорость агрегации в первые 30 секунд возрастала на 120 %. Исследование коагуляционного гемостаза (**табл. 4**) выявило удлинение силиконового времени (на 49,7 %), каолинового времени (на 17 %), увеличение индекса диапазона контактной активации (на 10 %) и сокращение времени лизиса эуглобулинового сгустка (на 28,5 %) у тренированных крыс по сравнению с нетренированными животными. Долговременная адаптация к гипоксической гиперкапнии сопровождалась увеличением вязкости крови, гематокрита и снижением деформируемости эритроцитов по коэффициенту жесткости (**табл. 5**).

Таблица 1

Показатели коагуляционного гемостаза при однократном воздействии гипоксической гиперкапнии (X ± m)

Показатель	Контрольная группа (*n = 16*)	Экспериментальная группа (*n = 15*)	*p*
Силиконовое время (сек.)	214,4 ± 18,4	163,3±16,9	<0,05
Каолиновое время (сек.)	83,4 ± 4,5	71,4±4,6	<0,05
ИДКА (%)	58,4 ± 2,8	51,5±4,5	>0,5
АПТВ (сек.)	23,3 ± 0,5	21,9±0,3	>0,5
ПТВ (сек.)	12,8 ± 0,3	12,7±0,3	>0,5
ТВ (сек.)	42,3 ± 4,4	42,8±5,6	>0,5
Фибриноген (г/ л)	2,6 ± 0,2	2,3±0,3 (n=11)	>0,5
РФМК (мг/100мл)	3,4 ± 0,3	3,7±0,3	>0,5
Фактор Виллебранда (%)	108,0 ± 4,4 (n = 10)	130,9±8,6 (n=10)	<0,05
Эуглобулиновый фибринолиз (мин.)	216,3 ± 21,9 (n = 15)	162,3±24,7	>0,5

Примечание: ИДКА — индекс диапазона контактной активации; АПТВ — активированное парциальное тромбопластиновое время; ПТВ — протромбиновое время; ТВ — тромбиновое время; РФМК — концентрация растворимых фибрин-мономерных комплексов.

Таблица 2

Гемореологические показатели при однократном воздействии гипоксической гиперкапнии (X ± m)

Показатель	Контрольная группа (*n = 10*)	Экспериментальная группа (*n = 10*)	*p*
Гематокрит (%)	35,10 ± 0,76	33,70 ± 0,84	>0,5
Вязкость крови (о. е.)	1,78 ± 0,02	1,71 ± 0,02	<0,05
Вязкость плазмы (о. е.)	1,17 ± 0,01	1,18 ± 0,01	>0,5
Коэффициент жесткости эритроцитов	1,50 ± 0,02	1,51 ± 0,02	>0,5
Спонтанная агрегация эритроцитов (у. е.)	2,10 ± 0,31	3,70 ± 0,54	<0,01
Стимулированная агрегация эритроцитов (у. е.)	5,50 ± 1,36	4,70 ± 0,26	>0,5

Таблица 3

Показатели тромбоцитарного гемостаза после цикла гипоксически-гиперкапнических тренировок (X ± m)

Показатель	Контрольная группа (*n = 11*)	Экспериментальная группа (*n = 11*)	*p*
Тромбоциты (тыс./ мкл)	529,6 ± 10,1	526,9±10,1	>0,5
Степень агрегации тромбоцитов (%)	3,3 ± 0,7 (*n = 9*)	4,2±0,7	>0,5
Скорость агрегации за 30 секунд (%/ мин.)	1,0 ± 0,3 (*n = 9*)	2,2±0,4	<0,01
Время агрегации тромбоцитов (сек.)	411,9 ± 26,8 (*n = 9*)	308,6±32,3	<0,05

Концентрация МА у адаптированных к гипоксической гиперкапнии крыс составляла 5,6 ± 0,6 мкМ/л, у нетренированных — 3,3 ± 0,3 мкМ/л (*p <0,01*). После завершения тренировок по концентрации нитритов в сыворотке крови, ОАА и ОПА в эритроцитах животные экспериментальной и контрольной групп не различались.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования показали, что однократное воздействие гипоксической гиперкапнии сопровождалось активацией коагуляционного гемостаза преимущественно по внутреннему пути. Подобные изменения гемокоагуляции при острой гипоксии были получены и в работах других авто-

Таблица 4

Показатели коагуляционного гемостаза после цикла гипоксически-гиперкапнических тренировок (X ± m)

Показатель	Контрольная группа (*n = 9*)	Экспериментальная группа (*n = 14*)	*p*
Силиконовое время (сек.)	152,8 ± 18,0	229,1 ± 13,7	<0,01
Каолиновое время (сек.)	65,4 ±3,4	76,0 ± 3,1	<0,05
ИДКА (%)	59,6 ± 1,4	65,6 ± 2,1	<0,01
АПТВ (сек.)	19,7 ± 0,8	19,6 ± 0,5	>0,5
ПТВ (сек.)	12,8 ± 0,6	13,0 ± 0,4	>0,5
ТВ (сек.)	35,8 ± 3,2	34,0 ± 1,3	>0,5
Фибриноген (г/ л)	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,2	>0,5
РФМК (мг/100мл)	3,0 ± 0,0	3,1 ± 0,1	>0,5
Фактор Виллебранда (%)	82,2 ± 6,2	85,0 ± 5,1 (*n = 11*)	>0,5
Эуглобулиновый фибринолиз (мин.)	167,8 ± 21,3	120,0 ± 7,8	<0,05

Таблица 5

Гемореологические показатели после цикла гипоксически-гиперкапнических тренировок (X ± m)

Показатель	Контрольная группа (*n = 11*)	Экспериментальная группа (*n = 11*)	*p*
Гематокрит (%)	36,63 ± 0,69	40,91 ±1,04	<0,001
Вязкость крови (о. е.)	1,63 ± 0,01	1,71 ± 0,01	<0,001
Вязкость плазмы (о. е.)	1,16 ± 0,01	1,16 ± 0,01	>0,5
Коэффициент жесткости эритроцитов	1,42 ± 0,02	1,42 ± 0,02	<0,01
Спонтанная агрегация эритроцитов (у. е.)	2,91 ± 0,37	2,91 ± 0,37	>0,5
Стимулированная агрегация эритроцитов (у. е.)	4,01 ± 0,39	4,01 ± 0,39	>0,5

ров [14, 16]. Другие исследователи после однократного гипоксического воздействия наряду с гиперкоагуляцией обнаружили выраженную стимуляцию фибринолитической системы [19]. Имеются данные, что при вдыхании собаками гипоксической смеси (10 % O_2 в азоте) в течение 5 минут стимулируется гемокоагуляция, снижается антикоагулянтная и фибринолитическая активность крови [22]. У людей нормоксически-гиперкапнические ингаляции сопровождались гиперкоагуляцией и разнонаправленными изменениями фибринолитической активности [26]. При этом некоторые исследования в подобных условиях выявили резкое снижение свертываемости крови [3]. Незначительное снижение гемокоагуляции и увеличение антитромбиновой активности без изменения величины индекса контактной активации было выявлено у собак при вдыхании гипоксически-гиперкапнической смеси [22].

Результаты клинических и экспериментальных исследований подтверждают наличие определенной однотипной последовательности изменений в системе гемостаза под действием значимого фактора в зависимости от силы и продолжительности воздействия [5, 22]. Гиперкоагуляция и гиперфибринолиз в значительной степени объясняются выходом тромбопластической субстанции и активаторов плазминогена из артерий и вен [19], взаимодействием адреналина и продуктов его окисления с фактором Хагемана [22], нарушением функций форменных элементов крови и метаболизма факторов свертывания под влиянием недостатка кислорода [14]. Гипокоагуляция может быть обусловлена увеличением активности антикоагулянтов, либо избыточным потреблением факторов свертывания [5].

При однократном воздействии гипоксической гиперкапнии нами выявлено увеличение в плазме крови активности фактора Виллебранда — одного из основных маркеров повреждения эндотелия сосудов [34, 39, 41, 42]. По мнению *Kirkeby et al*, кратковременная гипоксия способна вызвать активацию

свободнорадикального окисления, повреждение эндотелиоцитов и снижение продукции оксида азота [35]. В нашем исследовании гемореологические изменения при гипоксической гиперкапнии выражались в снижении вязкости крови и увеличении спонтанной агрегационной активности эритроцитов.

Снижение вязкости крови, оттекающей от головного мозга, при острой нормобарической гипоксии выявлено в эксперименте, что авторы объясняют усилением абсорбции тканевой жидкости [18]. Однако другие исследователи показали, что при гипоксии в связи с нарастанием площади капиллярной поверхности проницаемость воды через гематоэнцефалический барьер возрастает [31, 32]. В другой работе наряду с активацией свертывающей системы крови при срочной адаптация к гипоксии зарегистрирована полицитемическая реакция, что вызывало увеличение динамической вязкости крови [28].

Повышение агрегационной способности эритроцитов после однократного гипоксического воздействия может быть обусловлено активацией перекисного окисления липидов и изменением конформации компонентов клеточных мембран [40]. Экспериментально установлено, что эритроциты первыми реагируют на повышение активности свободнорадикального окисления и первыми исчерпывают свои компенсаторные возможности. С учетом стабильности вязкости плазмы на фоне сывороток разных степеней окисленности показано, что именно эритроциты ответственны за изменения реологических свойств крови на фоне интенсификации пероксидации, при этом α-токоферол увеличивает диапазон функциональной устойчивости эритроцитов [25].

При исследовании прооксидантно-антиоксидантной активности крови после однократного воздействия гипоксической гиперкапнии у животных экспериментальной группы зарегистрировано увеличении концентрации МА в плазме. Анализ литературы показал, что кратковременная гипоксия способствует активации свободнорадикального окисления [35, 36, 38]. Однако при повышенном $PaCO_2$ в крови на фоне гипоксемии может наблюдаться снижение интенсивности пероксидации вследствие ингибирования генерации активных форм кислорода в лейкоцитах и их фагоцитарной активности [17]. В исследовании Баева и соавт. впервые было установлено, что углекислота является эндогенным нефермментативным компонентом антиоксидантной защиты организма [4]. Полученные нами изменения подтверждают стрессорную значимость выбранного режима гипоксически-гиперкапнического воздействия и, вероятно, являются необходимым компонентом срочной адаптации.

Тренировки животных гипоксической гиперкапнией в нашем исследовании приводили к активации тромбоцитарного гемостаза, удлинению времени свертывания крови по внутреннему пути и ускорению фибринолиза. В литературе в основном встречаются работы, посвященные изучению гемостаза при долговременной адаптации к нормо- и гипобарической гипоксии. Так, у беременных женщин с эссенциальной тромбоцитопенией после цикла нормобарических гипоксических тренировок выявлено увеличение агрегационной активности тромбоцитов при их низком количестве [8]. В другой работе у крыс, адаптированных в условиях среднегорья, острая гипоксия не сопровождалась гиперагрегацией тромбоцитов, как это отмечалось у «низкогорных» животных, а приводила лишь к умеренному увеличению их агрегационной способности [2]. Угнетение внутреннего пути системы гемостаза и ускорение фибринолиза, вероятно, связано с повышением активности эндогенных антикоагулянтов при долговременной адаптации к гипоксической гиперкапнии. Однако при изучении гемостаза у горных и равнинных животных выявлен высокий прокоагулянтный потенциал свертывающей системы крови у горных сурков [1].

В нашей работе после цикла гипоксически-гиперкапнических тренировок у крыс отмечалось увеличение вязкости крови, гематокрита и снижение деформируемости эритроцитов по коэффициенту жесткости. Полученные гемореологические изменения могут быть обусловлены гипоксической стимуляцией эритропоэтической функции костного мозга, а также изменением эластических свойств эритроцитарных мембран [1]. В отдельных работах показано, что снижение дефомируемости красных клеток крови способствует снижению их агрегационной способности, вследствие уменьшения площади контакта клеточных поверхностей. Однако те же авторы отмечают, что повышение жесткости эритроцитов, как правило, связано с увеличением насыщенных жирных кислот, холестерина и уменьшением суммарного отрицательного заряда клеточной мембраны [20].

При исследовании прооксидантно-антиоксидантной активности крови у адаптированных к гипоксической гиперкапнии крыс нами было выявлено увеличение концентрации МА, что свидетельство-

вало о развитии прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса. Экспериментально установлено, что нормобарическая гипоксия (10 % O_2) в течение 3 и 21 суток также способствовала увеличению генерации H_2O_2 изолированными перитонеальными макрофагами [43]. В другой работе гипоксические тренировки крыс при внешнем и внутреннем облучении приводили к повышению активности антиоксидантной системы и снижению уровня перекисного окисления липидов в исследуемых органах [13]. Одним из механизмов увеличения антиоксидантного потенциала может быть увеличение продукции NO, способного ингибировать процессы свободнорадикального окисления и образование производных холестерина [33, 37].

Таким образом можно заключить, что система гемостаза и гемореология являются обязательным звеном в многокомпонентной ответной реакции организма при долговременной адаптации к гипоксической гиперкапнии. Полученные изменения, вероятно, в равной мере направлены на поддержание адекватной текучести крови и кислородного гомеостаза в условиях его дефицита.

ВЫВОДЫ

1. Однократное воздействие гипоксической гиперкапнии у крыс вызывает укорочение времени свертывания крови по внутреннему пути, увеличение в плазме крови активности фактора Виллебранда, снижение вязкости крови, повышение агрегационной способности эритроцитов и интенсификацию свободнорадикального окисления.
2. Гипоксически-гиперкапнические тренировки у крыс стимулируют агрегацию тромбоцитов и фибринолиз, способствуют удлинению времени свертывания крови по внутреннему пути, увеличению вязкости крови, гематокрита, снижению деформируемости эритроцитов и активации процессов пероксидации в крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Агаджанян Н. А., Елфимов А. И. Функции организма в условиях гипоксии и гиперкапнии. — М., 1986. — 272 с.*
2. *Алиев М. А., Бекболотова А. К. Система микроциркуляции и гемоциркуляции в экстремальных условиях. — Фрунзе, 1981. — С. 6–8.*
3. *Алтухова С. Н., Вытчикова М. А. Изменения в системе свертывания крови человека при воздействии комплекса условий геометрически замкнутого объема//Материалы II научной конференции молодых ученых: Сб. науч. трудов. — М., 1967. — С. 48–49.*
4. *Баев В. И., Львов С. Н., Шугалей И. В. и соавт. Физиологическая роль углекислоты в системе свободнорадикального окисления организма//Свободнорадикальные процессы: экологические, фармакологические и клинические аспекты: Сб. науч. трудов. — С-П., 1999. — С. 809.*
5. *Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Издание 2-е, дополненное. — М., 2001. — 296 с.*
6. *Благородов С. В., Шепелев А. П., Дмитриева Н. А. Метод определения антиокислительной активности и синтетические антиоксиданты в ряду производных оксазина и непредельных хлоркетонов//Биоантиоксидант: Тезисы 2-й Всесоюзной конференции. — Черниголовка, 1986. — С. 28–29.*
7. *Беспалов А. Г. Влияние гипоксической гиперкапнии на мозговую гемодинамику и толерантность головного мозга к ишемии: Дисс… к. м. н. — Новосибирск, 2003. — 114 с.*
8. *Брагинская С. Г., Кирия М. В. Профилактика кровотечения в родах и послеродовом периоде у больных с эссенциальной тромбоцитопенией методом интервальной гипоксической тренировки//Hypoxia Med. J. — 1996. — № 2. — С. 77–78.*
9. *Бреслав И. С., Глебовский В. Д. Регуляция дыхания. — Л., 1981. — 280 с.*
10. *Владимиров Ю. А., Арчаков Р. М. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972. — 252 с.*
11. *Глазачев О. С., Ткачук Е. Н., Орлова М. А. и соавт. Индивидуально-типологический анализ эффективности интервальной гипоксической тренировки школьников//Hypoxia Med. J. — 1996. — № 2. — С. 80–81.*
12. *Галактионова Л. П., Молчанов А. В., Ельчанинова С. А. и соавт. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки//Клиническая лабораторная диагностика. — 1998. — № 6. — С.10–14.*
13. *Горбань Е. Н., Топольникова Н. В., Иванова О. Н. Влияние гипоксической тренировки на глюкокортикоидную функцию надпочечников и уровень ПОЛ различных органов в условиях радиационно-индуцированного старения//Старение и долголетие: системные и междисциплинарные подходы: Сб. науч. трудов. — М., 1997. — С. 465.*
14. *Горшкова Т. Н., Заикина Л. И. Свертывание крови и гипоксия//Высокогорье и организм: Сб. науч. трудов. — Фрунзе, 1969. — С. 45–50.*
15. *Зверькова Е. Е. Изменение общей резистентности крыс под влиянием повторяющихся гипоксически-гиперкапнических воздействий//Физиологический журнал СССР. — 1980. — № 10. — С. 1575–1578.*

