

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук

На правах рукописи

Серёгина Елена Александровна

**Биофизические механизмы нарушения свертывания при
гемолитических анемиях и остром лимфобластном лейкозе**

Специальность 03.01.02 - биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук,
профессор Атауллаханов Ф.И.

Москва, 2020

Оглавление

Введение.....	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	17
1.1. Система гемостаза.....	17
1.1.1. Плазменное звено системы свертывания крови.....	19
1.1.2. Образование тромбина. Петли положительной и отрицательной обратной связи	25
1.1.3. Ингибиторы свертывания	27
1.1.4. Маркеры эндотелиальной дисфункции	29
1.1.5. Функции и прокоагулянтные свойства микровезикул.....	30
1.2. Нарушения свертывания при гемолитических анемиях.....	32
1.3. Нарушения свертывания при остром лимфобластном лейкозе.....	41
1.4. Постановка задачи.....	47
ГЛАВА 2. Материалы и методы.....	49
2.1. Методы диагностики состояния системы свертывания крови.....	49
2.1.1. Стандартные тесты гемостаза: тесты времен свертывания.....	49
2.1.2. Тромбоэластография.....	50
2.1.3. Тест генерации тромбина.....	52
2.1.4. Метод тромбодинамика.....	53
2.1.5. Метод проточной цитометрии.....	55
2.1.6. Метод иммуноферментного анализа.....	56
2.2. Материалы.....	57
2.3. Пациенты	58
2.4. Подготовка плазмы крови.....	58
2.4.1. Протокол получения микровезикул.....	59
2.4.2. Протокол окрашивания и оценки концентрации микровезикул методом проточной цитометрии.....	60
2.5. Статистическая обработка результатов.....	63

ГЛАВА 3. Результаты и обсуждения.....	64
3.1 Пациенты и клинические характеристики.....	64
3.1.1. Пациенты с гемолитической анемией и контрольная группа в исследовании влияния микровезикул на гиперкоагуляцию.....	64
3.1.2. Взрослые пациенты с гемолитической анемией.....	64
3.1.3. Пациенты детского возраста с гемолитической анемией.....	65
3.1.4. Пациенты с острым лимфобластным лейкозом.....	66
3.2. Контрольная группа и нормы.....	66
3.3. Дизайн исследования.....	67
3.3.1. Дизайн исследования пациента с β -талассемией и последующим тромбозом.....	67
3.3.2. Дизайн исследования пациентов с ПНГ.....	68
3.3.3. Дизайн исследования пациентов с ОЛЛ.....	69
3.4. Тромбодинамика в группах здоровых детей от 1 года до 17 лет.....	70
3.5. Вклад микровезикул в гиперкоагуляцию у пациентов с гемолитическими анемиями.....	74
3.5.1. Количественный вклад микровезикул в гиперкоагуляцию у пациентов с гемолитической анемией.....	75
3.5.2. Качественные характеристики микровезикул у пациентов с гемолитической анемией и у здоровых добровольцев.....	79
3.6. Состояние системы гемостаза у взрослых пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией на терапии экулизумабом.....	83
3.7. Система гемостаза у пациентов с β -талассемией.....	89
3.7.1. Биофизические методы предсказания риска тромбоза у взрослого пациента с большой формой β -талассемии.....	89
3.7.2. Прогностические гиперкоагуляционные риски у пациентов детского возраста с β -талассемией.....	94
3.8. Состояние системы гемостаза у пациентов детского возраста с	

наследственным сфероцитозом.....	98
3.9. Оценка автоволнового процесса свертывания крови позволяет выделить группы повышенного риска тромбоза среди пациентов с острым лимфобластным лейкозом.....	103
Заключение.....	112
Выводы.....	118
Список цитированной литературы.....	119
Список сокращений и обозначений.....	144
Благодарности.....	146

Введение

Свертывание крови представляет собой сложную систему ферментативных реакций. Остановка кровотечений, предотвращение и лечение тромбозов является одной из массовых проблем в медицине, так как любое вмешательство в каскад свертывания крови часто приводит к смещению во многих звеньях этой системы. Осложнения, связанные с системой гемостаза, возникают при различных заболеваниях, начиная от наследственных заболеваний крови, и заканчивая нарушениями свертывания на фоне проводимого лечения основного заболевания, которое, казалось бы, не является напрямую завязанным на гемостатическую функцию организма. Таким образом, правильная диагностика состояния гемостаза является одной из важнейших задач клиницистов.