16. Зеленчук А. В. Влияние гипоксии разной продолжительности на процессы свертывания крови//Теоретические и клинические вопросы проблемы свертывания крови: Сб. науч. трудов. — Саратов, 1968. — С. 78–82.
17. Коган А. Х., Болевич С. М., Даниляк И. Г. Сравнительное исследование диоксида углерода на генерацию активных форм кислорода лейкоцитами в норме и при бронхиальной астме//Патологическая физиология и экспериментальная медицина. — 1995. — № 3. — С. 34–40.
18. Красильников В. Г., Артемьева А. И. Макро- и микроциркуляторные сдвиги в головном мозге при гипоксии и гиперкапнии//Физиологический журнал СССР им. М. И. Сеченова. — 1989. — № 10. — С. 1389–1396.
19. Кузник Б. И., Скипетров В. П. Форменные элементы крови, сосудистая стенка, гемостаз и тромбоз. — М., 1974. — 307 с.
20. Левтов В. А., Регирер С. А., Шадрина Н. Х. Реология крови. — М. 1982. — 272 с.
21. Миррахимов М. М., Гольдберг П. Н. Горная медицина. — Фрунзе, 1978. — 182 с.
22. Пак Г. Д. Влияние дыхательной гипоксии на свертывающую систему крови у собак//Вестн. АН КазССР. — 1979. — № 10. — С. 50–52.
23. Прокопов Г. В., Вигушина Э. И., Гречихина А. А. Влияние гипокапнии на морфологический состав и активную реакцию крови//Гипоксия и окислительные процессы: Сб. науч. трудов. — Куйбышев, 1976. — С. 124–129.
24. Ратманов В. И. К вопросу о влиянии адреналина на контактную фазу свертывания крови//Физиологический журнал СССР. — 1976. — № 5. — С. 699-702.
25. Ройтман Е. В., Дементьева И. И., Азизова О. А. и соавт. Изменение реологических свойств крови и осмотической резистентности эритроцитов при активации свободнорадикальных процессов//Клиническая лабораторная диагностика. — 2001. — № 3. — С. 42–43.
26. Рут Г. Кислотно-щелочное состояние и электролитный баланс. — М., 1978. — 118 с.
27. Селье Г. На уровне целого организма. — М., 1972. — 122 с.
28. Семенов Ю. В. О роли эритроцитарной системы в регуляции кислородного режима организма//Кислородный режим организма и его регулирование: Сб. науч. трудов. — Киев, 1966. — С. 142-149.
29. Усынин В. В., Лычев В. Г., Гранитов В. М. и соавт. Реологические свойства крови у больных клещевым сыпным тифом//Клиническая медицина. — 1998. — № 7. — С. 32–33.
30. Хачатурян Л. М. Изменение устойчивости к гипоксии у крыс в течение дневного периода суток//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1999. — № 3. — С. 256-260.
31. Bar T. H., Wolff J. R. Effect of different hemodynamic conditions on brain capillaries: alveolar hypoxia, hypovolemic hypertension and ouabain edema.//Adv. Neurosurg. Berlin. — 1975. — № 3. — P. 10–19.
32. Brightman M. W., Klatzo I., Olsson Y. et al. The blood brain barrier to proteins under normal and pathological conditions//J Neurol. Sci. — 1970. — № 10. — P. 215-239.
33. Edmunds N. J., Marshall J A role for adenosine A1 receptors in the regulation of hindlimb oxygen consumption during graded systemic hypoxia in the rat//J Physiol. Proc. — 2000. — № 525. — P. 15–16.
34. Kapiotis S., Jilma B., Szalay T. D. E. et al. Evidence against an effect of endothelin-1 on blood coagulation, fibrinolysis, and endothelial cell integrity in healthy men//Arteriosclerosis, Thrombosis and Vasc. Biol. — 1997. — № 11. — P. 2861–2867.
35. Kirkeby O J, Kutzsche S., Risoe C. et al. Cerebral nitric oxide concentration and microcirculation during hypercapnia, hypoxia, and high intracranial pressure in pigs//J. din. Neurosci. — 2000. — № 6. — P. 531-538.
36. Koudelova J., Rauchova H., Drahota Z. et al. Hypoxia-induced lipid peroxidation in rat brain and protective effect of different carnitine derivates: Abstr. Czech and Slov.//Physiol. Soc. Physiol. Res. — 1998. — Vol. 47, № 3. — P. 21.
37. Kurowska E. M., Carroll K. K. Nitric oxide-generating compounds reduce hypercholesterolemic responses in HEPG2 cells and in rabbits//FASEB Journal. — 1997. — Vol. 11, № 3. — P. 168.
38. Maulik D., Numagami Y., Ohnishi S. T. et al. Direct measurement of oxygen free radicals dunng in utero hypoxia in the fetal guinea pig brain//Brain Res. — 1998. — Vol. 798, № 1–2. — P. 166-172.
39. Parrot F., Labrouche S., Javorschi S. et al. Mild hyperhomocysteinemia and haemostasis in cardiovascular diseases//Abstr. SSIEM 33rd Annu. Symp. — 1996. — P. 27.
40. Salia N., Momtselidze N., Kurtskhalia E. et al. Influence of lipid peroxidation on red blood cell aggregation//Biorheology. — 1999. — Vol. 36, № 1–2. — P. 169.
41. Spencer C. G. C., Gumey D., Blann A. D. et al. Abnormal platelet and endothelial function in hypertensives with target organ damage: Abstr. Spring Meeting of the Medical Research Society//Clin. Sci. — 2000. — Vol. 99, № 2. — P. 13.
42. Tremoli E., Baldassarre D., Cofrancesco E. et al. Relationship between haemostatic variables and the progression of carotid atherosclerosis//Abstr. 3rd Int. Fibrinogen Symp. «Hemostasis, Inflamm. and Cardiovasc. Disease». — 1996. — P. 57.
43. Wilhelm J., Frydrychova M., Hezinova A. et al. Production of hydrogen peroxide by peritoneal macrophages from rats exposed to subacute and chronic hypoxia//Physiol. Res. — 1997. — № 1. — P. 35–39.

аренда сервера
от $95/мес.

установка сервера
$25/мес. за1U

подключение к сети
$65/мес.

цена за 1Гб от $25

*все налоги включены

ZENON N.S.P.
www.zenon.net

Размещение серверов в Центре хранения и обработки данных:

- опорная сеть 1 Гбит/с
- бесперебойное электропитание с двойным резервированием и ДГУ
- система климатического контроля
- круглосуточный мониторинг оборудования
- круглосуточная техническая поддержка
- балансировка нагрузки, фильтры и другие дополнительные услуги

тел:(495) 232-3797
www.host.ru
e-mail: access@zenon.net

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОБОБЩЁННОГО ЗАКОНА ШУЛЬМАНА ДЛЯ ОПИСАНИЯ КРИВОЙ ТЕЧЕНИЯ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

З. П. Шульман[1], Т. В. Коротаева[2], Н. В. Климова[3], Н. Н. Фирсов[3]

Институт тепло- и массообмена НАН, Беларусь[1]; ГУ Институт ревматологии РАМН[2];
ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет[3], Россия

POSSIBILITY OF GENERALIZED SHULMAN'S LAW APPLICATION FOR DESCRIPTION OF SINOVIAL LIQUID FLOW CURVE

Z. P. Shulman[1], T. V. Korotaeva[2], N. V. Klimova[3], N. N. Firsov[3]

Institute of heat and mass exchange NAS, Byelorussia[1];
Institute of Rheumatology RAMS[2]; Russian State Medical University[3], Russia

ВВЕДЕНИЕ

Активный интерес к изучению реологических свойств синовиальной жидкости проявился с 50-х годов XX столетия. Уже в работах *Ogston, Stanier* [1] и *Sundblad* [2] обсуждались неньютоновские свойства синовии. Экспериментальное исследование вязкоупругих свойств синовиальной жидкости, проводимое на реогониометре Вайсенберга [3], зарегистрировало эффекты возникновения нормальных сил, и были получены кривые их зависимости от скорости сдвига. Итоги исследований в этой области были обсуждены в 1967 г. [4]. Попытки выявить функцию, описывающую характерную для суставов кривую течения синовиальной жидкости во всём диапазоне скоростей сдвига (от 10^{-2} до 10^5 $с^{-1}$), были неудачны [5, 6]. Отсутствие такого реологического закона не позволяет сравнивать результаты вискозиметрии синовиальной жидкости, полученной при различной степени выраженности воспалительного процесса в суставе и при различных заболеваниях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

У 7 больных псориатическим артритом (ПсА) и 7 больных реактивным артритом (РеА) в возрасте 25–40 лет получали синовиальную жидкость в количестве 8 мл пункцией коленного сустава. Одновременно пункцией кубитальной вены отбирали кровь в количестве 10 мл и стабилизировали ее 0,3 мл 7 % раствора трилона Б. Вискозиметрию проводили на вискозиметре со свободно плавающим стаканом в области скоростей сдвига от 0,5 до 100 $с^{-1}$ [7]. Калибровку вискозиметра производили растворами глицерина в воде с известной вязкостью. Вязкость плазмы и сыворотки измеряли на капиллярном вискозиметре. Агрегометрию крови осуществляли методом регистрации обратного светорассеяния на эритроагрегометре [8] с определением основных показателей: T_1, T_2, β, $I_{2,5}$, Ampl. Кривая течения крови была представлена в кессоновских координатах $\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{K\dot{\gamma}}$. Стандартная синовиоцитограмма состояла из подсчёта общего числа клеток (цитоз — количество клеток×10^9 в 1 мл) и рагоцитов, определения относительного числа гранулоцитов, лимфоцитов, моноцитов, синовиоцитов, общего белка (г/л), С-реактивного белка (г/л), глюкозы (г/л).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Степень тяжести гемореологических расстройств в группе больных ПсА составляла в среднем 2,5, а в группе РеА — 1,75, что согласуется с ранее опубликованными данными [9]. В группе ПсА общая гидродинамическая прочность эритроцитарных агрегатов β и предел текучести крови τ_0 были в 1,5 раза больше, чем в группе РеА (**табл. 1**). Цитологический состав синовиальной жидкости отличался лишь наличием единичных эритроцитов при ПсА и увеличением на 80 % числа гранулоцитов при РеА (**табл. 2**). Кривые течения синовиальной жидкости $\eta = \eta(\dot{\gamma})$ оказались существенно нелинейны, а применение реологического закона в форме $\eta_a = \eta_\infty + A\dot{\gamma}^{-2/3}$, предложенной Caygill [6], не привело к спрямлению кривых течения в координатах $\eta_a \div \dot{\gamma}^{-2/3}$ (**рис. 1 а, б**). Несостоятельность этой формы не позволяла определить константы, необходимые для сравнительного анализа.

Таблица 1

Средние значения реологических показателей (m ± σ)

	ПсА (*n* = 7)		РеА (*n* = 7)	
	m	σ	m	σ
T_1	4,58	2,003	4,16	0,704
T_2	41,29	8,794	44,36	4,319
β	46,75	17,16	40,6	10,056
Ampl	83,14	9,317	97,43	19,99
$I_{2,5}$	– 3	2,887	– 2,43	2,299

Таблица 2

Средние значения показателей синовиоцитограммы (m ± σ)

	РеА (*n* = 7)		ПсА (*n* = 7)	
	m	σ	m	σ
Цитоз	30,78571	24,98476	25,57143	27,35633
Рагоциты	3,571429	5,318432	0,285714	0,755929
Гранулоциты	65,71429	24,41799	36,14286	42,02154
Лимфоциты	27,57143	19,20813	38,42857	37,01737
Моноциты	8,285714	10,22602	5,571429	5,912054
Синовиоциты	0,142857	0,377964	0,714286	0,95119
Общий белок	46,62857	3,628459	49,31429	29,66364
Глюкоза	3,514286	1,595231	1,271429	2,186866
СРБ	59,27143	53,29727	73,41429	48,82316

Таблица 3

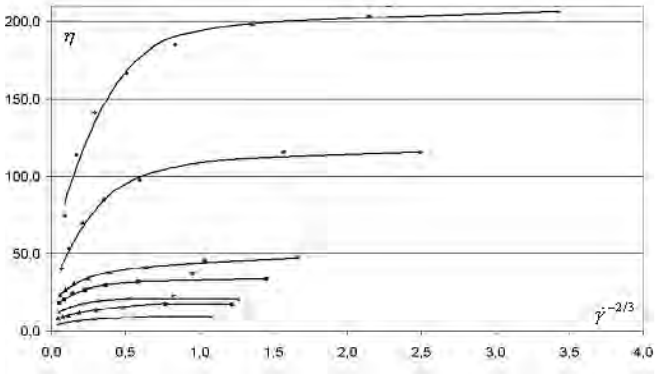
Вязкостные характеристики синовиальной жидкости

	РеА (*n* = 7)		ПсА (*n* = 7)	
	m	σ	m	σ
K	0,002956	0,000911	0,003511	0,001403
τ_0	0,005773	0,002102	0,009061	0,005372

Примечание: A — константа (у. е.); B — константа Шульмана (у. е.); Ampl — амплитуда агрегации (у. е.); $I_{2,5}$– прочность самых крупных агрегатов в процентах к амплитуде агрегации; K — кессоновская вязкость (мПа·с); m — выборочное среднее значение; N — объём выборки; n — показатель степени; p — вероятность ошибки первого рода; r — коэффициент корреляции; T_1– характерное время образования линейных агрегатов (сек.); T_2– характерное время образования трёхмерных агрегатов (сек.); β — общая гидродинамическая прочность агрегатов ($с^{-1}$); $\dot{\gamma}$ — скорость сдвига ($с^{-1}$); η_a — кажущаяся вязкость (мПа·с); η_∞ — вязкость (мПа·с); σ — выборочное стандартное отклонение; τ — напряжение сдвига ($Н/м^2$); τ_0– предельное напряжение сдвига, $Н/м^2$.

Индексы: 0– фиксированное значение величины; ∞ — асимптотическое значение при $\dot{\gamma}$ — >∞.

а



б

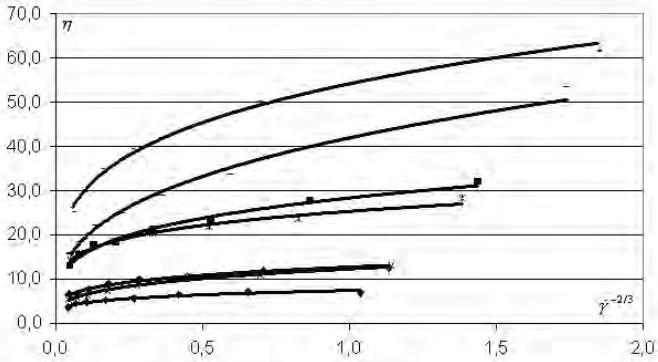
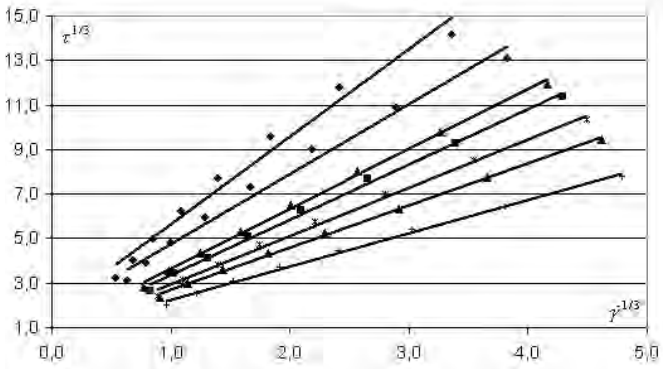


Рис. 1. Кривые течения патологической синовии, предложенные Caygill [6]: **а** — псориатический артрит, **б** — реактивный артрит.

а



б

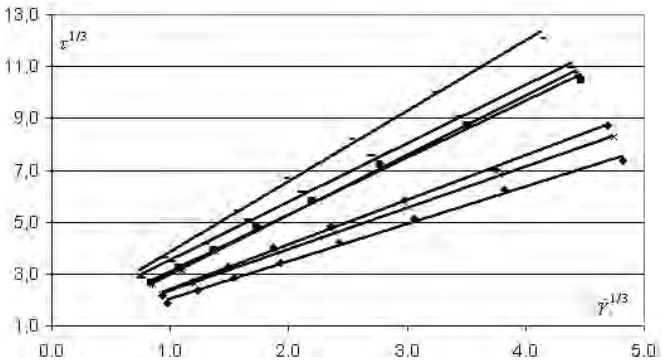


Рис. 2. Кривые течения патологической синовии в координатах Шульмана: **а** — псориатический артрит, **б** — реактивный артрит.

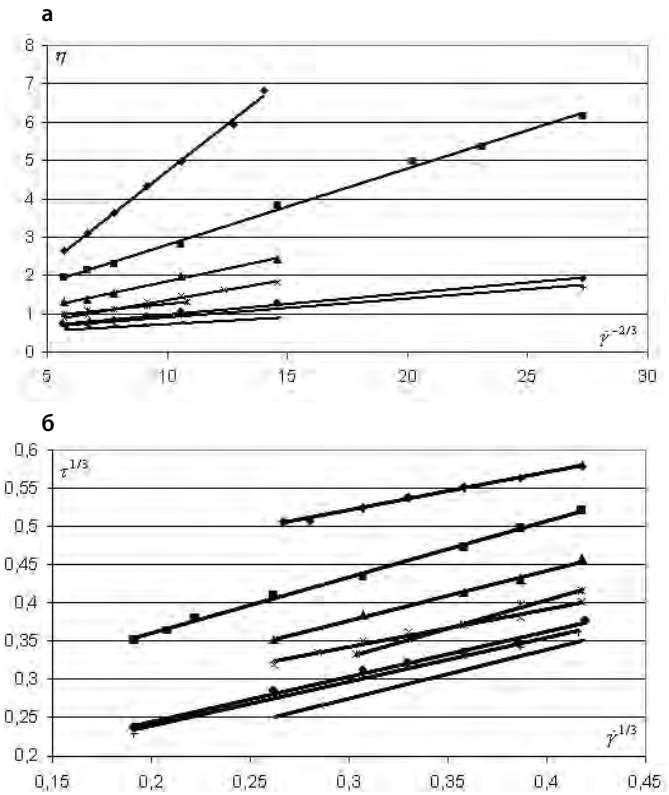


Рис. 3. Кривые течения нормальной синовии по данным Caygill [6]: **а** — координаты, предложенные Caygill; **б** — координаты Шульмана.

Исследование возможности применения обобщённого закона Шульмана [10] $\tau_n = \tau_0^n + (B\dot{\gamma})^n$ показало, что при n=1/3 кривые течения удовлетворительно спрямляются (**рис. 2 а, б**).

Таким образом можно оценить как степень обратимой структурируемости образца синовиальной жидкости (τ_0), так и асимптотическую вязкость (K). Мы воспользовались данными Caygill [6] и построили кривые течения для 4 нормальных синовий и 4 синовий при ревматоидном артрите (показаны вместе). На **рисунке 3** показано, что уравнение Шульмана распространяется на реологические свойства нормальной синовии и синовии при ревматоидном артрите и в области низких скоростей сдвига. Средние значения и среднеквадратические отклонения этих величин значимо по группам не различались в связи с большим разбросом свойств внутри каждой группы.

Анализ корреляционных связей между τ_0, K синовиальной жидкости и показателями синовиоцитограммы установил их значимость между K и количеством рагоцитов (*r = 0,82; p = 0,024*) в группе ПсА и между τ_0 и количеством синовиоцитов (*r = – 0,79; p = 0,032*) в группе РеА. Полученные количественные характеристики синовиальной жидкости позволяют оценить степень участия общих нарушений микроциркуляции, выраженных в гемореологической патологии, в формировании внутрисуставного процесса при артритах.

Существенная корреляционная связь при РеА была обнаружена только между T_1 и количеством синовиоцитов (*r = – 0,8; p = 0,04*), а при ПсА — только между τ_0 и количеством моноцитов (*r = 0,74; p = 005*). Корреляционная связь между пределом текучести τ_0, асимптотической вязкостью (K) синвиальной жидкости и показателями гемореологии обнаружилась лишь в группе РеА между Ampl и K (*r = 0,8; p = 0,03*).

ВЫВОДЫ

1. Кривая течения синовиальной жидкости удовлетворительно соответствует реологическому закону Шульмана $\tau_n = \tau_0^n + (k\dot{\gamma})^n$ при n=1/3, что позволяет количественно оценить ее вязкие свойства как в норме, так и в патологии.
2. Корреляционный анализ связей между показателями, характеризующими реологические свойства крови, и параметрами синовиальной жидкости показал слабое влияние системных нарушений микроциркуляции на степень патологических изменений синовиальной жидкости при псориатическом и реактивном артритах.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ogston A. G., Stainer J. F. The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid: viscous, elastic and lubricant properties//J Physiol. — 1953. — Vol. 119. — P. 224-252.*
2. *Sundbland L Studies on hyaluronic acid in synovial fluid//Acta Societatis Medicorum Upsaliensis. — 1953. — Vol. 58. — P. 113-119.*
3. *Davies D. V. Synovial fluid as a lubricant//Federation proceedings. Lubrication and biomechanics. — 1966. — Vol. 25. — P. 1069–1076.*
4. *Davies D. V. Properties of synovial fluid//Proceedings of Institute of Mechanical Engineers. — 1967. — Vol. 81, part 3J. — P. 25–29.*
5. *Берёзкин А. Г., Клыков В. И. Экспериментальное изучение течения синовии через капилляр при различных скоростях сдвига//Биомеханика кровообращения, дыхания и биологических тканей. — Рига, 1981. — С. 78–81.*
6. *Caygill J. C., West G. H. The rheological behavior of synovi-*

al fluid and its possible relation to joint lubrication//Medical and biological engineering. — 1969. — Vol. 7, № 5. — P. 507-516.