В настоящее время существует большое количество различных тестов, большая часть которых характеризует отдельные компоненты системы гемостаза или состояние отдельных ступеней свертывания. К сожалению, каждый из этих тестов в отдельности ничего не говорит о состоянии системы свертывания в целом. Чтобы охарактеризовать это состояние современная диагностика использует так называемые глобальные тесты, которые оценивают результат свертывания в целом при тех конкретных условиях, которые существуют у данного пациента. Число таких тестов на сегодняшний день очень ограничено. Наиболее известными из них являются тромбоэластография (ТЭГ) [1–3], тест генерации тромбина (ТГТ) [4] и новый тест тромбодинамики (ТД), возможности которого для анализа состояния гемостаза у пациентов с различными патологиями сейчас широко исследуются [5–7].

Современные диагностические методы малочувствительны к активации свертывания [8,9]. Большинство клоттинговых тестов направлено на выявление, прежде всего, гипокоагуляции. Они проводятся в условиях

максимальной активации свертывания, поэтому не могут регистрировать гиперкоагуляцию, возникающую в системе. О гиперкоагуляции и тромбообразовании свидетельствует повышение концентрации в плазме крови D-димеров [8,10], однако этот тест неспецифичен и отражает уже состоявшееся тромбообразование.

Корректная оценка функционального состояния гемостаза необходима не только при гиперкоагуляции, но и в других случаях. Так известно, что в системе свертывания происходят изменения, связанные с возрастом. Концентрация некоторых факторов и ингибиторов свертывания меняется с рождения по мере взросления [11,12], однако на сегодняшний день нет четкого ответа на вопрос, меняется ли с возрастом функциональное поведение системы гемостаза в целом.

Актуальность работы

Огромный клинический опыт оценки состояния гемостаза классическими тестами, которые формируют коагулограмму, все больше приводит к пониманию того, что весь этот набор тестов мало чувствителен к тому, что происходит в кровотоке пациента. Исследования последних лет позволили понять, в чем причина этого: казалось бы, сегодня известны все биохимические реакции системы свертывания и активность практически всех этих факторов может измеряться стандартными тестами. Оказалось, что дело в биофизических особенностях системы. Процесс свертывания происходит в три этапа: свертывание начинается в зоне поврежденного эндотелия, где протекают одни биохимические реакции – реакции связанные с тканевым фактором. Эти реакции запускают второй, автоволновой этап – рост сгустка, где работают, в основном, реакции внутреннего пути свертывания, и, наконец, процесс роста прекращается в результате формирования на поверхности тромба слоя предельно

активированных тромбоцитов – прокоагулянтных [13]. В ходе второго и третьего этапов огромную роль играют микровезикулы. Дело в том, что скорость-определяющими стадиями на этих двух этапах является образование прокоагулянтных комплексов активных факторов – X, IX и II с их кофакторами и антикоагулянтного комплекса – протеина С с тромбомодулином [14]. Для сборки всех этих комплексов необходимы фосфолипидные поверхности со специальным набором зарядов. Важнейшим фосфолипидом для сборки таких комплексов является фосфатидилсерин с его уникальным сочетанием положительного и отрицательного зарядов на сериновом остатке. Источником таких поверхностей являются разные клетки. В норме – это, в основном везикулы, которые образуются при терминальной активации тромбоцитов и их везикуляции [15]. При анемиях это могут быть везикулы, возникающие при гемолизе эритроцитов.

Однако чтобы оценить потенциальную способность крови свертываться нормально или патологично, недостаточно просто измерить концентрацию везикул в крови или даже оценить долю фосфатидилсерин-положительных или каких-либо других субпопуляций везикул. Взвешенную и чувствительную оценку всех стадий процесса дают только глобальные тесты гемостаза, в которых процесс свертывания практически имитирует все стадии процесса тромбообразования. Поэтому глобальные тесты гемостаза, такие как ТЭГ и ТГТ, все чаще используются в клинической практике. Наиболее близко имитирует ситуацию *in vivo* тромбодинамика (ТД) [16]. В исследуемой плазме образование фибринового сгустка запускается контактом со специальной биоинженерно созданной поверхностью, покрытой определенным составом фосфолипидов и тканевым фактором. Эта поверхность имитирует область сосуда, в которой поврежден эндотелий и кровь вступила в контакт с основными активаторами свертывания. Далее регистрируется распространение фронта фибринового сгустка. Набор

регистрируемых параметров, таких как скорость автоволнового роста сгустка, время задержки роста сгустка, дают чувствительную объективизацию этого сложного биофизического процесса. Многочисленные исследования нашей и других лабораторий в мире показали, что получаемая информация не сводится к комбинаторике тестов гемостаза, и дает более чувствительную и объективную оценку состояния системы.