7. *Zakharchenko V. N., Larionov S. M. A method for measurement of biological fluids using a viscometer with a free floating cylinder//Biorheology. — 1973. — Vol. 10. — P. 267-270.*
8. *Firsov N. N., Bjelle A., Korotaeva T. V. et al. Clinical application of the measurement of spontaneous erythrocyte aggregation and disaggregation. A Pilot Study//Clinical Hemorheology and Microcirculation. — 1998. — Vol. 18, № 2–3. — P. 87–97.*
9. *Коротаева Т. В., Фирсов Н. Н., Вышлова М. А. Гиперагрегационный синдром как фактор риска возникновения остеолиза у больных псориатическим артритом//Российская ревматология. — 1999. — № 4. — С. 29–33.*
10. *Смольский Б. М., Шульман З. П., Гориславец В. М. Реодинамика и теплообмен нелинейно вязкопластических материалов. — Минск, 1970.*

КИНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ ЛИЗИСА ФИБРИНА ПЛАЗМИНОМ

*А. В. Богданова, И. С. Голомысов**

Лаборатория физической биохимии системы крови, Гематологический Научный Центр РАМН, Москва,
**Институт Экспериментальной Кардиологии, Российский Кардиологический Исследовательский центр, Москва*

A KINETIC STUDY OF PLASMIN-CATALYSED LYSIS OF FIBRIN

*A. V. Bogdanova, I. S. Golomisov**

Laboratory of physical biochemistry of blood system, National Research Center for Hematology RASM, Moscow,
**Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research Center, Moscow*

A model of fibrin degradation by plasmin was developed and an experiment on kinetics of firin clot lysis was done. The model predicted a strong limiting effect of kinetics of plasmin binding to fibrin on the overall kinetics of lysis. Comparing the model with the experiments either performed in this work or reported by others we estimated a kinetic constant of plasmin binding to fibrin as 0.05–1.0 $\mu M^{-1}min^{-1}$. The results of this work could be useful for more accurate understanding of the regulation mechanisms of fibrinolysis as well as for more corrected mathematical description of this process.

Key words: *kinetics — fibrin — plasmin — mathematical model — experiment.*

ВВЕДЕНИЕ

Расщепление фибрина плазмином — ключевая реакция фибринолиза, физиологической ролью которого является растворение фибриновых сгустков крови, образующихся в результате работы системы свертывания. Сгустки представляют собой скопление клеток крови, переплетенное сетью полимеризованного белка фибрина. Фибриновая часть сгустка формируется следующим образом. Сериновая протеаза тромбин активирует белок фибриноген, отщепляя от него отрицательно заряженные фибринопептиды А и В и образуя при этом активный мономер фибрина размерами 45нм × 2нм. Такие мономеры быстро полимеризуются между собой в длинные двухцепочечные нити (протофибриллы) [10], радиусом 3–5 нм [5]. Образовавшиеся протофибриллы впоследствии собираются в более крупные структуры — фибриллы, которые и составляют сеть сгустка [10]. Параметры сгустка зависят от условий полимеризации: концентраций тромбина и фибриногена, ионной силы раствора [5]. Образовавшиеся фибриллы имеют относительно постоянный диаметр по всему объему сгустка и могут ветвиться [3]. При физиологических условиях диаметр фибрилл может составлять 50–100 нм [3]. Суть фибринолиза заключается в расщеплении фибриновых волокон. Такое расщепление способен делать плазмин, являющийся сериновой протеазой и циркулирующий в крови в виде своего неактивного предшественника плазминогена. Превращение плазминогена в плазмин происходит под действием специфических активаторов [4]. Активный центр плазмина содержит аминокислотные

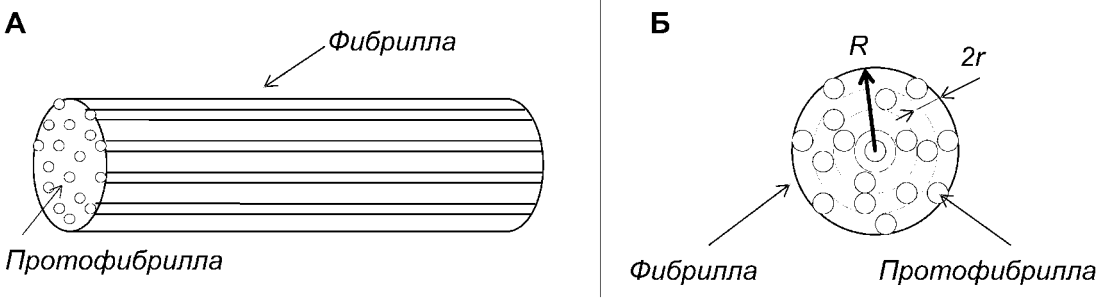


Рис. 1. Геометрия фибринового сгустка. (**А**) Каждая фибрилла состоит из протофибрилл, оси которых параллельны оси фибриллы. (**Б**) Равномерное по плотности кольцевое расположение протофибрилл в поперечном сечении фибриллы.

остатки, типичные для сериновых протеаз (His 602, Asp 645, Ser 740), в то время как лизин-связывающие участки, входящие в состав пяти кринг-доменов плазмина обеспечивают взаимодействие фермента с фибрином, фибриногеном и α_2-антиплазмином [4]. На каждом мономере фибрина находятся два сайта связывания плазмина [11], хотя в процессе деградации появляются дополнительные центры связывания на С-концевых остатках лизина расщепленных цепей фибрина [6, 13]. При физиологических условиях формирования сгустка плазмину доступна только внешняя поверхность фибринового волокна [7]. В результате лизиса от фибрина отщепляются продукты деградации разных размеров и массы [14].

В существующей литературе нет полного представления о механизмах регуляции реакции лизиса фибрина плазмином, известные кинетические константы этой реакции имеют довольно большой разброс в значениях. Поэтому целью данной работы было изучение особенностей этой реакции с помощью разработки и исследования ее математической модели, опираясь на экспериментальные данные, как полученные нами, так и известные в литературе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Математическая модель.

Для моделирования лизиса фибрина плазмином принималась некоторая идеализация фибринового волокна. Фибрилла рассматривалась в виде цилиндра радиуса R. Каждая фибрилла состояла из протофибрилл, которые представлялись в виде цилиндров радиуса r, оси которых параллельны оси фибриллы (**рис. 1А**). В поперечном сечении фибриллы предполагалось равномерное по плотности кольцевое расположение протофибрилл (**рис. 1Б**). Плазмину был доступен только внешний слой протофибрилл. На каждый мономер фибрина для плазмина приходилось два сайта связывания. По мере лизиса от фибрина отщеплялись продукты деградации, радиус фибриллы уменьшался и для плазмина оказывались доступными следующие слои протофибрилл.

Схема реакции расщепления фибрина плазмином имела следующий вид:

$$\theta + Pn^{fb} \underset{k_r}{\overset{k_f}{\leftrightarrow}} Pn^{f} \xrightarrow{k_1} 0.5FDP + Pn \qquad (1)$$

где θ — свободные сайты связывания плазмина на поверхности фибрина;

Pn^f — свободный плазмин;

Pn^b — плазмин, связанный с фибрином;

FDP — продукты деградации фибрина;

k_f и k_r — кинетические константы ассоциации и диссоциации плазмина с фибрином соответственно (**Таблица 1**);

k_1 — каталитическая константа расщепления фибрина плазмином (**Таблица 1**).

Кинетика гомогенного лизиса фибрина описывалась системой дифференциальных уравнений, написанных в соответствии с приведенной выше схемой на основании закона действующих масс и с учетом изменения количества сайтов связывания на поверхности фибриллы при изменении её радиуса:

$$\begin{cases} \dfrac{d[Pn^f]}{dt} = -k_f[Pn^{fb}][\theta] + k_r[Pn^b] + k_1[Pn^b] \\ \dfrac{d[Pn^b]}{dt} = k_f[Pn^{fb}][\theta] - k_r[Pn^b] - k_1[Pn^b] \\ \dfrac{d[FDP]}{dt} = 0.5k_1[Pn^b] \\ \dfrac{d[\theta]}{dt} = -k_f[Pn^{fb}][\theta] + k_r[Pn^b] + \dfrac{R_0\sqrt{1-\dfrac{[FDP]}{[Fn_0]}} - 3r}{R_0\sqrt{1-\dfrac{[FDP]}{[Fn_0]}} - r} k_1[Pn^b] \end{cases} \qquad (2)$$

Таблица 1

Литературные значения констант реакции расщепления фибрина плазмином

Константа	Значение	Ссылка
k_1	2,72 мин$^{-1}$ а	[1]
	300 мин$^{-1}$ б	[8]
k_f	0,006 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$	[5]
	0,03 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$	[2]
K_d	0,5 мкМ	[11]

Примечание: а — рассчитано из значения наблюдаемой k_1=1,36 мин$^{-1}$ для гидролиза плазмином фибрина [1] и учетом того, что на один мономер фибрина для плазмина приходится два сайта связывания [11]; б — рассчитано из k_1=1500 мин$^{-1}$ для гидролиза плазмином специфических хромогенных субстратов [8] и с учетом того, что для растворения одной молекулы фибрин-мономера плазмин должен расщепить около 10 пептидных связей [5].

где [*i*] обозначает объёмную концентрацию i-й переменной.

Все переменные модели были отнесены к полному объёму сгустка, тем самым модель была упрощена до случая гомогенного распределения всех компонент. Такое упрощение для переменных Pn^f и *FDP* оправдано, если учесть, что объём, занимаемый фибриллами в сгустке, составляет <1 % от полного объёма всего сгустка при физиологической концентрации фибриногена (8,8 мкМ) [5]. Для переменных Pn^b и θ упрощение также возможно, вследствие достаточно быстрой диффузии плазмина в поре [5].

Последний член в правой части уравнения для изменения θ со временем описывал изменение концентрации сайтов связывания за счет изменения радиуса фибриллы в процессе лизиса. Он равен

$$\gamma \cdot k_1 \cdot [Pn^b],$$

где γ — отношение количества протофибрилл в соседних слоях:

$$\gamma = \frac{N_{R-2r}}{N_R} = \frac{S_{R-2r}}{S_R} = \frac{R-3r}{R-r};$$

S_R, S_{R-2r} — площади слоев с внешними радиусами *R* и *R–2r* соответственно и толщиной *2r*.

Радиус фибриллы *R* в момент времени *t* выражался через *[FDP]* в момент времени *t* и начальные R_0 и $[Fn_0]$:

$$R = R_0\sqrt{1-\frac{[FDP]}{[Fn_0]}}.$$

Начальные условия для данной системы дифференциальных уравнений имели следующий вид:

$$\begin{cases} [Pn^f]_{|t=0} = [Pn_0] \\ [Pn^b]_{|t=0} = 0 \\ [FDP]_{|t=0} = 0 \\ [\theta]_{|t=0} = [\theta_0] = \dfrac{8(R_0 - r)r[Fn_0]}{R_0^2} \end{cases} \quad (3)$$

где R_0 — начальный радиус фибриллы, *r* — начальный радиус протофибриллы, $[Fn_0]$ — объемная начальная концентрация фибрина, $[Pn_0]$ — объемная начальная концентрация плазмина.

Выражение для $[\theta_0]$ было получено из тех соображений, что отношение количества мест связывания, содержащихся во внешнем слое фибриллы к их полному количеству внутри фибриллы равно отношению площадей поперечного сечения внешнего слоя и всей фибриллы соответственно:

$$\frac{[\theta_0]}{2[Fn_0]} = \frac{N_{R_0}}{N_0} = \frac{S_{R_0}}{S_0} = \frac{4r(R_0 - r)}{R_0^2},$$

где N_{R_0}, S_{R_0} — количество протофибрилл в слое с внешним радиусом R_0 и толщиной *2r* и площадь такого слоя соответственно; N_0, S_0 — количество протофибрилл в поперечном сечении фибриллы радиуса R_0 и площадь такого поперечного сечения соответственно.

Система дифференциальных уравнений (2) с начальными условиями (3) решалась численно с помощью стандартной функции ODE15S математического пакета MATLAB 7.0.

Экспериментальная часть.

Материалы. Человеческий плазмин, куриный авидин и стрептавидин пероксидаза были любезно предоставлены С. П. Домогатским (Институт экспериментальной кардиологии, РКНПК Министерства здравоохранения РФ). Фибриноген и тромбин человека были приобретены в Sigma (США). Трис-HCl был приобретен в Serva (Германия). Твин-20 был приобретен в Ferrak (Германия). Все прочие реактивы имели степень чистоты ХЧ либо ОСЧ.

Растворы. В работе были использованы следующие растворы: фосфатный солевой буферный раствор (ФСБ-7,4): NaCl–150 мМ, Na_2PO_4*$12H_2O$–10мМ, pH 7,4; фосфатный солевой буферный раствор (ФСБ-8,2): NaCl–150 мМ, Na_2PO_4*$12H_2O$–10мМ, pH

8,2; фосфатный солевой буферный раствор с твином (ФСБТ): NaCl–150 мМ, Na_2PO_4*12H_2O–10мМ, твин-20–0,05 %(V/V) pH 7,4; карбонатный буферный раствор (КБР-9,6): Na_2CO_3 –10 мМ, pH 9,6; субстратный буферный раствор (СБ): ОФД–0,01 %(V/V), H_2O_2–0,01 %(V/V), цитрат-Na–40 мМ, pH 4,7.

Получение биотин-меченого фибриногена. К 1 мл раствора фибриногена (6 мг/мл) в ФСБ-8,2 добавляли 60 мкг N-гидроксисукцинимидного эфира биотина и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. Для удаления непрореагировавшего эфира проводили диализ препарата против 10-кратного объема ФСБ-7,4 при комнатной температуре с 3-кратной заменой ФСБ-7,4 через каждые два часа.

Приготовление биотин-меченого фибринового сгустка. К 1 мл фибриногена в ФСБ-7,4 (3 мг/мл) добавляли 20 мкл меченого биотином фибриногена (3 мг/мл) и 20 мкл тромбина (2 мг/мл). Полученную смесь разливали по 60 мкл в цилиндрические пластиковые лунки диаметром 7 мм. Высота слоя раствора составляла 1,5 мм. Смесь полимеризовалась при 37°С в течение 1 часа.

Авидин-биотиновый метод для определения концентрации продуктов деградации фибрина. В лунки пластикового планшета добавляли 100 мкл авидина (0,01 мг/мл) в КБР-9,6 и инкубировали при 37°С в течение 2 часов. Лунки четырежды промывали раствором ФСБТ (150 мкл), добавляли 150 мкл ФСБТ и инкубировали в течение 1 часа при 37°С, чтобы заблокировать неспецифическое связывание. В каждую лунку добавляли 100 мкл раствора биотин-меченых продуктов деградации фибрина в ФСБТ. Планшет инкубировали 30 мин при 37°С, четырежды промывали ФСБТ, добавляли по 100 мкл стрептавидина конъюгированного с пероксидазой хрена (0,04 мг/мл) в ФСБТ, и инкубировали 30 мин при 37°С. Лунки пятикратно промывали ФСБТ и добавляли по 100 мкл СБ. Через несколько минут, после того, как в лунке с максимальной концентрацией появлялась яркая окраска, пероксидазную реакцию останавливали добавлением по 50 мкл 10 %-ой серной кислоты и измеряли оптическую плотность раствора на длине волны 495 нм.

Лизис биотин-меченого фибринового сгустка и определение концентрации продуктов разрушения фибрина, меченных биотином (Прф-Б). В лунки, где был сформирован биотин-меченый фибриновый сгусток, добавлялось по 60 мкл раствора плазмина с концентрацией 0,6 мкМ. При этом высота слоя раствора плазмина составляла 1,5 мм. Систему инкубировали при 37°С при помешивании на шейкер-инкубаторе. Через фиксированные промежутки времени отбирали 50 мкл раствора и измеряли количество продуктов деградации фибрина описанным выше методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Сравнение результатов модели с результатами проведенного эксперимента. Результаты проведенного нами эксперимента по кинетике лизиса фибринового сгустка плазмином представлены на **рис.2**. Концентрация продуктов деградации фибрина регистрировалась авидин-биотиновым методом. На этом же графике изображено решение гомогенной модели (2) с начальными условиями (3), приближенными к условиям проведения эксперимента, и литературными значениями констант реакции, представленными в **таблице 1** (кривая 1). В качестве начальных условий брались значения $[Fn_0]$=10 мкМ, $[Pn_0]$=0,3 мкМ (концентрация плазмина, пересчитанная на начальный объем фибринового сгустка), r=4 нм (при физиологических условиях) [5], R_0=40 нм (при физиологических условиях) [3]. При данных начальных условиях и предположенных константах реакции решение модели не соответствует экспериментальным результатам. Было предположено, что такое сильное несоответствие вызвано либо неверным значением начального радиуса фибриллы, используемым в модели, от которого зависит начальное количество доступных для плазмина сайтов связывания, либо неверными значениями кинетических констант реакции. Для проверки первого предположения, модель (2) была переписана для случая, когда все сайты связывания в объеме фибриллы доступны плазмину (в модели (2) было убрано слагаемое, характеризующее изменение концентрации сайтов связывания при изменении радиуса фибриллы). Решение такой модели при доступности всех мест связывания изображено кривой 2. Очевидно, что модель по-прежнему довольно сильно отличается от эксперимента. Далее было исследовано влияние констант реакции на кинетику лизиса фибрина. Изменение константы k_1 на два порядка до значения 300 мин$^{-1}$ не дало практически никаких изменений в решении моде-

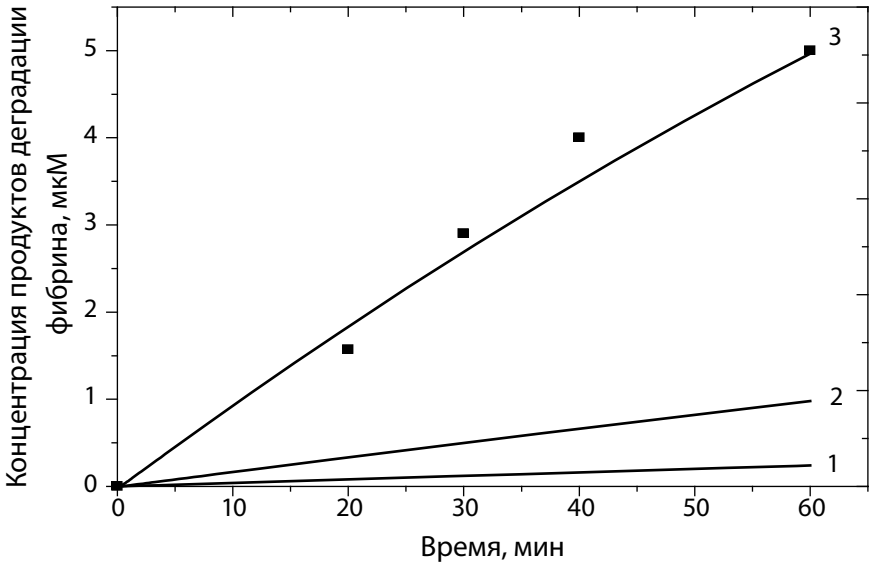


Рис. 2. Кинетика лизиса биотин-меченого фибринового сгустка плазмином. Символами изображены результаты эксперимента (концентрация фибрина в сгустке — 10 мкМ, концентрация плазмина в верхнем слое — 0,6 мкМ). Кривая 1 представляет результат решения модели (2) с начальными условиями: $[Fn_0]$=10 мкМ, $[Pn_0]$=0,3 мкМ, r=4 нм, R_0=40 нм и значениями констант k_l=2,72 мин$^{-1}$, k_f=0,006 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$, k_r=0,003 мин$^{-1}$. Кривая 2– результат решения модели (2) без учета последнего члена в правой части уравнения для изменения θ (модель для случая, когда плазмину доступны все сайты связывания в объеме фибриллы) с начальными условиями: $[Pn_0]$=0,3 мкМ, θ_0=20 мкМ и значениями констант k_l=2,72 мин$^{-1}$, k_f=0,006 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$, k_r=0,003 мин$^{-1}$. Кривая 3– результат решения модели (2) с начальными условиями: $[Fn_0]$=10 мкМ, $[Pn_0]$=0,3 мкМ, r=4 нм, R_0=40 нм и значениями констант k_l=2,72 мин$^{-1}$, k_f=0,085 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$, k_r=0,0425 мин$^{-1}$.

ли (данные не показаны). Изменение же константы k_f (и, соответственно, k_r, т.к. они связаны через равновесную константу диссоциации K_d=0,5 мкМ [11]) на один порядок до значения 0,085 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$ позволило модели хорошо описать результаты эксперимента (кривая 3). Таким образом, по-видимому, именно скорость связывания плазмина с фибрином (характеризующаяся константой k_f) определяет скорость всей реакции расщепления фибрина.

Сравнение результатов модели с результатами эксперимента, описанного в статье Житковой и соавт. [1].

Данная модель также была применена для описания эксперимента по кинетике лизиса фибрина плазмином из статьи [1]. В том эксперименте формировались ^{125}I-меченые фибриновые сгустки объемами 0.1, 025 и 0.35 мкл одинаковой концентрации (8,8 мкМ) и погружались каждый в 2 мл раствора плазмина с концентрацией 5–60 нМ. В процессе инкубации при постоянном перемешивании на качалке при 37°С отбирали аликвоты раствора, окружающего сгусток и измеряли радиоактивность растворимых продуктов деградации фибрина. Результаты одного из экспериментов, проведенных таким образом, изображены на **Рис.3**. Концентрации фибрина пересчитаны на полный объем раствора плазмина, содержащий сгусток. Для описания этого эксперимента также была применена модель (2) с начальными условиями, соответствующими условиям проведения эксперимента. Результаты анализа и сравнения модели с экспериментом дали аналогичный вывод о лимитирующем действии скорости связывания плазмина с фибрином на скорость расщепления фибрина. Для того, чтобы описать эксперимент, значения k_f и k_r потребовалось изменить до значений 1,2 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$ и 0,6 мин$^{-1}$ соответственно (**Рис.3**, кривые 1–3).

Влияние начального радиуса фибриллы и констант реакции на решение модели.

Для более полного представления о влиянии начального радиуса фибриллы и констант реакции на решение модели приведена **Таблица 2**. Таблица заполнена значениями параметров и констант, которые давали бы совпадение результатов решения модели с экспериментальными данными. Начальный радиус фибриллы R_0, соответствующая ему на-

Таблица 2

Значения варьируемых в модели констант k_f^a

Наш эксперимент ($[Fn_0]$=10 мкМ; $[Pn_0]$=0.3 мкМ)				**Эксперимент из статьи [1] ($[Fn_0]$=1.54 мкМ; $[Pn_0]$=0.03 мкМ)**			
R_0, нм	θ_0, мкМ	Варьируемая константа k_f [мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$] и соответствующая ей k_r [мин$^{-1}$] [б]		R_0, нм	θ_0, мкМ	Варьируемая константа k_f [мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$] и соответствующая ей k_r [мин$^{-1}$] [б]	
		Для k_1=2,72 мин$^{-1}$	Для k_1=300 мин$^{-1}$			Для k_1=2,72 мин$^{-1}$	Для k_1=300 мин$^{-1}$
200	1,568	kf=0,6 kr=0,3	kf=0,4 kr=0,2	200	0,241	kf=5,0 kr=2,5	kf=3,0 kr=1,5
100	3,072	kf=0,3 kr=0,15	kf=0,2 kr=0,1	100	0,473	kf=2,0 kr=1,0	kf=1,5 kr=0,75
50	5,888	kf=0,15 kr=0,075	kf=0,12 kr=0,06	50	0,907	kf=1,0 kr=0,5	kf=0,8 kr=0,4
40	7,2	kf=0,1 kr=0,05	kf=0,09 kr=0,045	40	1,109	kf=0.8 kr=0,4	kf=0,65 kr=0,325
20	12,8	kf=0,07 kr=0,035	kf=0,06 kr=0,03	20	1,971	kf=0,5 kr=0,25	kf=0,4 kr=0,2
Все места связывания доступны плазмину [в]	20	kf=0,05 kr=0,025	kf=0,04 kr=0,02	Все места связывания доступны плазмину [в]	3,08	kf=0,2 kr=0,1	kf=0,2 kr=0,1

Примечание: а — значения θ_0 (соответствующие значениям R_0) и k_1 в модели фиксировались, значения k_f варьировались до совпадения модели с экспериментом; б — k_r рассчитывалось из k_f и константы диссоциации K_d=0,5 мкМ [11]; в — плазмину считались доступными все сайты связывания в объеме фибриллы, модель (2) рассматривалась без последнего слагаемого в правой части уравнения для изменения θ.

чальная концентрация сайтов связывания θ_0 и каталитическая константа k_1 фиксировались. А значение k_f варьировалось до значения, при котором модель описывала эксперимент. Значение k_r было связано с k_f через равновесную константу диссоциации K_d=0.5 мкМ [11]. Из таблицы видно, что при всех приведенных значениях радиуса фибриллы и константы k_1 для описания экспериментов моделью приходится довольно сильно (на 1–3 порядка) изменять значение константы k_f, оцененное в работе [5]. Исходя из этих результатов, можно сделать вывод о том, что из двух стадий реакции лизиса фибрина лимитирующей является стадия связывания плазмина. Стадия же непосредственного гидролиза фибрина плазмином гораздо слабее влияет на кинетику всей реакции. Кроме того, для физиологических значений радиуса фибриллы и исследовании **Таблицы 2** можно дать численную оценку значения константы связывания плазмина k_f (0,05–1,0 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$).

Существующие литературные значения констант реакции лизиса фибрина плазмином. В литературе не удалось обнаружить прямых экспериментов, направленных на определение констант k_1 и k_f. Данная реакция расщепления фибрина плазмином имеет ряд особенностей, которые затрудняют её экспериментальное исследование. Во-первых, субстрат в данной реакции является твердой фазой, причем не весь его объем доступен ферменту, т.к. плазмину (ферменту) при физиологических условиях образования фибрина (субстрата) не доступны протофибриллы, находящиеся внутри волокон фибрилл [7]. К тому же, известно, что радиус образовавшихся фибрилл, а, следовательно, и количество взаимодействующих с плазмином сайтов связывания на поверхности фибриллы зависят от концентрации фибриногена [5]. Эта зависимость детально не известна. Поэтому контролируемо менять концентрацию субстрата (концентрацию взаимодействующих с плазмином сайтов связыва-

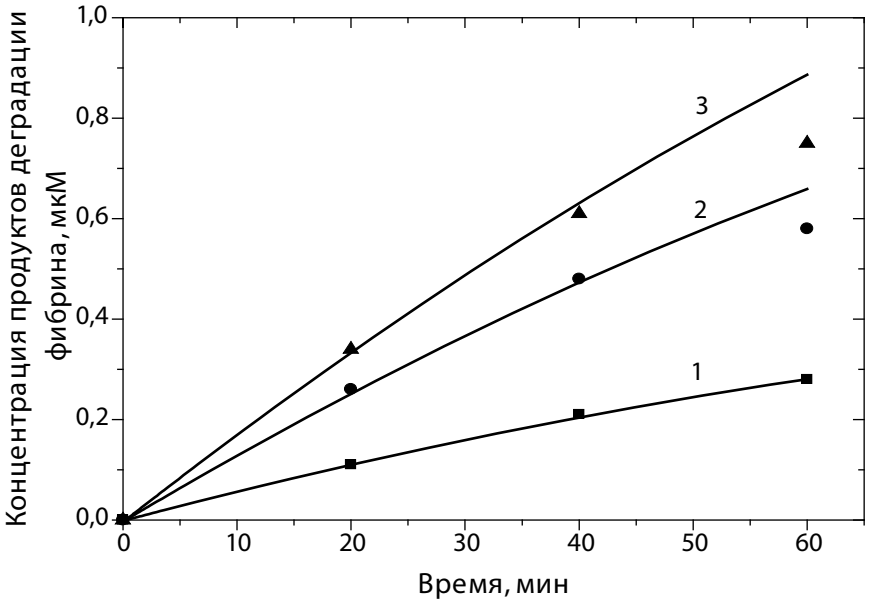


Рис. 3. Кинетика лизиса ^{125}I-меченого фибринового сгустка плазмином (эксперимент из статьи [1]). Символами изображены результаты экспериментов. Начальные концентрации фибрина (пересчитанные на полный объем раствора плазмина вместе со сгустком) (мкМ): 0.44 (■), 1.1 (●), 1.54 (▲). Начальная концентрация плазмина 0,06 мкМ. Сплошные кривые представляют результаты решений модели (2) с начальными условиями: $[Fn_0]$= 0.44 (1), 1.1 (2), 1.54 (3) мкМ, $[Pn_0]$= 0,06 мкМ, r=4 нм, R_0=40 нм и значениями констант k_l=2,72 мин$^{-1}$, k_f=1,4 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$, k_r=0,7 мин$^{-1}$.

ния на фибрине) в экспериментах довольно затруднительно. Кроме того, для нахождения кинетических констант этой реакции необходимы эксперименты с равномерным распределением плазмина в сгустке для того, чтобы избежать влияния диффузии плазмина в сгусток. А в таких экспериментах, вероятно, является затруднительным точное наблюдение за концентрацией появившихся продуктов деградации фибрина. Во-вторых, в процессе лизиса на фибрине появляются дополнительные центры связывания плазмина [6, 13], что также затрудняет точное определение констант реакции. В-третьих, известно, что образующиеся продукты деградации способны ингибировать реакцию лизиса фибрина, т.к. содержат сайты связывания плазмина [1]. В литературе существует несколько оценок констант этой реакции (**Таблица 1**). Например, в теоретической работе [5] была произведена оценка для k_f, равная 0,006 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$, однако она была довольно условной. В той работе предполагалось, что k_f для плазмина является такой же, как и для Lys-формы плазминогена в силу схожести их K_d. Оценивая k_f для Lys-плазминогена авторы ссылались на статью [9], где довольно приближенно оценивалось время, в течение которого диспергированный фибрин насыщался плазмином разной концентрации. В еще одной теоретической работе тех же авторов k_f оценивалась как 0,03 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$ [2] на основании результатов статьи [12], в которой одновременно наблюдалась кинетика превращения плазминогена в плазмин и кинетика ингибирования плазмина несколькими ингибиторами как в свободной плазме, так и в связанном с фибрином состоянии. Значение же концентрации свободного плазмина, необходимое для оценки k_f, определялось как разность концентраций других компонент, вычисление которой могло привести к довольно большой ошибке. Таким образом, известные в литературе значения k_f являются довольно сомнительными. Большой разброс в литературных данных существует и по поводу каталитической константы k_l (**Таблица 1**), однако из наших результатов вытекает, что точное значение этой константы не настолько критично для скорости протекания всей реакции расщепления плазмина, как значение k_f.

Основные результаты исследования модели и ее недостатки.

Сравнение разработанной модели с экспериментами позволило сделать вывод о том, что скорость связывания плазмина лимитирует скорость всей реакции деградации фибрина плазмином, и дать численную оценку значению константы связывания k_f (0,05–1,0 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$). Однако модель явля-

лась гомогенной, для нее принималось равномерное распределение плазмина по сгустку, хотя сравнение проводилось с экспериментами, в которых плазмин диффундировал в сгусток. Учет в модели конечной диффузии не должно изменить основных выводов, сделанных из нашей работы, за исключением верхней границы диапазона оценочных значений для k_f (ее значение увеличится). Также в модели не было учтено появление дополнительных сайтов связывания плазмина в процессе лизиса и ингибирующее действие продуктов деградации фибрина. Это является оправданным только для начальных стадий фибринолиза.

Таким образом, настоящая работа показывает необходимость более детальных теоретических и экспериментальных исследований кинетики реакции расщепления фибрина плазмином для выяснения ее конкретных механизмов протекания, влияния параметров фибринового волокна и степени его лизиса на кинетику реакции, нахождения ее кинетических констант, истинных значений которых в литературе пока не известно. Это было бы большим шагом к более глубокому пониманию механизмов регуляции всего фибринолиза и более корректному математическому описанию этого процесса.

ВЫВОДЫ.

1. Построена математическая модель гомогенного лизиса фибрина плазмином.
2. Проведен эксперимент по кинетике лизиса фибринового сгустка плазмином, использующий авидин-биотиновую систему для регистрации продуктов деградации фибрина.
3. Выявлено сильное лимитирующее влияние скорости связывания плазмина на скорость реакции лизиса фибрина.
4. Из сравнений модели с экспериментами получена численная оценка константы связывания плазмина (k_f= 0,05–1,0 мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$).

Авторы признательны профессору Ф.И. Атауллаханову, кандидату биологических наук С.П. Домогатскому, кандидату биологических наук М.А. Пантелееву за ценные указания в проведении данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Житкова Ю.В., Айсина Р.Б., Варфоломеев С.Д. Кинетика лизиса фибрина плазмином: ингибирование продуктами деградации фибрина.//Биоорг. химия. — 1996. — Vol.22. — P.911-915.*
2. *Anand S., Diamond S.L. Computer simulation of systemic circulation and clot lysis dynamics during thrombolytic therapy that accounts for inner clot transport and reaction.//Circulation. — 1996. — Vbol. 94. — P.763-774.*
3. *Baradet T.C., Haselgrove J.C., Weisel J.W. Three-dimensional reconstruction of fibrin clot networks from stereoscopic intermediate voltage electron microscope images and analysis of branching.//Biophys. J. — 1995. — Vol.68. — P.1551–60.*
4. *Cesarman-Maus G., Hajjar K.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis.//Br. J. Haematol. — 2005. — Vol.129. — P.307–21.*
5. *Diamond S.L., Anand S Inner clot diffusion and permeation during fibrinolysis.//Biophys. J. — 1993. — Vol.65. — P.2622–43.*
6. *Fleury V., Angles-Cano E Characterization of the binding of plasminogen to fibrin surfaces: the role of carboxy-terminal lysines.//Biochemistry. — 1991. — Vol.30. — P.7630-8.*
7. *Gabriel D.A., Muga K., Boothroyd E.M. The effect of fibrin structure on fibrinolysis.//J Biol. Chem. — 1992. — Vol.267. — P.24259-24263.*
8. *Lottenberg R., Christensen U., Jackson C.M., Coleman P.L. Assay of coagulation proteases using peptide chromogenic and fluorogenic substrates.//Methods. Enzymol. — 1981. Vol.80. — P.341-61.*
9. *Lucas M.A., Fretto L.J., McKee P.A. The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen.//J Biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P.4249-4256.*
10. *Medved L., Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin.//Thromb. Haemost. — 2003. — Vol.89. — P.409-19.*
11. *Suenson E., Thorsen S. Secondary-site binding of Glu-Plasmin, Lys-Plasmin and miniplasmin to fibrin.//Biochem. J. — 1981. — Vol.197. — P. 619-628.*
12. *Thorsen S., Mullertz S., Suenson E., Kok P. Sequence of formation of molecular forms of plasminogen and plasmin-inhibitor complexes in plasma activated by urokinase or tissue-type plasminogen activator.//Biochem. J. — 1984. — Vol. 223. — P.179-187.*
13. *Tran-Thang C., Kruithof E.K., Atkinson J., Bachmann F. High-affinity binding sites for human Glu-plasminogen unveiled by limited plasmic degradation of human fibrin.//Eur. J Biochem. — 1986. — Vol.160. — P.599-604.*
14. *Walker J.B., Nesheim M.E. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin.//J Biol. Chem. — 1999. — Vol.274. — P.5201-12.*

РОЛЬ РАННЕГО РАЗВИТИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА В ПРОГРЕССИРОВАНИИ НАРУШЕНИЙ ТРОМБОЦИТАРНО-СОСУДИСТОГО ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

А. С. Дешеулин, А. В. Аршинов, В. И. Емануйлов
Ярославская государственная медицинская академия

ROLE OF EARLY DEVELOPMENT ATHEROSCLEROSIS FOR HEMOSTASIS DISORDERS DETERIORATION IN SLE PATIENTS

A. S. Desheulin, A. V. Archinov, V. I. Emanuylov
The Yaroslavl state medical academy

The purpose: to estimate a role of early development atherosklerosis in deterioration of infringements hemostasis at the patients SLE.

Materials and methods: we surveyed 46 women of the patients of SLE, which were divided into 2 groups. 1– 24 women were in reproduction the period. The average age has made 39,5 (31–44) year. 2– 22 women in posmenapausal the period. The average age has made 55 (48–59) years. Group of the control have made 30 practically of healthy women from which 15 were in reproduction the period, the average age has made 38 (25–42) years. And 15 women in postmenapausal the period, the average age has made 54 (52–55) years. The groups are similar on a floor and age ($p > 0.05$). The following parameters were estimated: levels spontaneous and inductor-agregation, LDL, HDL, degree atherogenesis, threeglicerides, general holesterol. The activity of SLE was estimated on scales SLAM, SLEDAI, ECLAM.

Results: already in reproduction the period it is marked dyslpidhemia (LDL at SLE 1.01 mmol/l against 1.37 mmol/l in group of the control; HDL at SLE 2.9 mmol/l against 1.6 mmol/l in group of the control; a degree atherogenesis at SLE 4.5 against 2.55 in control group; general holesterol at SLE 5.15 mmol/l against 4.55 mmol/l to control group; in all cases $p < 0.05$). The given condition highly correlates: correlation spontaneous with HDL, threeglycerides and degree athergenesis — 0.46, 0.45, 0.43 accordingly, $p < 0.05$; correlations ristocetin-induction agregation with HDL, degree atherogenesis and general holesterol — 0.48, 0.43, 0.48 accordingly, $p < 0.05$, with the raised meanings spontaneous and induction agregation: spontaneous at SLE 0.82 % (0.26 % the control); ristocetin-induction agregacion at SLE 72.65 % (51.3 % the control); kollagen-induction agregation at SLE 66.15 % (40.7 % the control); in all cases $p < 0.05$. Similar, but more expressed condition is observed in group of the patients postmenapausl of the period. Taking into account, that secondary vasculitis at the patients of SLE supports constant extensiv damage endothelium of vessels practically on all extent, we can speak early development dyslipidhemia of infringements and additional way of activation hemostasis at the patients of SLE, that promotes increase of risk of development atherotrombosis of complications at the patients from SLE.

Key words: *Inflammation — atherosclerosis — systemic lupus erythematosus*

ВВЕДЕНИЕ.

Цель работы: оценить роль раннего развития атеросклероза в прогрессировании нарушений тромбоцитарно-сосудистого гемостаза у больных системной красной волчанкой (СКВ).

В настоящее время проблема смертельно опасных осложнений у больных СКВ прогрессивно смещается в сторону сосудистых катастроф, таких как инфаркт миокарда и ишемический инсульт головного мозга как проявление атеротромбозов [1, 2, 3, 8, 11, 12]. Если еще несколько лет назад больные преимущественно погибали в молодм возрасте от почечной недостаточности как осложнение люпус-нефрита, то в настоящее время на первое место выходят атеротромбозы различной локализации [1].