Тромботические осложнения у детей встречаются в общей популяции довольно редко (0,0007%) [17], однако есть заболевания, при которых этот риск возрастает в несколько раз. Так существует группа патологий, объединенных единым симптомом - гемолизом эритроцитов. Эти заболевания получили общее название - гемолитические анемии. Со стороны системы гемостаза гемолитические анемии характеризуются состоянием гиперкоагуляции [18–20].

Клиника этих заболеваний разнообразна у детей и взрослых, но их объединяет наличие высокого тромботического риска (в 25 раз выше, чем в общей популяции). Тромбозы являются одной из основных причин смерти при тяжелых формах гемолитических анемий [20–30]. Однако до сих пор точная этиология повышенного тромботического риска у пациентов с гемолитическими анемиями остается мало изученной [20–22,24–27].

Механизм активации свертывания, вероятно, многофакторный: циркулирующие в крови прокоагулянтные микрочастицы, образующиеся при лизисе эритроцитов, активация тромбоцитов, эндотелиальная дисфункция, хронический гипофибринолиз, понижение концентрации NO могут способствовать гиперкоагуляции [18,20–35].

Известно, что глобальные тесты свертывания, такие как ТЭГ, ТГТ и ТД выявляют гиперкоагуляцию, ТЭГ и ТГТ показали свою чувствительность при тяжелых формах гемолитической анемии.

Гиперкоагуляция, согласно ТЭГ, часто наблюдается у больных с серповидно-клеточной анемией [36,37]. Аналогичные результаты получены и в исследованиях, проведенных с помощью ТГТ [38,39]. ТД ранее использовался при изучении нарушений свертывания при гемофилиях А и Б [5,40], у пациентов с сепсисом и септическим шоком [6], а также другими врожденными и приобретенными нарушениями свертывания [7,41]. Полученные ранее результаты позволяют предполагать, что ТД может быть чувствителен к гиперкоагуляционным изменениям гемостаза, однако данные о применении этого метода для диагностики нарушений свертывания у больных с гемолитическими анемиями и ОЛЛ отсутствуют. Из-за немногочисленности этих данных, сделать однозначный вывод о возможности использования глобальных тестов для мониторинга системы гемостаза при гемолитических анемиях и ОЛЛ невозможно.

Еще одним заболеванием, сопровождающимся состоянием гиперкоагуляции является острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ). Известно, что пациенты детского возраста с диагнозом ОЛЛ имеют риск развития симптоматического тромбоза до 36% [42], который, однако, больше связывают с терапией, чем с основным заболеванием. Множество тромбозов при ОЛЛ является асимптоматическими и их частота достигает 73% [43], что затрудняет своевременную оценку риска и изменение тактики терапии, и может привести к более серьезным осложнениям.

Это делает актуальным исследование гемостаза глобальными методами для проверки их возможности своевременно оценить состояние системы гемостаза пациентов (взрослых и детей) гематологического и онкогематологического профиля, что может позволить регулировать у них возникновение и последствия жизнеугрожающих тромботических осложнений.

Цель работы

Цель работы - исследование изменения системы свертывания крови у пациентов с гемолитическими анемиями, а также у пациентов с ОЛЛ; изучение механизмов влияния микровезикул на развитие гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями на модели пространственной динамики роста сгустка.

Задачи исследования

1. Исследовать характеристики и общее состояние системы свертывания крови у пациентов с гемолитическими анемиями, используя максимально полный набор современных методов.
2. Сравнить концентрации микровезикул у пациентов с гемолитической анемией и у здоровых доноров методом проточной цитометрии и оценить вклад микровезикул в гиперкоагуляцию, наблюдаемую у пациентов с гемолитическими анемиями.
3. Оценить, есть ли качественные различия в прокоагулянтных свойствах микровезикул у пациентов с гемолитической анемией и у здоровых доноров.
4. Исследовать изменения гемостаза и пространственной динамики роста сгустка у пациентов детского возраста с ОЛЛ на фоне специфической терапии.
5. Разработать интегральный показатель, позволяющий прогнозировать вероятность тромботических осложнений у пациентов с ОЛЛ и с гемолитическими анемиями.

Научная новизна

1. Впервые показано, что в основе развития гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями лежит увеличение количества

прокоагулянтных микровезикул, при этом их свойства значимо не отличаются от свойств микровезикул, выделенных из крови здоровых добровольцев.

2. Проведено систематическое сравнение показателей стандартной коагулограммы и интегральных показателей, а также клинической картины пациентов, в результате чего наиболее оптимальными признаны интегральные тесты, адекватно регистрирующие развитие гиперкоагуляции, в первую очередь, за счет скорости роста фибринового сгустка.
3. Разработан новый интегральный показатель для оценки риска реальных тромботических осложнений у детей с ОЛЛ, получающих терапию по протоколу ALL-MB-2015.

Научно-практическое значение

Состояние системы гемостаза у детей было исследовано с точки зрения концентраций белков системы свертывания крови и стандартных скрининговых тестов системы гемостаза, которые не отражают всю совокупность сложного каскадного процесса свертывания крови. Интегральный метод исследования системы свертывания крови – ТД – был создан для регистрации основных характеристик системы свертывания, таких как скорость роста фибринового сгустка, а также скорость и амплитуда автоволны тромбина – ключевого фактора плазменного звена свертывания, что позволяет оценить вклад всех подсистем системы свертывания крови в процесс тромбообразования. В работе показано, что известные 5-10% изменения в концентрации естественных про- и антикоагулянтных факторов, не вносят глобальных изменений в общую работу системы гемостаза у детей от 1 года до 18 лет.

Тромботические осложнения, являясь одной из основных причин смерти при гемолитических анемиях [20-30], не поддаются детекции обычными методами пока они не переходят в жизнеугрожающие. В работе впервые показано, что интегральные тесты гемостаза чувствительны к развитию гиперкоагуляции у детей и у взрослых пациентов с гемолитическими анемиями, приводящими к клиническому тромбозу. Обнаружено, что гиперкоагуляция развивается еще в детском возрасте в моменты обострения заболевания и связана с резким увеличением концентрации микровезикул.

Тромбозы при ОЛЛ у детей являются серьезным осложнением, приводящим к задержке в лечении основного заболевания и ухудшению прогноза выздоровления. В работе впервые показано, что независимо от концентрации естественных антикоагулянтов, гиперкоагуляция, выявленная методом ТД по скорости распространения автоволны генерации фибрина, напрямую связана с развитием симптоматического тромбоза у пациентов детского возраста с ОЛЛ при условии одновременного нарушения лизиса фибринового сгустка (т.е. при отсутствии повышения маркера этого лизиса - Д-димера).

Возможность выявлять склонность к тромбозам по биофизическим характеристикам свертывания крови с помощью глобальных тестов гемостаза, позволяет широко применять эти методы как для проведения оценки состояния системы гемостаза у пациентов со склонностью к тромбообразованию, так и для изучения действия препаратов, воздействующих на свертывание крови.

Методология и методы исследования

Методология работы была подчинена основной цели исследования и решению поставленных задач. Исследуемые образцы плазмы, полученные

от пациентов с гемолитическими анемиями, с ОЛЛ и у здоровых добровольцев максимально были охарактеризованы с использованием традиционных методов и методов интегральной оценки гемостаза. Следующий задачей было сравнение концентраций прокоагулянтных микровезикул у пациентов и здоровых добровольцев, т.к. нами сделано предположение, что свободные фосфолипидные поверхности вносят вклад в развитие повышенного свертывания у пациентов с гемолизом. Решение этой задачи шло совместно со следующей, в которой оценивались качественные различия в прокоагулянтных свойствах микровезикул у пациентов и у здоровых добровольцев. Характеристику проводили с помощью проточной цитометрии и ТД, где в исследуемой плазме образование фибринового сгустка запускается контактом со специальной биоинженерно созданной поверхностью, покрытой определенным составом фосфолипидов и тканевым фактором. Эта поверхность имитирует область сосуда, в которой поврежден эндотелий и кровь вступила в контакт с основными активаторами свертывания. Далее регистрируется распространение фронта фибринового сгустка. Набор регистрируемых параметров, таких как скорость автоволнового роста сгустка, время задержки роста сгустка, дают чувствительную объективизацию этого сложного биофизического процесса. Многочисленные исследования нашей и других лабораторий в мире показали, что получаемая информация не сводится к комбинаторике тестов гемостаза, и дает более чувствительную и объективную оценку состояния системы. Все полученные результаты были статистически обработаны, в результате чего удалось решить задачу о разработке нового показателя прогнозирования тромботических осложнений у детей с ОЛЛ на фоне терапии.

Положения, выносимые на защиту

1. Традиционные клоттинговые тесты не отражают наличие гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями. Критически важным оказывается нарушение биофизических характеристик процесса, что хорошо отражает метод тромбодинамики, выявляя развитие гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями на фоне гемолитического криза и у пациентов с ОЛЛ.
2. Показано, что одним из главных механизмов гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями является появление большого числа отрицательно заряженных микровезикул в кровотоке.
3. Впервые показано, что прокоагулянтные свойства микровезикул значимо не отличаются у пациентов с гемолизом и у здоровых доноров.
4. Увеличение скорости автоволнового распространения фибрин-полимера при одновременном снижении концентрации антитромбина III и повышении концентрации D-димера отражает риск развития тромботических осложнений у детей с острым лимфобластным лейкозом.