Казалось бы, основной патогенез СКВ достаточно широко изучен, и в настоящее время существует аутоиммунная теория заболевания. Безусловно, срыв аутотолерантности лежит в основе СКВ, но как объяснить тот факт, что на фоне патогенетической терапии глюкокортикостероидами (ГКС) и цитостатиками мы зачастую встречаем довольно частые эпизоды обострения и прогрессирования заболевания, сопровождающиеся тромбозами. За последние годы

в зарубежной и отечественной литературе стали описываться исследования, результатами которых являлось то, что у больных системными заболеваниями отмечается синдром дислипидемии, гипертриглицеридемии и гиперхолестеринемии [9]. С другой стороны известно, что при СКВ имеет место вторичный васкулит [5], который поддерживает хроническое воспаление сосудистой стенки, активирует эндотелий [4], который приобретает через каскад реакций проатерогенные свойства [6, 10, 13]. А в условиях дислипидемии и гиперхолестеринемии, когда ЛПНП обладают способностью по градиенту концентрации диффундировать с субэндотелиальное пространство даже при сохранном эндотелии [7], ассоциация поврежденного эндотелия и повышенного уровня ЛПНП приводит к катастрофическим последствиям. Развивается массивное генерализованное атеросклерозоподобное поражение сосудистой стенки практически на всем протяжении сосудистого русла. Стоит ли говорить об атеросклерозе как таковом, скорее нет. Ведь для атеросклероза морфологически характерно наличие бляшки в местах повышенного гемодинамического напряжения. Безусловно, эти изменения наблюдаются и у больных СКВ, однако учитывая масштабы повреждения все-таки уместно говорить об атеросклерозоподобном процессе. И естественно, в рамках генерализованного повреждения сосудистой стенки создаются все условия для активации системы тромбоцитарно-сосудистого гемостаза и развития катастрофических осложнений в виде атеротромбозов коронарных артерий, артерий головного мозга, периферических артерий конечностей, создавая реальную угрозу жизни больного. В связи с вышеуказанным, изучение взаимосвязи раннего атеросклерозоподобного процесса и системы первичного гемостаза у больных СКВ является актуальным и безусловно важным.

ПАЦИЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью изучение липидного профиля и системы тромбоцитарно-сосудистого гемостаза нами было обследовано 46 женщин, которые были разделены на 2 группы. 1 — 24 женщины находились в репродуктивном периоде. Средний возраст составил 39,5 (31–44) года. 2 — 22 женщины в постменапаузальном периоде. Средний возраст составил 55 (48–59) лет. Группу контроля составили 30 практически здоровых женщин из которых 15 находились в репродуктивном периоде, средний возраст составил 38 (25–42) года. И 15 женщин в постменапаузальном периоде, средний возраст составил 54 (52–55) года. Группы сходны по полу и возрасту ($p>0.05$). Оценивались следующие показатели: уровни спонтанной и индуцированной агрегации тромбоцитов, LDL, HDL, степень атерогенности, триглицериды, общий холестерин; СРБ. Активность СКВ оценивалась по шкалам SLAM, SLEDAI, ECLAM.

Показатели спонтанной и индуцированной агрегации проводились на агрегометре BIOLA LA-230 с помощью коммерческой программы Aggr ассоциированной в среде WINDOWS. В качестве индукторов агрегации использовались АДФ, ристоцетин и коллаген (Технология — Стандарт Россия). Исследовалась богатая тромбоцитами плазма.

Показатели липидного спектра исследовались ферментативным фотометрическим методом по конечной точке с использованием коммерческого набора DIACONT- диагностика.

Уровень СРБ определялся иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора СРБ — ultra, XEMA-Medica Russia.

Забор крови производился единовременно, утром, натощак, с предварительным соблюдением безхолестериновой диеты в течение 3-х суток. Все больные получали поддерживающую терапию ГКС в дозе 7,5 (5–20) мг в сутки. Критериями исключения являлись прием статинов на момент исследования или их отмена мене 3-х месяцев до исследования; прием антиагрегантов и препаратов, улучшающих микроциркуляцию.

Статистическая обработка производилась при помощи программного обеспечения Stat Soft V 6.0, trial версия. Учитывая то, что ряды распределения не поддавались нормальному закону распределения, оценка данных производилась непараметрическим методом и выражалась в форме Me (нижний квартиль — верхний квартиль). Для оценки достоверности различий между группами использовался тест Mann-Whitney, где достоверным считается различие при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Группа репродуктивного возраста.

Активность СКВ по шкалам SLAM 9,5 (7.0–15.0), SLEDAI 18.0 (10.0–20.0) и ECLAM 3.0 (1.0–7.0) баллов.

I.1. Тромбоцитарно-сосудистый гемостаз.

Можно отметить, что у больных СКВ отмечалось достоверное ($p<0.05$) повышение уровня спонтанной

агрегации 0.82 % (0.41–1.02), по сравнению с группой контроля — 0.26 % (0.19–0.35). Так же отмечалось достоверное (p <0.05) повышение ристоцетин-индуцированной 72.7 % (48.6–84.3) и коллаген-индуцированной 66.15 % (49.3–75.2) агрегации тромбоцитов соответственно по сравнению с группой контроля — 51.3 % (48.1–56.0) и 40.7 % (39.0–42.2) соответственно. Как известно, повышение уровня спонтанной и индуцированной агрегации характерно для СКВ и как правило обусловлено нарушением целостности эндотелия сосудов, а также активацией тромбоцитов иммунными комплексами, антителами, и другими активирующими агентами. Но как говорилось выше, эндотелий сосудов может быть поврежден не только аутоиммунным процессом. Тем не менее, роль аутоантител в инициации вторичного васкулита остается безусловной. Учитывая показатели индуцированной агрегации (ристоцетин и коллаген) можно косвенно судить о повреждении эндотелия как сосудом микроциркуляторного русла, так и крупных артерий.

I.2. Липидный профиль.

Уровень ЛПВП в группе женщин с СКВ составил 1.01 ммоль/л (0.8–1.16), что достоверно (*p <0.05*) ниже, чем в группе контроля — 1.37 ммоль/л (1.23–1.65).

Уровень ЛПНП в группе женщин с СКВ составил 2.9 ммоль/л (1.6–3.34), что достоверно (*p <0.05*) выше, чем в группе контроля — 1.6ммоль/л (1.0–1.85)

Уровень триглицеридов в группе женщин с СКВ составил 1.43ммоль/л (1.36–1.78), что достоверно выше (p <0.05), чем в группе контроля — 1.22 ммоль/л (1.05–1.25)

Показатель степени атерогенности в группе больных СКВ составил 4.5 (3.2–6.1), что достоверно выше (*p <0.05*), чем в группе контроля — 2.5 (2.15–2.75)

Уровень общего холестерина в группе женщин с СКВ составил 5.15 ммоль/л (4.6–6.9), что достоверно выше (*p <0.05*), чем в группе контроля — 4.55 ммоль/л (4.35–4.6).

Можно отметь выраженный синдром дислипидемии, гипертиглицеридемии, гиперхолестеринемии. Причины данного состояния до конца остаются неизвестными и требую дальнейшего изучения. Однако следует предположить, что возможно имеется некоторое поражение печени с последующим нарушением в звене регуляции липидного обмена.

I.3 С-реактивный белок

СРБ в группе больных СКВ составил 9.58 мг/л (3.2–10.9), что значительно превышало показатели группы контроля — 4.5 мг/л (2.3–5.4).

I.4 Корреляционная зависимость между исследуемыми показателями.

Отмечаются высокие корреляции между показателями спонтанной агрегации и: ЛПНП (R-0.46 *p <0.05*), триглицеридами (R-0.45 *p <0.05*) и степенью атерогенности (R-0.43 *p <0.05*).

Также отмечаются высокие корреляции между ристоцетин-индуцированной агрегацией и: ЛПНП (R-0.49 *p <0.05*), степенью атерогенности (R-0.43 *p <0.05*) и общим холестерином (R-0.48 *p <0.05*).

Высокие корреляции и между уровнем СРБ и показателями ЛПНП (R-0.49 *p <0.05*), степенью атерогенности (R-0.52 *p <0.05*) и уровнем общего холестерина (R-0.5 *p <0.05*). Отмечаются достоверные (*p <0.05*) корреляции между показателями спонтанной агрегации и уровнем СРБ (R-0.67).

Данные корреляционные зависимости отражают взаимосвязь выраженной дислипидемии, гипертиглицеридемии и гиперхолестеринемии в активации системы тромбоцитарно-сосудистого гемостаза преимущественно в микроциркуляторном русле, что в последствии может привести к осложнениям виде тромбозов мелких сосудов. Нельзя не отметить корреляции между спонтанной агрегацией и уровнем СРБ. Как известно, СРБ отражает кардиваскулярный риск, и такая взаимосвязь может являться дополнительным подтверждением участия липидов в активации системы тромбоцитарно-сосудистого гемостаза, тем более учитывая то, что ЛПНП, степень атерогенности и общий холестерин высоко коррелирует с уровнем СРБ.

II. Группа в постменапаузальном периоде.

Активность по шкалам SLAM, SLEDAI, ECLAM составила 11 (9–13), 18 (16–19) и 3 (3–4) балла соответственно.

II.1. Тромбоцитарно-сосудистый гемостаз.

У больных СКВ отмечается достоверное (*p <0.05*) повышение уровня спонтанной агрегации по сравнению с группой контроля: 0.96 (0.08–3.33) против 0.45 (0.22–0.56). Также отмечалось достоверное (*p <0.05*) повышение АДФ- индуцированной 64.7 % (52.5–72.6) ристоцетин-индуцированной 68.8 % (55.1–99.3) и коллаген-индуцированной 72.0 % (58.2–98.4) агрегации тромбоцитов соответственно по сравнению с группой контроля — 52.3 % (47.8–55.), 51.2 % (50.4–53.3) и 42.1 % (39.8–44.4) соответственно.

Таким образом мы можем судить о еще большей активации системы гемостаза как в микроциркуляторном русле, так и в крупных артериях.

II.2. Липидный профиль.

Уровень ЛПВП в группе женщин с СКВ составил 1.21 ммоль/л (0.7–1.73), что достоверно ($p < 0.05$) ниже, чем в группе контроля — 1.37 ммоль/л (1.23–1.65).

Уровень ЛПНП в группе женщин с СКВ составил 3.47 ммоль/л (1.05–6.03), что достоверно ($p < 0.05$) выше, чем в группе контроля — 1.6 ммоль/л (1.0–1.85)

Уровень триглицеридов в группе женщин с СКВ составил 1.79 ммоль/л (0.6–3.56), что достоверно выше ($p < 0.05$), чем в группе контроля — 1.22 ммоль/л (1.05–1.25)

Показатель степени атерогенности в группе больных СКВ составил 4.6 (2.4–9.0), что достоверно выше ($p < 0.05$), чем в группе контроля — 2.5 (2.15–2.75)

Уровень общего холестерина в группе женщин с СКВ составил 6.7 ммоль/л (4.5–8.8), что достоверно выше ($p < 0.05$), чем в группе контроля — 4.55 ммоль/л (4.35–4.6). Как мы видим, отмечается выраженная дислипидемия, гипертриглицеридемия и гиперхолестеринемия.

I.3 С-реактивный белок

СРБ в группе больных СКВ составил 8.8 мг/л (1.66–9.76), что достоверно ($p < 0.05$) выше чем в группе контроля 4.7 мг/л (2.3–6.3).

I.4 Корреляционная зависимость между исследуемыми показателями.

Отмечаются высокие корреляции между показателями спонтанной агрегации и: ЛПНП (R- 0.46 $p < 0.05$), триглицеридами (R-0.45 $p < 0.05$) и степенью атерогенности (R-0.43 $p < 0.05$). Также отмечаются высокие корреляции между ристоцетин-индуцированной агрегацией и: ЛПНП (R-0.49 $p < 0.05$), степенью атерогенности (R-0.43 $p < 0.05$) и общим холестерином (R-0.48 $p < 0.05$).

Высокие корреляции и между уровнем СРБ и показателями ЛПНП (R-0.49 $p < 0.05$), степенью атерогенности (R-0.52 $p < 0.05$) и уровнем общего холестерина (R-0.5 $p < 0.05$)

Можно отметить взаимосвязь изменений липидного спектра и показателей тромбоцитарно-сосудистого гемостаза, которая остается высокой, и по некоторым показателям превышает группу больных репродуктивного периода (разница между группами достоверна $p < 0.05$).

ВЫВОДЫ

1. У больных СКВ отмечается ранний синдром дислипидемии, что создает условия для дополнительной активации тромбоцитарно-сосудистого гемостаза у больных СКВ в репродуктивном периоде, и может способствует увеличению риска развития атеротромботических осложнений у данной группы пациентов.
2. Синдром ранней дислипидемии может являться вторичным состоянием при СКВ и выступать как дополнительный путь поддержания активности хронического воспаления сосудистой стенки и увеличения риска тромбозов.
3. Необходима коррекция липидного спектра уже в раннем возрасте с целью профилактики развития в дальнейшем атеросклероза и как следствие атеротромбоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Демина А. Б., Раденска-Лоповок, С. Г., Фоломеева О. М. Анализ структуры летальных исходом и причин смерти при ревматических мболеааниях и Москве. Нучно-практ ревматол 2004; 2: 25–31*
2. *Комаров В. Т., Девина О. В., Воеводина Т. С., характеристика причин смертности при ревматоидном артрите. Научно-практ. ревматол. 2003; 2; 46*
3. *Насонов ЕЛ, Патогенетическое и клиническое обоснование применении статинов при системной красной волчанке и антифосфолипидном синдроме. Клин. фармакол. тер. 2004; 13: 1: 82–89.*
4. *Belmont H. M., Buyon J., Giorno R., Abramson S. B. Up — regulation of endothelial cell adhesion molecules characterizes disease activity in systemic lupus erythematosus//Arthr. Rheum. — 1994. — Vol. 37. — P. 376–383.*
5. *Belmont H. M., Abramson S. B., Lie J. T. Pathology and pathogenesis of vascular injury in systemic lupus erythematosus//Arthr. Rheum. — 1996. — Vol. 39. — P. 9–22..*
6. *Hansson GK Immune mechanisms in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21: 1876–1890.*
7. *Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leuko-cyteadhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothe-lial cells. J Clin Invest 1992; 90: 1138–1144.*
8. *Manzl S Systemic lupus erythematobus, a model for atherogenesis? Rheumatology 2000; 39: 353– 359.*
9. *M McMahon*, J Grossman, W Chen and BH Hahn Inflammation and the pathogenesis of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus Lupus (2006) 15, 59–69.*
10. *Navab M, Berliner JA, Watson AD et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 831–842.*

11. Trager J., Ward M Morltility and cause of death in systemic lupus crythematosus. Curr Opin Rheumatolg 2001; 13: 345–351.
12. Urowiltz M., Gladman D., Bruce I Atherosclerosis and systemic lupus erythematosus. Curt Opin Rheumatolg 2000; 2: I9–23.
13. Watson AD, Leitinger N, Navab M et al. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. J Biol Chem 1997; 272: 13597-13607.

АГРЕГАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ В ОСТРЫЙ ПЕРИОД ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ

Егорихина М. Н., Изумрудов М. Р., Гайнутдинова Л. И.
ФГУ «ННИИТО Росздрава», Россия.

ERYTHROCYTES AGGREGATION IN ACUTE PERIOD OF BURN INJURY

Egorihina M. N., Izumrudov M. R., Gainutdiniva L. I.
Public Institution «Nizhny Novgorod Research Institute of Trauma and Orthopedics of Health Department of Russian Federation»

Aggregation of erythrocytes during the sharp period of burn injury was studied using the original methods of research. It was shown that the increase in aggregation of erythrocytes in burn injury is to greater extent caused by plasma and not erythrocyte factors. Perfusion of plasma of burn patients through carbofibrous sorbent substantially reduces aggregation properties of plasma. The suggested method of estimation of aggregation of erythrocytes permits to estimate not only its basic parameters but also a number of additional ones: size of units and speed of formation of units of a certain size.

Ключевые слова: *ожог — агрегация эритроцитов.*

Известно, что нарушения микроциркуляции лежат в основе патогенеза острого периода ожоговой болезни и определяют развитие таких её осложнений как острая почечная недостаточность, респираторный дистресс — синдром, полиорганная недостаточность. В период ожогового шока нарушения микроциркуляции во многом связаны с гемоконцентрацией и, как следствие, с повышением вязкости крови. Важную роль в развитии синдрома повышенной вязкости крови играют значительное усиление агрегации эритроцитов и снижение их деформируемости [3]. По данным недавних исследований вклад микрореологических свойств эритроцитов в его развитие составляет более 50 % и является более значимым, чем гемоконцентрации [2].

Повышение агрегации эритроцитов при термической травме связано с влиянием как плазменных (уровень экстрацеллюлярного Ca^{2+}, изменение pH, крупномолекулярные плазменные белки, концентрация протеолитических ферментов, арахидоновой кислоты и т. д.), так и эритроцитарных факторов (нарушение липидной асимметрии мембран, уровень эндоцеллюлярного Ca^{2+}, нарушение АТФ-азной активности, содержание нейраминовой кислоты в мембранах, изменение дзета-потенциала мембран и т. д.) [3–6, 14–20].

При определении тактики терапии, направленной на коррекцию микроциркуляционных нарушений при термической травме, необходимо представление о роли каждого из этих факторов (плазменных и эритроцитарных) в их развитии.

Для грамотной оценки агрегации эритроцитов крайне важен правильный методический подход, то есть использование адекватных и информативных методов регистрации процессов агрегации и дезагрегации эритроцитов.

Решению данных вопросов посвящено настоящее исследование, целью которого является оценка возможности регистрации процессов агрегации эритроцитов оригинальными методами и изучение влияния изменений физико-химического состава плазмы крови на агрегацию эритроцитов в острые периоды ожоговой болезни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовалась кровь (стабилизированная цитратом натрия) 30 больных с тяжелыми ожогами (более 20 % поверхности тела) и 35 здоровых людей. Кровь центрифугировалась 15 мин. при 3000 об./мин., плазма отделялась от эритроцитарной массы, после чего плазма и эритроцитарная масса смешивались в соотношении 2:1 соответственно.

Для определения роли плазменных и клеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов приготавливались смеси плазмы и клеток крови по следующей схеме:

1 серия: эритроциты здорового человека + аутоплазма (контроль)
2 серия: эритроциты ожогового больного + аутоплазма
3 серия: эритроциты здорового человека + плазма ожогового больного
4 серия: эритроциты ожогового больного + плазма здорового человека

Предварительно проводилась проверка на групповую, резус и индивидуальную совместимость. Перед приготовлением смесей эритроцитарная масса однократно промывалась физиологическим раствором.

При оценке процессов агрегации и дезагрегации использовались следующие показатели:

1. Степень агрегации по максимальной амплитуде агрегатограммы (мм) — Ма.
2. Амплитуда агрегатограммы через 40 сек., после начала процесса агрегации (мм) — A_{40}.
3. Время за которое достигается половина максимальной амплитуды агрегации (сек) — $T_{1/2}$.
4. Степень дезагрегации эритроцитов в процентах от Ма при скоростях сдвига 10сек$^{-1}$, 15сек$^{-1}$, 20сек$^{-1}$.

Для исследования агрегации и дезагрегации эритроцитов использовался модифицированный реоскоп Schmid-Schonbain [21]. Принцип действия прибора заключался в том, что эритроциты, помещенные между прозрачным кварцевым конусом и пластиной, вращающимися навстречу друг другу, оставались практически неподвижными в условиях потока, что давало возможность изучать и регистрировать данные процессы с помощью микроскопа.

В приборе, усовершенствованном *Г. Я. Левиным и соавт.* (1984), система конус-пластина, чрезвычайно сложная в изготовлении и эксплуатации, была заменена двумя параллельными кварцевыми пластинами. Кроме того, авторами применялась система интегрирования светового потока, который замерялся фотодиодом с дальнейшей регистрацией самописцем не с отдельного участка, находящегося на определенном расстоянии от центра вращения, а с кольца данного радиуса.

Последующие модификации (патент № 2278381) позволили, помимо регистрации агрегации эритроцитов, применять реоскоп и для измерения спонтанной агрегации тромбоцитов в условиях постоянного искусственного сдвигового потока [7]. Тем не менее, даже в этом варианте, прибор обладал некоторыми недостатками. Так, если спонтанная агрегация тромбоцитов оценивалась в условиях сдвигового потока, процесс агрегации эритроцитов, как и у Schmid-Schonbain, регистрировался после гидродинамического перемешивания и остановки (то есть в отсутствии напряжения сдвига), а система регистрации, преобразования и отображения результатов была подвержена влиянию ряда, прежде всего оптических, эффектов.

К моменту проведения представляемой работы реоскоп был подвергнут дополнительному усовершенствованию. Система регистрации, преобразования и отображения результатов, ранее происходившая путем обработки сигнала с фотодиода в аналого-цифровом преобразователе с последующей фиксацией результатов графическим самописцем, была заменена более современной. В новом варианте прибора применена цифровая камера-окуляр для микроскопа Scopetek DCM 130, при помощи которой производится микрофотосъемка агрегации и дезагрегации эритроцитов. Обработка полученных фотоснимков процесса агрегации осуществляется на ПК при помощи программы Диаморф Cito — W, которая позволяет вычислить площади самих эритроцитов и их агрегатов. Затем в программе Excel производится подсчет суммарных площадей эритроцитов и агрегатов, по которым строятся графики, отражающие процессы агрегации и дезагрегации эритроцитов. Сам процесс агрегации происходит в условиях сдвигового потока, а при достижении максимальных значений скорости сдвига регистрируется процесс дезагрегации.

Благодаря вышеизложенным усовершенствованиям впервые появилась возможность *in vitro* регистрировать агрегацию эритроцитов в условиях напряжении сдвига, что позволило максимально приблизить методику исследования к условиям *in vivo*. Для записи процессов агрегации и дезагрегации эритроцитов применяются следующие режи-

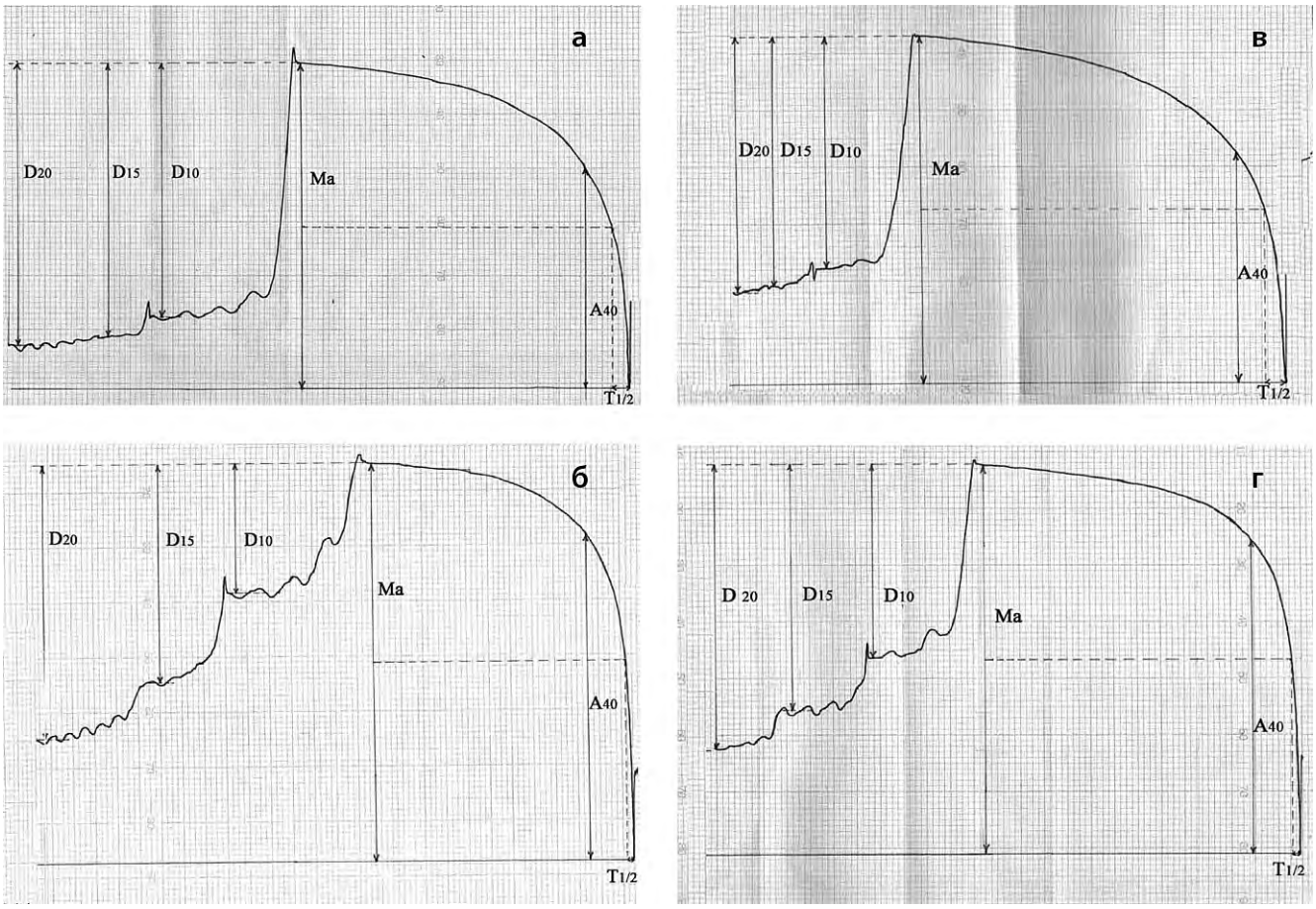


Рис.1. Изменение агрегации эритроцитов под влиянием плазмы ожоговых больных: **а** — эритроциты здорового человека с аутоплазмой; **б** — эритроциты ожогового больного с аутоплазмой; **в** — эритроциты ожогового больного с плазмой здорового человека; **г** — эритроциты здорового человека с плазмой ожогового больного.

мы: 250 $с^{-1}$ — гидродинамическое перемешивание; 15 $с^{-1}$ — скорость сдвига, при которой протекает агрегация эритроцитов; 113 $с^{-1}$, 138 $с^{-1}$, 188 $с^{-1}$, 238 $с^{-1}$– скорости сдвига, при которых происходит дезагрегация эритроцитов.

Увеличилась информативность измерения процесса агрегации эритроцитов — появилась возможность фиксировать и объективно оценивать дополнительные параметры: размеры агрегатов, соотношение агрегатов различного размера, отслеживать скорость образования агрегатов определенной величины. Если ранее процесс агрегации оценивался по косвенным данным (изменение светопропускания суспензии агрегирующих эритроцитов), то теперь появилась возможность регистрации этого процесса напрямую путем оценки суммарных площадей агрегатов (усл. ед.). Кроме того, удалось избавиться от вышеперечисленных артефактов, характерных для предыдущей системы регистрации и отображения результатов. Значительно упростились и расширились возможности работы с исследуемым материалом.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью непараметрической статистики с применением критериев Манна-Уитни и Вилкоксона парных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как показали проведенные исследования, в острый период ожоговой болезни значительно увеличивается скорость и степень агрегации эритроцитов. При этом скорость агрегации увеличивается в 3 раза ($p < 0{,}001$), а степень агрегации — в 1,3 раза ($p < 0{,}001$). Не менее значимо изменяются и показатели дезагрегации (**табл. 1**). По нашим данным дезагрегация эритроцитов ожоговых больных на всех скоростях сдвига по сравнению с нормой сильно снижена: до 51 % ($p < 0{,}001$), до 75 % ($p < 0{,}001$) и до 84 % ($p < 0{,}05$) на скоростях сдвига 10 $с^{-1}$, 15 $с^{-1}$, 20 $с^{-1}$, соответственно (**рис. 1. б**).

Таблица 1.

Влияние плазмы ожоговых больных на агрегационные свойства эритроцитов.

Серия №	Ма, мм	A_{40}, мм	$T_{1/2}$, сек	D_{10}, %	D_{15}, %	D_{20}, %
1. эр.здорового человека с аутоплазмой	143,07±4,10	86,50±5,51	26,00±4,06	78,05±2,83	82,57±2,57	84,72±2,42
2. эр. ож. больного с аутоплазмой	185,15±6,28**	147,87±5,82**	7,51±0,65**	44,88±6,11**	62,16±3,33**	71,27±2,16*
3. эр.здорового человека с пл. ож. больного	171,55±9,18·	124,85±9,32·	12,70±1,80·	57,33±5,53	73,69±4,97	81,49±5,46
4. эр. ож. больного с пл. здорового человека	145,05±6,16··	97,95±11,28··	26,90±4,74··	77,92±5,37··	83,38±5,09·	96,25±11,29·

*Примечание: * — p<0,05, ** — p<0,001, критерий Манна – Уитни; · — p<0,05, сравнение с серией 2; критерий Вилкоксона;*
·· — p<0,05, сравнение с серией 3; критерий Вилкоксона.

Для оценки роли плазменных и эритроцитарных факторов в изменении агрегации при ожоговой болезни проводились несколько серий опытов, в которых к эритроцитам здоровых людей добавляли плазму ожоговых больных и наоборот. В результате было показано, что ожоговая плазма, добавленная к интактным эритроцитам, вызывала изменение всех оцениваемых нами параметров процессов агрегации и дезагрегации эритроцитов. Она вызывала увеличение как скорости агрегации (в 2 раза), так и степени агрегации (на 10 %) (**рис.1. г**). При исследовании процесса дезагрегации наблюдалась ярко выраженная тенденция к его снижению на скоростях сдвига 10 $с^{-1}$, 15 $с^{-1}$, до 85 % и до 95 % соответственно (**табл. 2**). Сравнение данных показателей с теми, где использовались эритроциты ожоговых больных и аутоплазма, достоверных различий выявлено не было. Таким образом, реологические показатели интактных эритроцитов под действием плазмы ожоговых больных приближались к таковым у людей с термической травмой.

Добавление плазмы здоровых людей к эритроцитам ожоговых больных значительно улучшало показатели, как агрегации так и дезагрегации красных клеток крови. Так, оцениваемые параметры агрегации эритроцитов четвертой серии опытов (эритроциты ожогового больного + плазма здорового человека) значительно снижались по сравнению с теми, где использовались эритроциты и плазма ожогового больного. По полученным нами данным скорость агрегации снизилась в 2,7 раза ($p < 0,05$), а степень агрегации до 80 % ($p < 0,05$). Уровень дезагрегации статистически значимо повышался на всех скоростях сдвига. Так, при скорости сдвига 10 $с^{-1}$ дезагрегация увеличивалась в 1,4 раза ($p < 0,05$), а при последующих (15 $с^{-1}$ и 20 $с^{-1}$) в 1,2 раза ($p < 0,05$) (**рис.1. в**). При сравнении показателей агрегатограмм данной серии опытов с контролем Ма, $T_{1/2}$, A_{40} и значения дезагрегации на всех скоростях сдвига статистически значимо не отличались. Таким образам, плазма здоровых людей практически полностью нормализовала реологические свойства эритроцитов больных с термической травмой, что свидетельствует об обратимости процессов, вызывающих изменения агрегационных свойств эритроцитов при ожоговой болезни.

Учитывая полученные результаты и не отрицая роли мембранных и внутриклеточных факторов, влияющих на реологические свойства эритроцитов, можно заключить, что основную роль в их изменении при ожоговой болезни играют плазменные факторы. Это согласуется с данными о купировании микроциркуляционных нарушений у больных с термической травмой после проведения плазмафереза и плазмообмена [9–12].

Имеются сведения о положительном гемореологическом действии и гемосорбции. Можно полагать, что оно связано, прежде всего, с уменьшением содержания в плазме низко- и среднемолекулярных пептидов, кислых протеаз, продуктов перекисного окисления липидов, фибриногена, растворимых фибрин-мономерных комплексов после гемосорбции [1, 6, 8, 13, 17].

Для уточнения роли именно плазменных факторов в агрегации эритроцитов при ожоговой болезни проведены две серии опытов, в которых осущест-

Таблица 2.

Влияние плазмы ожоговых больных после её перфузии через гемосорбенты на агрегационные свойства эритроцитов

Сорбент	Серия №	Ма, мм	A_{40}, мм	$T_{1/2}$, сек	D_{10}, %	D_{15}, %	D_{20}, %
гранулированный сорбент ФАС	2. эр. ож. больного с аутоплазмой	193,50±6,41	145,13±7,97	12,00±0,82	67,23±9,55	75,71±9,00	79,37±8,77
	3. эр.здорового человека с пл. ож. больного	181,20±5,55	129,60±6,68	18,60±4,13	71,13±14,06	88,78±13,30	95,30±12,72
углеволокнистый сорбент	2. эр. ож. больного с аутоплазмой	159,75±10,35·	107,00±14,96·	20,50±7,85·	99,61±22,01·	109,55±24,34·	113,95±25,44·
	3. эр.здорового человека с пл. ож. больного	165,00±7,40**	108,25±8,15**	21,00±3,42**	100,74±12,88**	117,28±15,44**	123,27±13,48**

Примечание: · — p<0,05, сравнение с серией 2 (эр. ожогового больного с аутоплазмой);
*** — p<0,05, сравнение с серией 3 (эр. здорового человека с пл. ож. больного); критерий Вилкоксона.*

влялась перфузия плазмы крови ожоговых больных через колонку с гранулированным [ФАС] (первая серия) и углеволокнистым сорбентами (вторая серия). После плазмосорбции плазма добавлялась к эритроцитам здоровых людей и эритроцитам ожоговых больных.

В серии опытов с использованием углеволокнистого сорбента установлено, что агрегирующее действие сорбированной плазмы ожоговых больных на интактные эритроциты было значительно меньшим, чем плазмы, не обработанной данным сорбентом (**табл. 2**). Это проявлялось в опытах с использованием как интактных эритроцитов, так и эритроцитов ожоговых больных.

Перфузия плазмы этих же больных через гранулированный сорбент ФАС, по нашим данным, не оказывала улучшающего действия на параметры агрегации эритроцитов.

Причины, объясняющие полученные нами результаты, пока остаются неясными, однако, ранее проведенные исследования [11] свидетельствуют о том, что применение углеволокнистого сорбента улучшает деформируемость эритроцитов, а гранулированного — либо не оказывает никакого влияния, либо может даже ухудшать её. В связи с этим становится актуальным уделять большее внимание выбору сорбента при проведении плазмо- и гемосорбции, как при ожоговой болезни, так и при других патологических состояниях, при которых наблюдаются нарушения микроциркуляции.

Данные, полученные при применении нового метода оценки агрегации эритроцитов в условиях сдвигового потока, согласуются с вышеизложенными результатами, показавшими выраженное влияние плазменных факторов на реологические свойства эритроцитов. Кроме того, было выявлено, что в серии опытов, где эритроциты ожоговых больных смешивались с аутоплазмой, суммарная площадь агрегатов в 3,5 раза, а число крупных агрегатов в 6,5 раз превышали контрольные показатели (**рис. 2, 3**). Поскольку данная методика наиболее приближена к условиям in vivo и является более информативной, ее применение может быть актуальным как в исследовательской, так и в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что основной причиной нарушения реологических свойств эритроцитов при ожоговой болезни является изменение физико-химических свойств плазмы крови.
2. Показано, что плазмосорбция плазмы ожоговых больных с использованием с углеволок-

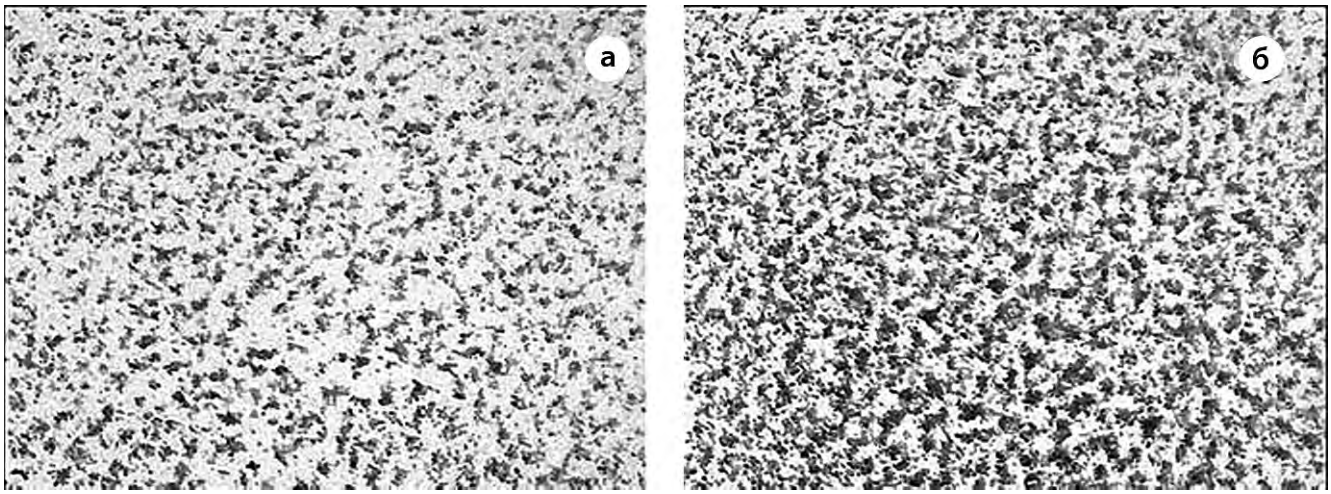


Рис.2. Агрегация эритроцитов (метод микрофотосъемки): **а** — кровь здорового человека, **б** — кровь ожогового больного.

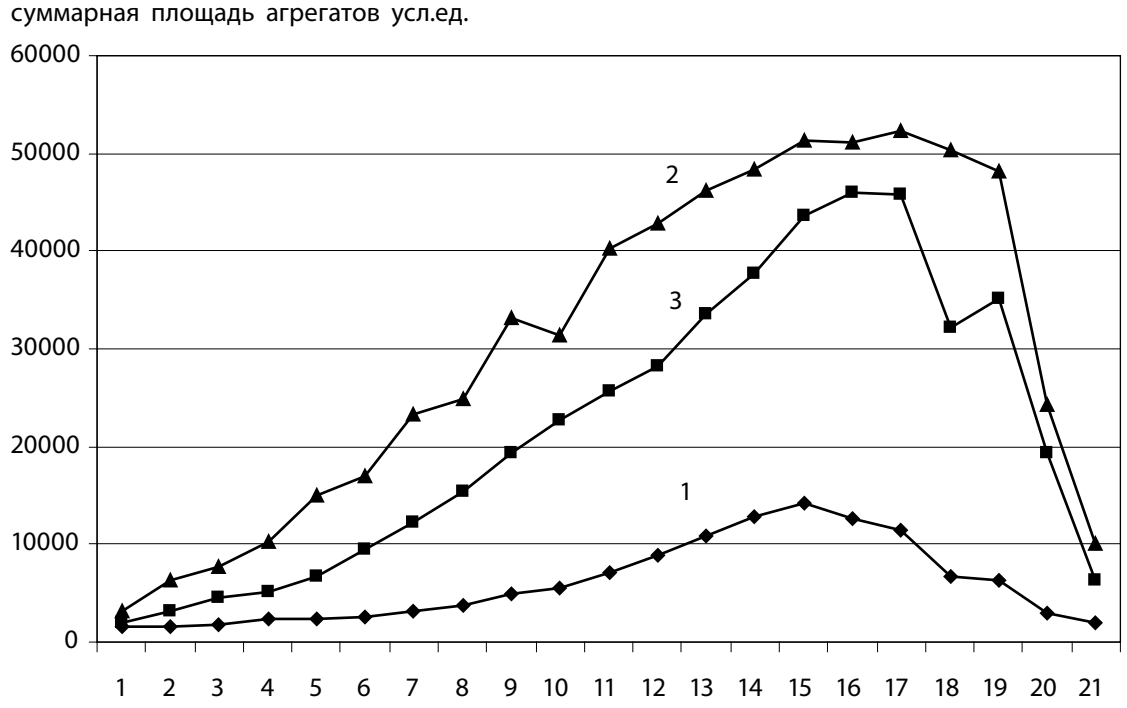


Рис.3. Исследование агрегации эритроцитов с помощью микрофотосъемки и обработки результатов программой Диаморф Cito-W: **1** — эритроциты здорового человека с аутоплазмой; **2** — эритроциты ожогового больного с аутоплазмой; **3** — эритроциты здорового человека с плазмой ожогового больного; **т. 1-15** — агрегация эритроцитов (скорость сдвига 15 с $^{-1}$), **т. 16–21** — дезагрегация эритроцитов (**т. 16-17** — скорость сдвига 113 с $^{-1}$, **т. 18-19** — скорость сдвига 138 с $^{-1}$, **т. 20** — скорость сдвига 188 с $^{-1}$, **т. 21** — скорость сдвига 238 с $^{-1}$).