Личный вклад автора

Все работы по получению микровезикул из образцов крови пациентов и добровольцев, работа на проточном цитометре и титровка образцов в ТД, а также эксперименты по исследованию и характеристике системы гемостаза у пациентов и здоровых добровольцев с использованием классических и интегральных тестов, статистическая обработка данных, написание статей и тезисов конференций по материалам диссертации проводились лично автором и при его непосредственном участии.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивались использованием общепринятых современных методов, таких как проточная цитометрия, стандартные тесты коагулограммы, иммуноферментный анализ, интегральные тесты гемостаза, статистическая обработка результатов. Использование аттестованных средств измерения позволило получить результаты с удовлетворительным уровнем точности. Достоверность полученных результатов также подтверждается их согласованностью с известными литературными источниками.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на XXIV Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (Амстердам, Нидерланды, 29 июня - 04 июля 2013), II Российская научно-практическая конференция «Клинические и лабораторные аспекты современной гематологии» (Москва, Россия, 19 - 20 сентября 2013), XIX Всероссийская конференция с международным участием «Тромбозы, Кровоточивость, ДВС-синдром: современные подходы к диагностике и лечению» (Москва, Россия, 15 - 16 сентября 2014 года), 31st EHA-ESH Hematology Tutorial: Focus on Red Cells (plus Pediatric Coagulation) (Рим, Италия, 7 - 9 февраля 2014), VI Межрегиональное совещание НОДГО 4-7 (Москва, Россия, 4 - 7 июня 2015 года), XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Торонто, Канада, 20 - 25 июня 2015), The 10th Congress of the International Society of Paediatric Oncology Asia (SIOP Asia) (Москва, Россия, 25 - 28 мая 2016), Объединенная VIII Всероссийская Конференция по клинической гемостазиологии и гемореологии и III Конгресс по противоречиям в области тромбозов и гемостаза (Москва, Россия, 20 - 22 октября 2016), VIII Межрегиональное

совещание НОДГО (Москва, Россия, 25-28 мая 2017), XXVI Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (Берлин, Германия, 8 июля - 13 июля 2017), IX Всероссийская Конференция по клинической гемостазиологии и гемореологии (Санкт-Петербург, Россия, 4-6 октября 2018), X Конгресс НОДГО (Сочи, Россия, 25-27 апреля 2019), XXVIII Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (виртуальный конгресс, 12 июля - 14 июля 2020).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 работ, в том числе, статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК – 12; патент на изобретение – 1; публикаций в трудах конференций и съездов – 14.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста и включает содержание, введение, литературный обзор и постановка задачи исследования (глава 1), описание материалов и методов (глава 2), результаты и обсуждение (глава 3), заключение, выводы, список цитированной литературы (172 библиографических источников), список сокращений и обозначений и благодарности. Работа содержит 27 рисунков и 10 таблиц.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Система гемостаза

Система гемостаза или система свертывания крови - это очень важная и сложная система в организме человека, выполняющая ряд функций. В первую очередь эти функции включают в себя остановку кровотечений после травмы, повреждения сосуда. Физиологическая функция гемостаза также включает в себя поддержание крови в состоянии жидкости и предупреждение кровопотери [44]. Система гемостаза включает в себя стенки сосудов, клетки крови (тромбоциты, эритроциты, лейкоциты), белки свертывания крови и естественные антикоагулянты, а также компоненты системы фибринолиза [44–46]. Гемостаз принято разделять на сосудисто-тромбоцитарный (первичный) и коагуляционный или плазменный (вторичный) гемостаз. Первичная активность гемостаза запускается сразу после разрушения сосуда в течение 1-3 минут. Вторичный гемостаз запускается позже первичного, обычно это занимает около 10 минут [46–48].

Первичный гемостаз после повреждения сосуда запускается с вазоконстрикции (сжатия сосудистой стенки). Вазоконстрикция и вазодилатация (расслабление сосудистой стенки) происходят не только при повреждении, но и в нормальных условиях для поддержания нормального уровня давления [44,47]. Эндотелий играет важную роль в поддержании нормального функционирования системы свертывания, производя большое количество биологически активных веществ, которые участвуют в регуляции сосудистого тонуса, роста клеток, воспаления, тромбоза и гемостаза. Сосудистая стенка в нормальных условиях представляет собой атромбогенную поверхность, но в результате повреждения на ней экспрессируются маркеры и активаторы свертывания, а также открывается доступ к веществам, активирующим и участвующим в

свертывании крови (тканевый фактор, vWF, коллаген, оксид азота, эндотелины, ангиотензин и так далее) [44,45,47].