нистого сорбента значительно снижает её стимулирующее действие на агрегацию эритроцитов как здоровых, так и ожоговых больных, в то время как гранулированный гемосорбент ФАС не обладает таким действием.

3. Предложенный нами метод исследования агрегации и дезагрегации эритроцитов позволяет регистрировать этот процесс в условиях напряжения сдвига и адекватно оценить не только основные его показатели, но и ряд дополнитель-

ных: размеры агрегатов и их соотношение в течение всего процесса, а так же скорость образования агрегатов определенной величины.

Авторы выражают глубокую благодарность за постановку работы и неоценимую помощь в проведении исследования руководителю отделения гравитационной хирургии и гемодиализа ФГУ «ННИИТО Росздрава» профессору Левину Григорию Яковлевичу.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Баталова М. И., Левин Г. Я.. Влияние окисленных углеволокнистых гемосорбентов на некоторые показатели гемостаза у ожоговых больных//Материалы VII Всерос. науч. — практ. конф. по пробл. термических поражений. — Челябинск, 1999. С.102-103.*
2. *Борисов Д. В.. Реологические свойства и транспортная функция крови при разных состояниях организма: Автореф. дис…. канд. биол. наук. — Ярославль, 2006. — 26 с.*
3. *Григорьев М. Г., Левин Г. Я., Тюкина А. А. и др. Клинико-экспериментальные исследования расстройств микроциркуляции в ранние периоды ожоговой болезни//Нарушения микроциркуляции при ожоговой болезни: Сб. науч. работ./Горьк. НИИТО. — Горький, 1983. С.3–36.*
4. *Гужова П. А. Внеклеточные сигнальные пути и внутриклеточные механизмы агрегации эритроцитов: Автореф. дис…. канд. биол. наук. — Ярославль, 2004. — 22 с.*
5. *Зубаиров Д. М., Свинтенок Г. Ю., Андрушко И. А. и др.. Нарушение липидной асимметрии при термогемолизе эритроцитов человека//Гематология и трансфузиология — 2003. — Т.48, № 3. — С.33–35.*
6. *Козинец Г. П. Патогенетическое обоснование различных методов дезинтоксикации при ожоговой болезни и влияние их на течение раневого процесса: Автореф. дис…д-ра мед. наук. — Киев, 1992. — 37 с.*
7. *Левин Г. Я., Модин А. П., Кудрицкий С. Ю. Устройство для исследования спонтанной агрегации эритроцитов и тромбоцитов//Гемореология в микро- и макроциркуляции: Материалы междунар. конф. — Ярославль, 2005. — С.219-219.*
8. *Левин Г. Я., Неделяева А. В., Соснина Л. Н., Царевский Н. Н. Коррекция изменений системы гемостаза в остром периоде ожоговой болезни с помощью плазмафереза//VI съезд травматологов и ортопедов России: Тез. докл. — Н. Новгород, 1997. — С.107.*
9. *Левин Г. Я., Неделяева А. В., Царевский Н. Н. и др. Коррекция гемостаза при ожоговой болезни с помощью плазмафереза//Материалы Второй Всерос. Конф. «Гомеостаз и инфекционный процесс» — Саратов, 1998. — С.41.*
10. *Левин Г. Я., Неделяева А. В., Царевский Н. Н., Соснина Л. Н. Исследование влияния плазмафереза и гемосорбции на систему гемостаза у обожженных//Актуальные вопросы интенсивной терапии, анестезиологии, реаниматологии и трансфузиологии на рубеже следующего столетия. — М., 1998. — С.123-125.*
11. *Левин Г. Я., Царевский Н. Н., Котяева Н. П. Влияние гемосорбции на деформабельность эритроцитов в острый период ожоговой болезни//VII междунар. симп. по гемосорбции: Тез. докл. — Киев, 1986. — С.119.*
12. *Левин Г. Я., Царевский Н. Н., Неделяева А. В. и др. Применение плазмафереза и гемосорбции для коррекции метаболических нарушений в остром периоде ожоговой болезни//Актуальные вопросы интенсивной терапии, анестезиологии, реаниматологии и трансфузиологии на рубеже столетия. — М., 1997. — С.41–45.*
13. *Левин Г. Я., Царевский Н. Н., Неделяева А. В., Соснина Л. Н. Влияние плазмафереза на систему гемостаза при ожоговой болезни//1-st joint russian-american meeting in burns and fire disasters. (Abstr. Book): Санкт-Петербург, 1997. — С.32.*
14. *Левин Г. Я., Шереметьев А. Ю. Действие фосфолипазы А на агрегацию эритроцитов и тромбоцитов//Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1976. — Т.82, № 12. — С.1411–1413.*
15. *Левин Г. Я., Шереметьев Ю. А. Роль N-ацетилнейраминовой кислоты и отрицательного заряда эритроцитов в их агрегации//Пробл. гематологии и переливания крови. 1981. — № 6. — С.6–8.*
16. *Лиховецкая З. М. Реология крови в гематологии и трансфузиологии//Патология крови экстремальные состояния: Сб. работ. М., 2004. — С.67–72.*
17. *Ожоговая интоксикация. Патогенез, клиника, принципы лечения/Г. П. Козинец, С. В. Слесаренко, А. П. Радзиховский и др. Киев, 2003. — 209 с.*
18. *Тихомирова И. А. Роль экстрацеллюлярных, мембранных и внутриклеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов: Автореф. дис…. д-ра биол. наук.— Ярославль, 2006. — 46 с.*
19. *Шереметьев Ю. А., Левин Г. Я., Штыхно Ю. М., Удовиченко В. И.. Влияние трипсина на внутрисосудистую агрегацию эритроцитов//Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1980. — Т.89, № 6. — С.671-673.*
20. *Шереметьев Ю. А., Штыхно Ю. М., Удовиченко В. И., Левин Г. Я. Влияние ацетилсалициловой кислоты и пентоксифиллина (трентала) на внутрисосудистую аг-*

регацию эритроцитов, стимулированную архидоновой кислотой//Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1980. — Т.90, № 9. — С.276-279.

21. *Schmid-Schцnbein H., Gosen J. V., Heinrich L. et al. Counter-rotating «rheoscope chamber» for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry//Microvasc. Res. — 1973. — Vol.6. — P.366-376.*

ПРАКТИКА

РАЗРАБОТКА УСТАНОВКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ДИНАМИКИ ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА

А. Н. Баландина

Лаборатория физической биохимии системы крови, Гематологический научный центр РАМН, Москва, Россия

DEVELOPMENT OF EQUIPMENT FOR INVESTIGATION OF THE SPATIAL-TEMPORAL THROMBIN GENERATION

A. N. Balandina

Laboratory of physical biochemistry of blood system, National Research Center for Hematology RAMS, Moscow, Russia

This paper describes development of the equipment intended for study of spatial thrombin generation dynamics, experimental methods and data processing. Principal feature of the device is that it takes into account inhomogeneities in activator distribution and activated coagulation factors during blood clotting.

Experimental setup and all necessary software have been developed.

The basis of the method is measuring of the product of cleavage of synthetic substrate by thrombin (7-amino-4-methylcoumarin — AMC). The substrate is added into plasma before the experiment. The camera registers fluorescence of AMC The maximum AMC concentration is observed nearby the clotting activator. During the experiment AMC propagates through the plasma for about 2 mm.

Spatial-temporal distribution of thrombin is calculated using the data of AMC distribution. The propagation of thrombin through plasma is observed in the form of running 60 nM high plateau. The front edge of thrombin runs up to 0.8–1.0 mm in 30 minutes after beginning of the experiment.

Keywords: *blood coagulation — thrombin generation — spatial dynamics.*

ВВЕДЕНИЕ

Задачей системы свертывания крови является предотвращение потери крови при нарушении целостности сосудистой системы. Система свертывания представляет собой каскад ферментативных реакций в плазме крови, который запускается при повреждении стенки сосуда. Последним и главным ферментом в каскаде свертывания является тромбин, который не только непосредственно превращает растворимый белок плазмы фибриноген в нерастворимый фибрин, формирующий полимерную сеть (сгусток), но и участвует в ряде основных обратных связей системы. Таким образом, тромбин является основным регулятором процесса свертывания.

Существующие на данный момент методы диагностики нарушений в системе свертывания могут определить, уровень какого фактора свертывания понижен и насколько [4]. Однако это не всегда дает возможность предсказать степень тяжести кровотечений пациента. Только тест, позволяющий наблюдать за работой всей системы свертывания, сможет дать такой прогноз. Часто используемый параметр при исследовании свертывания — время свертывания — на самом деле во многих случаях нечувствителен к состоянию гиперкоагуляции и слабо выраженном кровотечении [4]. Время свертывания мало чувствительно к антикоагулянтной терапии (например, гепариновой) и действию лекарств [1]. Необходим простой тест, отражающий поведение системы свертывания в целом. Для этой цели было бы удобно использовать генерацию тромбина. Тромбин является центральным звеном гемостаза. В течение своего активного существования тромбин оказывает действие на компоненты крови и стенки сосуда. Концентрация активного тромбина отражает действие как про- так и антикоагулянтов.

Генерация тромбина в гомогенных экспериментах (активатор свертывания рассредоточен по всему объему плазмы) изучена достаточно хорошо [4, 1]. Однако такая ситуация не отражает реальные процессы, происходящие в организме при повреждении стенки сосуда: активация тканевым фактором в мес-

те повреждения, сборка комплексов на поверхности эндотелия и мембранах клеток крови и диффузия активированных факторов свертывания в объем плазмы. Более адекватной в этом случае будет система, в которой существует некоторая поверхность с нанесенным на нее активатором свертывания и соприкасающаяся с ней плазма. В этом случае процессы активации и распространения активных факторов свертывания пространственно разделены. Показано, что явление диффузии в процессе свертывания крови играет существенную, иногда определяющую роль [6]. Однако динамика распределения тромбина с учетом диффузии факторов свертывания до сих пор не была изучена.

Целью данной работы является создание установки для исследования пространственной динамики генерации тромбина и разработка методики проведения эксперимента и обработки данных.

МАТРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты: человеческий α-тромбин (Sigma, США); флуорогенный пептидный субстрат BOC-Ile-Gly-Arg-AMC, где BOC — t-N-бутоксикарбонил, AMC — остаток 4-метил-7-аминокумарина (Институт Биологической и Медицинской Химии РАМН); 4-метил-7-аминокумарин — AMC (Sigma, США); ингибитор фактора XIIa (ингибитор трипсина из зерен кукурузы — КТИ) (Институт белка РАН, Пущино); буфер: 20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0.5 % бычьего альбумина (pH 7.2–7.4). Все остальные реактивы были степени очистки ч. д. а. и х. ч.

Приготовление плазмы. Кровь доноров и пациентов заготавливали на 3.8 % цитратном буфере (pH 5.5), соотношение кровь: цитрат составляло 9:1. После предварительного отделения эритроцитов центрифугированием в течение 20 при 2400g плазму центрифугировали 5 минут при 11000g для удаления тромбоцитов [7]. Сразу после приготовления pH в плазме стабилизировали на уровне 7.2–7.6 путем инкубации в течение часа при 37˚C с молочной кислотой (14 мкл 10 % молочной кислоты на 1 мл плазмы) в условиях контакта с атмосферным воздухом [9].

Плазма хранилась при комнатной температуре в герметичных полистироловых пробирках не более 40 часов после приготовления, при этом было показано, что ее pH не меняется [3].

Для обеспечения в плазме конечной концентрации свободных ионов кальция равной физиологической, в эксперименте рекальцификацию производили 20 мкл 1 М раствора хлорида кальция на 1 мл плазмы. При выбранном методе рекальцификации конечная концентрация свободных ионов кальция была 1.1–1.6 мМ.

Для предотвращения контактной активации в плазму добавляли КТИ (ингибитор контактной фазы) в конечной концентрации — 0.2 мг/мл. Для регистрации тромбина использовался флуорогенный субстрат BOC-Ile-Gly-Arg-AMC. Концентрация субстрата в плазме составляла 400 мМ. Плазму с КТИ и субстратом инкубировали в течение 10 минут при 37˚C.

Культура фибробластов. Для активации свертывания по внешнему пути были использованы монослои экспрессирующих тканевой фактор фибробластов на подложке из полиэтилентерефталатовой пленки (ПЭТ, Институт ядерных исследований, Дубна Московской области). Клеточная линия фибробластов легких эмбриона человека (Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН) культивировались в Институте иммунологии Министерства Здравоохранения России [7]. Плотностью фибробластов на пленках составляла 1000–1500 клеток/мм$^{2.}$

Измерение пространственного распределения тромбина. Исследование генерации тромбина производилось в специально сконструированной полистироловой кювете, размером 60×20×1 мм. В кювету заливалось 250 мкл рекальцифицированной плазмы с субстратом и КТИ. Кювета помещалась в проточный водяной термостат, который поддерживал температуру плазмы 37°C. Сверху в кювету вводился активатор — полистироловая пластинка, обернутая пленкой с фибробластами.

Сбоку камера освещалась десятью ультрафиолетовыми диодами (NIVHIA, максимум излучения на 375 нм), расположенными по кругу и создающими равномерное освещение в той части кюветы, где находится плазма с активатором. Было проверено, что эти диоды не вызывают регистрируемого выгорания AMC как минимум в течение часа. Схема экспериментальной установки изображена на **рис. 1**.

Регистрация флуоресцентного свечения AMC (максимум флуоресценции на 440 нм) осуществлялась цифровой камерой (Sony KX85). При съемке информация с камеры сразу передавалась на компьютер и сохранялась на жесткий диск, работа камеры обеспечивалась с помощью программы Max-

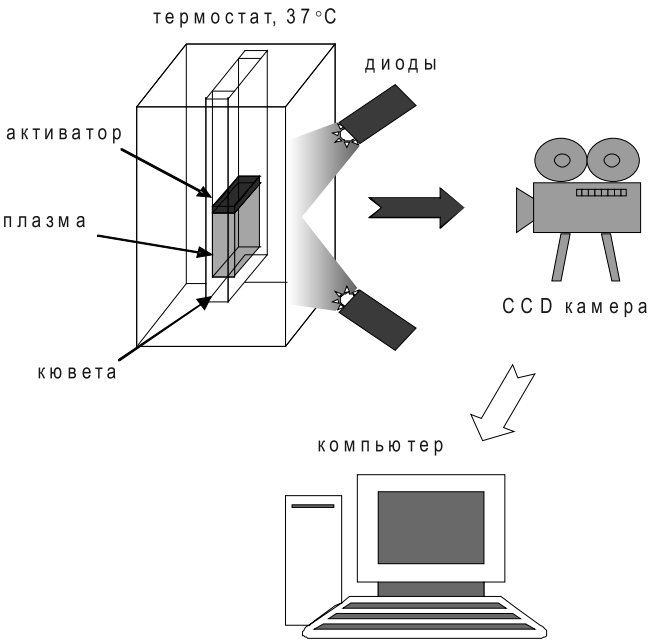


Рис. 1. Схема экспериментальной установки. Прозрачная полистироловая кювета заполнялась плазмой, кювета помещалась в проточный термостат. Сверху вводился активатор свертывания. Кювета сбоку освещалась диодами. При наблюдении за ростом фибринового сгустка использовались красные диоды и регистрировался сигнал светорассеяния, при возбуждении флуоресценции АМС использовались ультрафиолетовые диоды и регистрировался сигнал флуоресценции. Регистрация производилась CCD камерой. Далее информация поступала на компьютер.

Im DL Version 3.10 (Diffraction Limited). Разрешение камеры — 1300×1030 пикселей, интенсивность сигнала кодируется 16-битным числом (16384 градации). В ходе эксперимента на матрицу проецировалось изображение выбранного участка кюветы размером ~13×10 мм (100 пикселей на 1 мм). Камера включалась до введения активатора в плазму, так что можно было зарегистрировать момент активации свертывания.

Тестовые эксперименты. Была произведена калибровка яркости регистрируемого сигнала в зависимости от концентрации добавляемого АМС. Было показано, что в области от 0 до 100 мкМ АМС эта зависимость линейна. Минимальная регистрируемая концентрация составляла примерно 0.15 мкМ АМС.

Для тестовых экспериментов использовался человеческий α-тромбин. Его концентрация была вычислена по методу титрования активных сайтов [8]. В экспериментальную кювету заливался буфер с субстратом и тромбином (в концентрациях 5 нМ и 50 нМ). Далее наблюдалось изменение яркости сигнала от АМС, произведенного в ходе реакции, по которому восстанавливалась концентрация тромбина. Восстановленное в эксперименте распределение тромбина было равномерным по всей рабочей области изображения (где освещение диодами было равномерным) и соответствовало добавляемой концентрации тромбина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В основе используемой методики исследования пространственной генерации тромбина лежит регистрация продукта расщепления заранее помещенного в плазму крови синтетического субстрата тромбином. Метка, высвобождающаяся при протеолизе синтетического субстрата ферментом, в свободном состоянии флуоресцирует при возбуждении определенной длинной волны.

Полученные в эксперименте фотографии отражают изменение флуоресценции АМС в пространстве. На **рис. 2** показаны последовательные фотографии эксперимента. Справа вертикально расположен активатор свертывания, светлые области на изображении — флуоресценция АМС. В диапазоне концентраций АМС от 0 мкМ до 100 мкМ интенсивность свечения пропорциональна концентрации АМС. Для пересчета яркости пикселей в реальную концентрацию АМС в плазме использовалась нормировка — снимались кадры с плазмой с добавлением известной концентрации АМС. Также учитывался фоновый сигнал от камеры с плазмой. Для каждого кадра (момента времени) концентрация АМС рассчитывалась по следующей формуле:

$$\frac{I_{i,j} - I_{i,j}^{fon}}{I_{i,j}^{cal} - I_{i,j}^{fon}} \cdot AMC^{cal} \qquad (1)$$

где $I_{i,j}$ — интенсивность пикселя с координатами (i,j), $I_{i,j}^{fon}$ — интенсивность того же пикселя в первом кадре (фон), $I_{i,j}^{cal}$ — интенсивность того же пикселя в нормировочном кадре, AMC^{cal} — концентрация АМС, использованная для нормировочного кадра.