Следом происходит активация тромбоцитов, в результате они изменяют свою конформацию, образуют псевдоподии. Некоторые активаторы тромбоцитов выделяются из поврежденной сосудистой стенки (коллаген, АДФ, адреналин), другие производят сами тромбоциты (Тромбоксан А₂, АДФ, серотонин) или присутствуют в плазме (тромбин, vWF) [44,46,48,49].

Количество тромбоцитов в норме составляет примерно 180-320 тысяч/мкл. Количественная норма также является важной для поддержания нормального свертывания крови. Диаметр тромбоцитов составляет около 1-4 микрометра, толщина - 0,5-0,75 микрометра. Тромбоциты отшнуровываются из гигантских клеток костного мозга - мегакариоцитов (из одного мегакариоцита может развиваться несколько сотен тромбоцитов). Тромбоциты, циркулируют в крови от 5 до 11 дней и при старении разрушаются в печени, легких, селезенке клетками макрофагальной системы. Основная функция тромбоцитов гемостатическая - тромбоциты не только осуществляют агрегацию и адгезию к поврежденной стенке сосуда, то есть образование первичного тромба, но продуцируют вещества, которые обеспечивают гемостаз (V фактор свертывания, фибриноген, фактор Виллебранда, ионы Ca²⁺, тромбомодулин и др.) [49,50].

У тромбоцитов также есть транспортная функция - это передача ферментов, АДФ, серотонина и др. Отмечено, что у тромбоцитов существует также функция фагоцитоза, что является частью иммунного ответа. Функция регенерации - тромбоциты имеют фактор роста, который способствует росту эндотелиальных и мышечных клеток, присутствующих в стенке сосуда [44,48-50].

Этап сосудисто-тромбоцитарного гемостаза представляет собой примерно следующее:

1. Судорожный спазм сосудов, вызванный катехоламинами и другими ферментами - длительность сосудистого спазма до 1 минуты. Диаметр сосудов уменьшается на $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{3}$. Механизм развития спазма определяется секрецией серотонина и тромбоксана А₂ из тромбоцитов и адреналина из окончаний симпатических нервов.
2. Активация тромбоцитов – изменения цитоскелета, появление псевдоподий, выделение плотных гранул и альфа-гранул, участвующих в гемостазе и процессах восстановления сосудистой стенки.
3. Адгезия тромбоцитов - активация тромбоцитов и прикрепление их к месту дефекта в стенке сосуда.
4. Агрегация тромбоцитов – рост тромбоцитарного тромба с участием vWF и фибриногена.

Далее происходит образование фибринового сгустка (плазменное звено свертывания). Активированные тромбоциты экспонирует прокоагулянтные мембраны, которые являются важным фактором для протекания реакция плазменного каскада свертывания [48–51].

1.1.1. Плазменное звено системы свертывания крови

Плазменное звено свертывания крови принято разделять на 2 каскада свертывания: внутренний путь, который инициируется при контакте между кровью и отрицательно заряженными поверхностями [44,46,52], и внешний путь, который инициируется при повреждении сосудов, что приводит к экспонированию тканевого фактора ТФ (также называемого фактор III), субэндотелиального гликопротеина клеточной поверхности. Эти два пути сходятся при активации фактора X в Xa активный фактор.

Внутренний путь (также называемый путем контактной активации) из литературных данных гораздо менее значителен для гемостаза в

нормальных физиологических условиях, чем внешний путь. Однако описано, что аномальная физиология, такая как гиперлипидемический синдром или тяжелая бактериальная инфекция, может привести к активации тромбоза через собственный внутренний каскад свертывания крови [44–46]. Система формирования плазменного сгустка включает в себя систему контактной активации плазмы (рисунок 1), которая состоит из фактора XII, фактора XI, ПК и ВМК. Фактор XII, ПК и ВМК могут обратимо связываться с эндотелиальными клетками, тромбоцитами и гранулоцитами в цинк-зависимой реакции [53]. Когда плазма вступает в контакт с отрицательно заряженной поверхностью, XII активируется с образованием фактора XIIa («а» означает активированный фактор). Затем фактор XIIa активирует прекалликреин в калликреин, а калликреин расщепляет ВМК, высвобождая брадикинин, мощного сосудорасширяющего средства. Существует также взаимная активация фактора XII калликреином, приводящая к усилению системы, это называется положительной обратной связью. Далее фактором XIIa в присутствии ВМК и ионов Ca^{2+} активируется фактор XI до фактора XIa. В присутствии ионов кальция Ca^{2+} фактор XIa активирует фактор IX до фактора IXa. Фактор IX представляет собой проэнзим, который содержит витаминные К-зависимые γ -карбоксиглутаматные (gla-) остатки, активность сериновой протеазы активируется после связывания Ca^{2+} с этими gla-остатками. Некоторые из сериновых протеаз каскада (II, VII, IX и X) представляют собой gla-содержащие проферменты. Активный фактор IXa расщепляет фактор X на внутренней связи R-I, приводя к его активации в фактор Xa. Активация фактора Xa требует сборки комплекса внутренней теназы (ионы Ca^{2+} и факторов VIIIa, IXa) на фосфолипидной поверхности или поверхности активированных тромбоцитов. Одним из ответов тромбоцитов на активацию является представление фосфатидилсерина (PS^+) и фосфатидилинозитола