При обработке изображений предполагалось, что вдоль всей длины активатора образование и распространение АМС происходило равномерно в направлении параллельном активатору. Это позволило перейти от двумерных распределений интенсивности флуоресценции АМС к одномерным на отрезках, проведенных перпендикулярно активатору. При

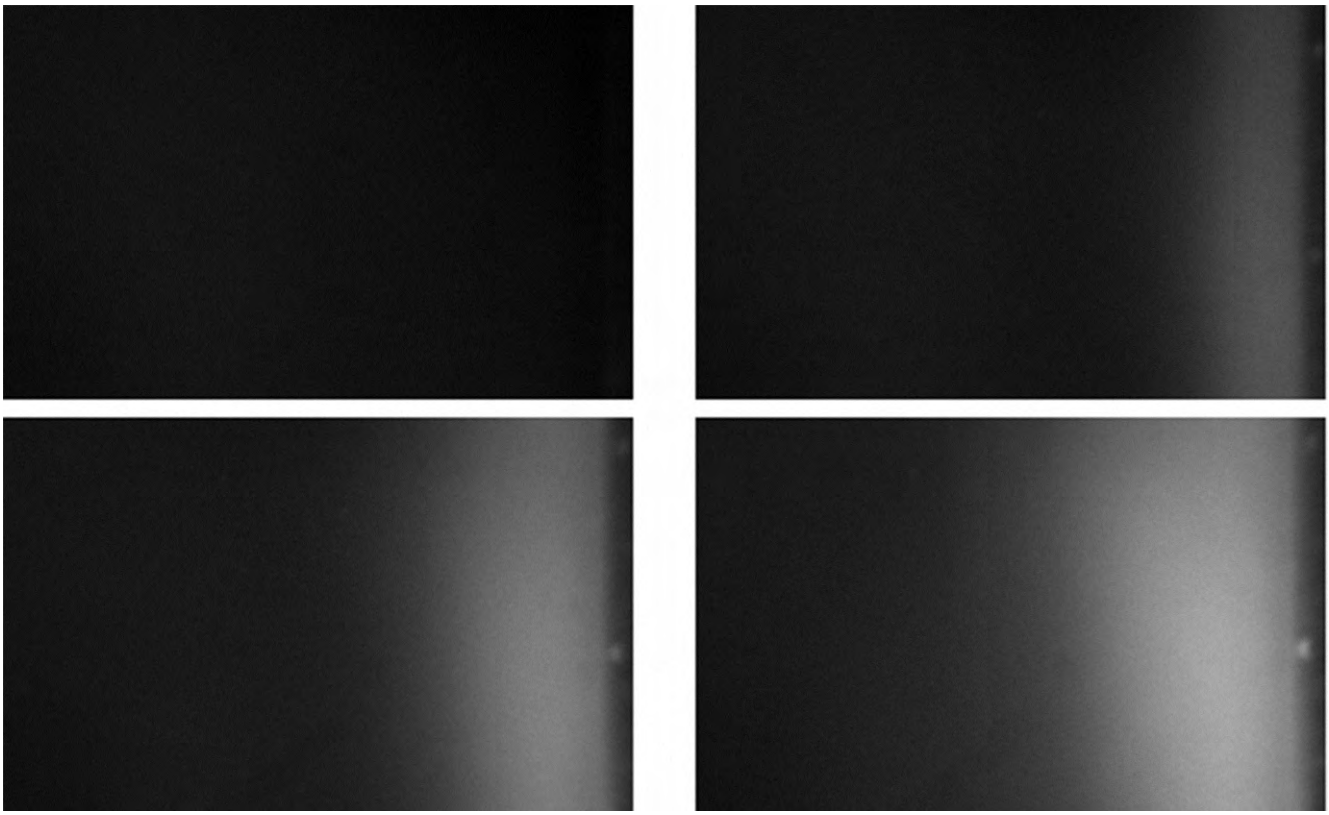


Рис. 2. Фотографии эксперимента по генерации тромбина в плазме крови. Последовательные стадии эксперимента. Светлая область отражает флуоресценцию АМС. Активатор на фотографиях расположен справа, вертикально. Активация осуществлялась монослоем фибробластов. На первом кадре указан масштабный репер.

этом выбиралась полоса шириной 1 мм и длиной 3–4 мм, в рамках которой и проводились дальнейшие расчеты. Для снижения шумов, производилось усреднение значений концентрации АМС внутри полосы в направлении, параллельно активатору.

Таким образом получались профили распределения АМС в различные моменты времени. На **рис. 3А** представлены типичные экспериментальные профили распределения АМС. Видно, что в начальный момент времени АМС отсутствовал по всему объему плазмы, далее он появился в небольшом количестве в приактиваторной зоне. С течением времени концентрация АМС у активатора возрастает, достигая за 30 минут от 30 до 50 мкМ АМС в различных экспериментах. При этом убыль субстрата вследствие его расщепления тромбином в течение всего эксперимента не превышала 10–15 %. Одновременно с этим происходит распространение флуорофора вглубь плазмы на расстояние до 2 мм за время эксперимента (30 минут). Причем это распространение связано не только с диффузией АМС и тромбина от стенки активатора (коэффициенты диффузии 680 мкм^2/сек и 70 мкм^2/сек соответственно). Следовательно, во время эксперимента происходило недиффузное распространение тромбина вглубь плазмы.

На второй этапе обработки сигнала флуоресценции вычислялись профили активности факторов свертывания на основе алгоритма [5]. Распределение АМС в каждый момент времени было обусловлено не только производством его вследствие расщепления субстрата текущей концентрацией фермента, но и диффузионным размытием профиля, предыдущего по времени. Также учитывается убыль субстрата вследствие его расщепления тромбином и диффузия субстрата. Предполагалось, что скорость производства АМС подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен. Таким образом, мы получили следующую систему дифференциальных уравнений:

$$\frac{\partial AMC(x,t)}{\partial t} = D_{AMC}\frac{\partial^2 AMC(x,t)}{\partial x^2} + V_{AMC}(x,t) \qquad (2)$$

$$\frac{\partial S(x,t)}{\partial t} = D_S\frac{\partial^2 S(x,t)}{\partial x^2} - V_{AMC}(x,t) \qquad (3)$$

$$V_{AMC}(x,t) = k_{cat}\frac{E(x,t)S(x,t)}{K_m + S(x,t)} \quad (4)$$

где *E(x,t)* — концентрация тромбина, *S(x,t)* — концентрация субстрата, *AMC(x,t)* — концентрация АМС и $V_{AMC}(x,t)$ — скорость производства АМС в момент времени *t* на расстоянии *x* от активатора.

Используя известное из эксперимента распределение АМС по пространству и по времени, из уравнения (1) вычисляется скорость производства АМС — V_{AMC}. Зная эту скорость, из уравнения (2) можно определить концентрацию субстрата. Далее, используя формулу Михаэлиса-Ментен, вычисляется концентрация тромбина:

$$E(x,t) = \frac{V_{AMC}(x,t)(K_m + S(x,t))}{S(x,t)k_{cat}} \quad (5)$$

При решении уравнений применялись следующие граничные условия:

$$S(x, t=0) = S_0 \quad (6)$$

$$\frac{\partial S(x, t=0)}{\partial x} = 0 \quad (7)$$

$$S(x=L, t) = S_0 \quad (8)$$

где *L* — длина отрезка, на котором проводилось измерение профиля АМС, $x=0$ — левая граница отрезка, соответствующая поверхности активатора, S_0 — начальная концентрация субстрата. Условие (7) означает непроницаемость левой границы отрезка (там расположен активатор) для АМС и субстрата.

Такая система уравнений относится к классу некорректных задач вычислительной математики, решение которых сильно зависит от погрешностей входных данных [10]. Незначительные погрешности измерения профилей АМС в эксперименте могут привести к существенному искажению восстановленных профилей тромбина. Таким образом, огромное значение для восстановления распределения тромбина имеет подбор адекватного метода фильтрации шума в экспериментальных профилях АМС.

Было использовано два метода подавления шумов — цифровая фильтрация с конечной импульсной характеристикой (КИХ) нижних частот и полиномиальная аппроксимация. Аппроксимация полиномами 8-ой степени и выше (вплоть до 11-ой) приводила к существенному размытию модельных профилей. Было решено применить КИХ фильтр нижних частот. Обработка экспериментальных данных по распределению АМС и вычисление распределения тромбина было выполнена программой, созданной в нашей лаборатории (программа реализована на языке C^{++}). Однако при вычислении тромбина не удалось избавиться от артефактов в приактиваторной области (до 0.1 мм от активатора) и перед фронтом распространения тромбина. Тем не менее, это не отменяет достоверности полученного распределения тромбина на свободной от артефактов области.

На **рис. 3Б** представлены характерные профили распределения тромбина в различные моменты времени, вычисленные из экспериментальных профилей АМС. Профили тромбина имеют вид бегущего плато величиной около 60 нМ. В начальный момент времени весь тромбин был сосредоточен вблизи активатора, и его величина составляла около от 80 нМ до 110 нМ в различных экспериментах. Затем от этого пика начало отделяться плато, которое удалялось примерно на 0.8–1.0 мм от активатора за 30 минут с начала эксперимента. По мере удаления фронта распространения тромбина в приактиваторной зоне концентрация тромбина снизилась до уровня плато.

Экспериментальная установка позволяет также регистрировать рост фибринового сгустка по сигналу светорассеяния. При этом в качестве источника света используются красные диоды (длина волны 660 нм), расположенные относительно экспериментальной кюветы аналогично УФ-диодам (см. рис. 1.). Сам эксперимент проходил так же, как и эксперимент с регистрацией АМС, исключая добавление в плазму субстрата. В процессе обработки изображений из значения каждого пикселя для каждого кадра вычитали значение соответствующего пикселя фонового кадра. Здесь не была проведена калибровка интенсивности светорассеяния по известным концентрациям фибрина. Было показано, что максимальная интенсивность светорассеяния в растущем сгустке зависит от концентрации фибриногена (в диапазоне 5–90 %) почти линейно [6].

Типичные профили сгустка представлены на **рис. 3В**. В динамике роста сгустка можно выделить две стадии. На первой стадии происходит увеличение интенсивности светорассеяния и расширение рассеивающей области до 0.3–0.5 мм от активатора. Далее формируется фронт светорассеяния, который распространяется вглубь плазмы, практически не меняя своей формы. Мы считали, что сгусток образуется в данной точке при достижении по-

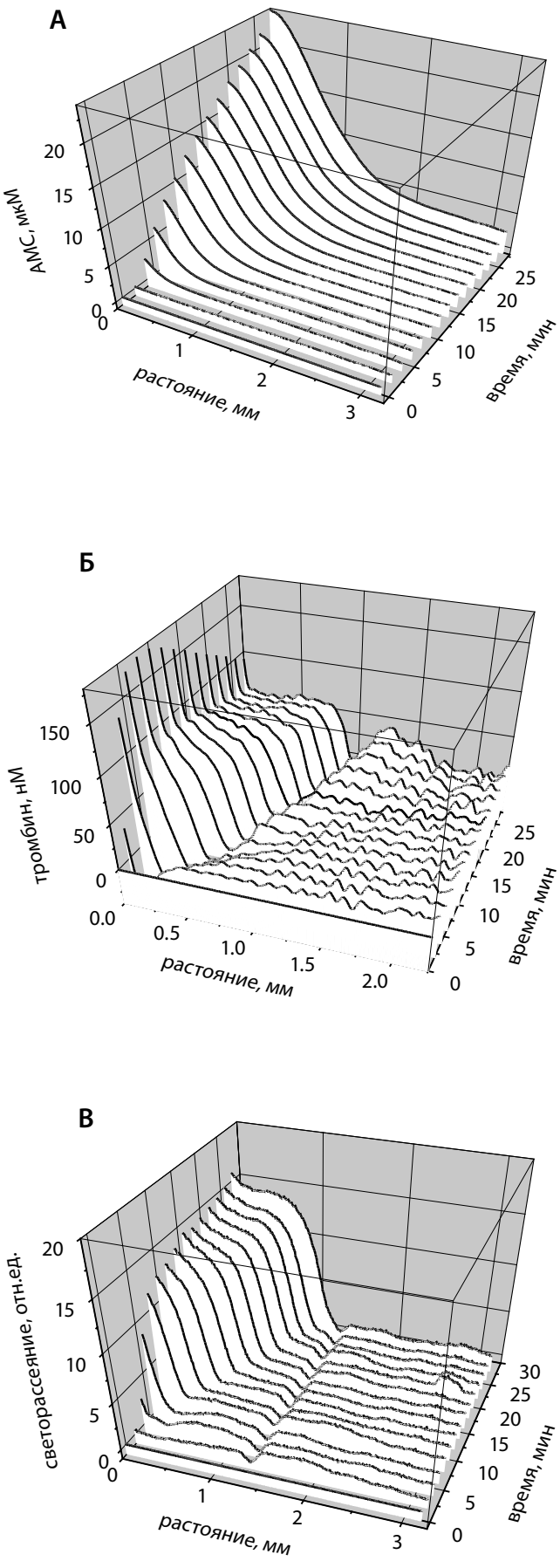


Рис. 3. Восстановление пространственной динамики образования тромбина и рост фибринового сгустка в свободной от тромбоцитов плазме. Активация осуществлялась монослоем фибробластов. Время проведения эксперимента составляло 30 минут. Показаны профили с интервалом 2 минуты. По оси x отложено расстояние от активатора, по оси y – время от начала эксперимента.

А — Экспериментальные профили АМС. По оси z отложена концентрация АМС.

Б — Восстановленные профили тромбина. По оси z отложена концентрация тромбина.

В — Динамика изменения светорассеяния в процессе формирования сгустка. По оси z отложена интенсивность рассеянного света (в относительных единицах).

ловины от максимальной интенсивности светорассеяния. Таким образом, через пол часа с начала эксперимента размер сгустка составлял около 1 мм. Это согласуется с экспериментальными данными по распределению тромбина.

Диагностический аппарат, созданный на основе разрабатываемой технологии может позволить быстро (в течение 1–2 часов) и недорого проводить исследование системы свертывания пациентов. Это поможет оперативно принимать решения о методе лечения.

Работа была частично поддержана грантами № 06–04–48426 и 05–01–22001 Российского фонда фундаментальных исследований.

Мы хотели бы выразить глубокую признательность Ф. И. Алауллаханову за руководство и поддержку данного исследования, М. А. Пантелееву и М. В. Ованесову за ценные консультации, Н. М. Дашкевич за предоставленные материалы.

ВЫВОДЫ

1. Был создан программно-аппаратный комплекс, позволяющий проводить пространственные исследования генерации тромбина в процессе свертывания плазмы крови.
2. В ходе проведенных экспериментов были получены зависимости концентрации АМС от расстояния от активатора в различные моменты времени. Показано, что максимальная концентрация АМС наблюдается вблизи активатора

свертывания. За время эксперимента АМС распространяется вглубь плазмы на расстояние около 2 мм.

3. Получены данные по распределению тромбина в процессе свертывания плазмы. Наблюдалось распространение тромбина от активатора вглубь плазмы в виде бегущего плато высотой около 60 нМ. Фронт тромбина распространяется на расстояние 0.8–1.0 мм за 30 минут с начала эксперимента.

ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. Thromb Haemost. 2001, Oct, 86 (4): 959–72.*
2. *Dieri R. A., Alban S., Beguin S., Hemke H. C.. Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2004, 2: 1395–1401.*
3. *Heil W, Grunewald R, Amend M, Heins M Influence of time and temperature on coagulation analytes in stored plasma. Clin Chem Lab Med. 1998, Jun, 36 (7): 459–62.*
4. *Hemker HC, Beguin S Phenotyping the clotting system. Thromb Haemost. 2000, Nov, 84 (5): 747–51.*
5. *Kondratovich AY, Pokhilko AV, Ataullakhanov FI Spatiotemporal dynamics of contact activation factors of blood coagulation. Biochim Biophys Acta. 2002, Jan 15, 1569 (1–3): 86–104.*
6. *Ovanesov M. V., Ananyeva N. M., Panteleev M. A. et al. Initiation and propagation of coagulation from tissue factor-bearing cell monolayers to plasma: initiator cells do not regulate spatial growth rate. Journal of thrombosis and haemostasis, 2005, 3: 321–331.*
7. *Ovanesov M. V., Krasotkina J. V., Ul'yanova L. I. et al. Hemophilia A and B are associated with abnormal spatial dynamics of clot growth. Accepted by Biochimica et Biophysica Acta, 2002.*
8. *Ramjee, M The use of fluorogenic substrates to monitor thrombin generation for the analysis of plasma and whole blood coagulation. Anal. Biochem. 2000, 277: 11–18.*
9. *Sinauridze E. I., Volkova R. I., Krasotkina Y. V. et al. Dynamics of clot growth induced by thrombin diffusing into nonstirred citrate human plasma. Biochim Biophys Acta. 1998, Nov 27, 1425 (3): 607–16.*
10. *Федоренко РП. Введение в вычислительную физику. М. Издательство МФТИ. 1994.*

Уважаемый коллега!

С 2006 года подписаться на журнал **«Тромбоз, гемостаз и реология»** возможно по каталогу **Роспечать «Журналы России»**.

Индекс для индивидуальных подписчиков — **18362**, индекс для организаций — **18363**.

Также Вы можете оформить **прямую редакционную подписку** на журнал **«Тромбоз, гемостаз и реология»** на 2007 год. Для этого достаточно заполнить размещенный здесь бланк заказа и произвести оплату.

Стоимость подписки на все номера 2007 года (по одному экземпляру №№ 1–4) составляет 500 руб.

Заполните Доставочную карточку и пришлите вместе с квитанцией об оплате письмом по адресу:
Лаборатория экспресс-диагностики РНЦХ РАМН. Россия 119992 Москва, Абрикосовский пер., 2
Свой адрес пишите, пожалуйста, подробно и разборчиво.
В стоимость подписки включена доставка.

Подписка для организаций

Стоимость подписки для организаций составляет 6 000 руб.
Оплата подписки для организаций производится на основании счета. Для этого заполните Доставочную карточку и пришлите ее письмом по адресу:
Лаборатория экспресс-диагностики РНЦХ РАМН. Россия 119992 Москва, Абрикосовский пер., 2
В Доставочной карточке просим Вас подробно и разборчиво указать **1)** Название организации; **2)** Ф.И.О. контактного лица; **3)** номер факса организации, по которому будет выслана копия счета; и **4)** почтовый адрес организации, по которому будет выслан оригинал счета.
При подписке на меньшее число номеров журнала за 2005 год, стоимость одного экземпляра составляет 200 руб.
В стоимость подписки включена доставка.

ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА

				ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА
	пв	место	литер	НА ЖУРНАЛ — ПИ № 779636
	«Тромбоз, гемостаз и реология»			
	ПОДПИСКА на 2007 год			

Куда	Индекс, адрес
Кому	Фамилия, инициалы
Оплата 500 руб. произведена	Дата

РЕДАКЦИОННАЯ ПОДПИСКА

Извещение

ООО «Гемостаз и реология»
получатель платежа

ИНН получателя платежа 7714216791

расчетный счет № 40702810600010000962

в ОАО «Банк Москвы», г.Москва

кор. счет № 30101810500000000219

БИК 044525219

Вид платежа	Сумма
Подписка на «Тромбоз, гемостаз и реология» на 2007 г.	
Всего	

Кассир

Дата _____ Плательщик _____

Квитанция

ООО «Гемостаз и реология»
получатель платежа

ИНН получателя платежа 7714216791

расчетный счет № 40702810600010000962

в ОАО «Банк Москвы», г.Москва

кор. счет № 30101810500000000219

БИК 044525219

Вид платежа	Сумма
Подписка на «Тромбоз, гемостаз и реология» на 2007 г.	
Всего	

Кассир

Дата _____ Плательщик _____

Уважаемый коллега!

С 2003 года журнал «Тромбоз, гемостаз и реология»

РЕФЕРИРУЕТСЯ

Всероссийским Институтом Научной и Технической Информации (ВИНИТИ)

Журнал внесен в отечественные и зарубежные базы данных,
что увеличивает цитируемость статей
и индекс цитируемости их авторов.

Ждем Ваших публикаций!

Редакция.

РЕДАКЦИОННАЯ ПОДПИСКА

Информация о плательщике

(Ф.И.О., адрес плательщика)

(ИНН)

Информация о плательщике

(Ф.И.О., адрес плательщика)

(ИНН)