(PI+) на их поверхностях, на которой происходят фосфолипидзависимые реакции плазменного звена свертывания. Обнаружение этих фосфолипидов позволяет формировать теназный комплекс. Роль фактора VIII в этом процессе заключается в том, чтобы действовать в качестве кофактора в виде фактора VIIIa для факторов IXa и X [13,45,46,52,52,53].

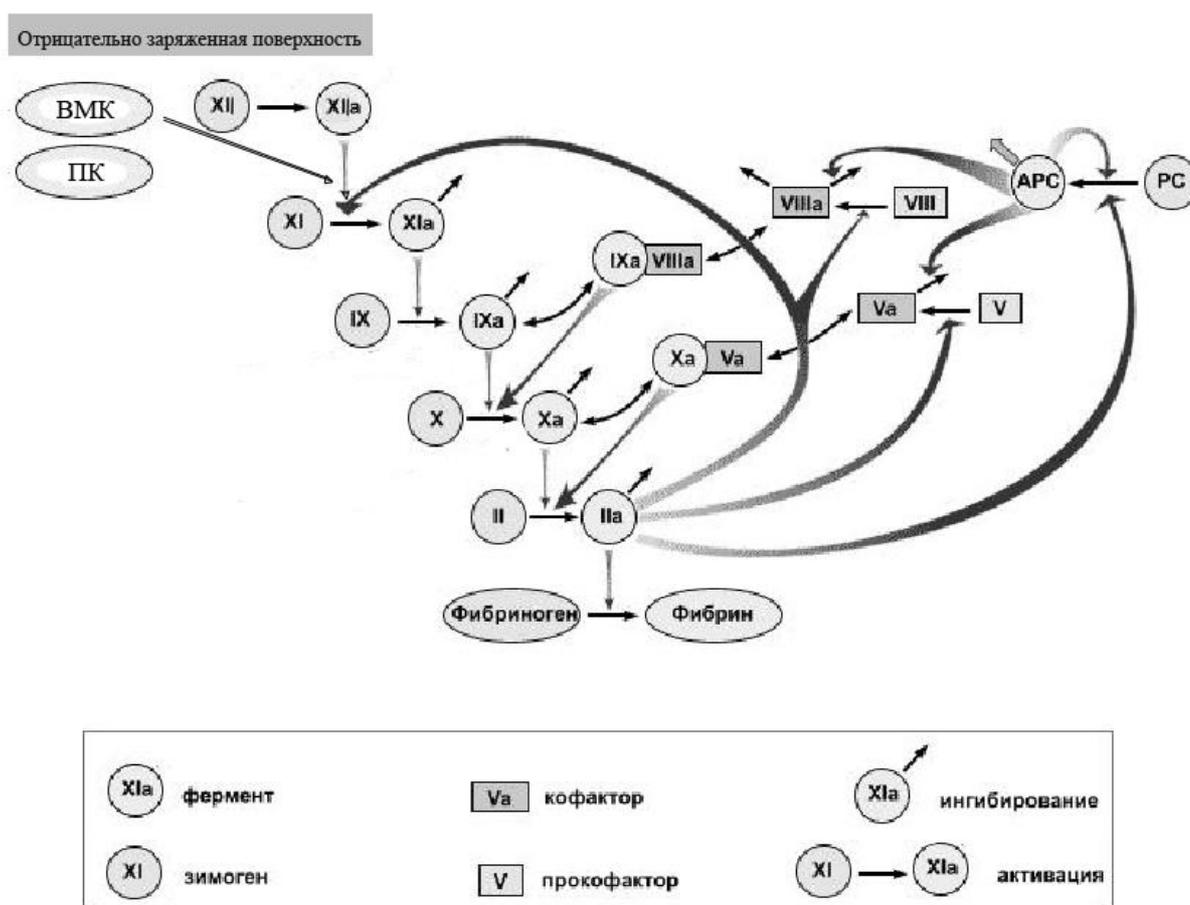


Рисунок 1. Основные реакции внутреннего пути свертывания. Система контактной активации свертывания: ПК - прекалликреин, ВМК – ВМК. Реакции активации факторов свертывания показаны односторонними тонкими черными стрелками; фигурные стрелки показывают, под действием каких именно ферментов происходит эта активация. Обратимые реакции формирования комплексов показаны двусторонними тонкими черными стрелками. Ингибирование показано короткими черными стрелками. На схеме не показаны: связывание тромбина с тромбомодулином, стабилизация фибринового сгустка FXIII. Частично воспроизведено из [46].

Активация фактора VIII до фактора VIIIa (фактического кофактора) происходит в присутствии тромбина. По мере увеличения концентрации тромбина фактор VIIIa, в конечном счете, расщепляется тромбином и инактивируется. Это двойное действие тромбина на фактор VIII приводит к ограничению степени образования теназного комплекса и, следовательно, степени каскада коагуляции, это называется отрицательной обратной связью. Фактическая поверхность, которая приводит к активации фактора XII, неизвестна, однако несколько физиологических веществ поддерживают этот процесс, например, гематин, жирные кислоты, кристаллы урата натрия, протопорфирин, сульфатиды, сульфаты хондроитина, суставной хрящ, эндотоксин, L-гомоцистеин. После активации контактной системы каждый из этих компонентов пути приводит к превращению фактора X (неактивного) в фактор Xa (активный). Инициирование происходит, когда прекалликреин, ВМК, фактор XI и фактор XII подвергаются воздействию отрицательно заряженной поверхности. Это называется контактной фазой и может возникать в результате взаимодействия с фосфолипидами (в первую очередь фосфатидилэтаноламином), циркулирующих частиц липопротеинов, такими как хиломикроны и окисленные ЛПНП. Это является причиной развития тромботических состояний при гиперлипидемии[44–46,51–53].

Контактная активация может также возникать на поверхности бактерий и через взаимодействие с кристаллами урата, жирных кислот, протопорфирина, амилоида β и гомоцистеина [47]. Действительно, повышенные уровни гомоцистеина в крови, как было показано, коррелируют с сердечно-сосудистой дисфункцией.

Внешний путь (рисунок 2) иницируется в месте повреждения в ответ на высвобождение тканевого фактора (фактор III) и, таким образом, также известен как путь тканевого фактора. Тканевой фактор является кофактором

Считается, что формирование комплекса между фактором VIIa и тканевым фактором является основным этапом в общем каскаде свертывания крови.

Доказательства этого проистекают из того факта, что лица с наследственными недостатками в некоторых компонентах контактной фазы внутреннего пути (дефицит XII фактора) не обнаруживают проблем свертывания крови [44–46,51,52].

В конечном итоге фактор Xa расщепляет протромбин (Фактор II), в результате чего образуется тромбин (Фактор IIa), который и запускает реакцию образования мономеров фибрина из фибриногена (фактор I), также тромбин активирует фактор XIIIa, который образует «сшивки» между мономерами фибрина, окончательно стабилизируя фибриновый сгусток [46,52].

Фибриноген (Фактор I) состоит из 3 пар полипептидов ($[\text{A}\alpha][\text{B}\beta][\gamma]$)₂. Шесть цепочек ковалентно связаны вблизи их N-терминальных концов через дисульфидные мостики. Части A и B цепей A α и B β содержат фибринопептиды A и B соответственно. Фибринопептидные области фибриногена содержат несколько глутаматных и аспартатных остатков, приносящих высокий отрицательный заряд в эту область и способствующие растворимости фибриногена в плазме. Активный тромбин представляет собой сериновую протеазу, которая гидролизует фибриноген [13,45,52].

Предотвращение тромбином высвобождения фибринопептидов приводит к образованию мономеров фибрина с субъединичной структурой $(\alpha\beta\gamma)$ ₂. Эти мономеры спонтанно агрегируют в упорядоченную структуру, образуя относительно слабый фибриновый сгусток. В дополнение к активации фибрина тромбин превращает фактор XIII в фактор XIIIa, высокоспецифическую трансклутаминазу, которая вводит поперечные связи, состоящие из ковалентных связей между амидным азотом глутаминов и ϵ -аминогруппой лизинов в мономерах фибрина [45,46,54].

1.1.2. Образования тромбина, петли положительной и отрицательной обратной связи

Общей точкой в обоих путях плазменного звена свертывания является активация фактора X в фактор Xa. Фактор Xa активирует протромбин (фактор II) в тромбин (фактор IIa). Тромбин, в свою очередь, превращает фибриноген в фибрин. Активация тромбина происходит на фосфолипидной поверхности и поверхности активированных тромбоцитов и требует образования протромбиназного комплекса. Этот комплекс состоит из фосфолипидов (PS⁺ и PI⁺), Ca²⁺, факторов Va и Xa и протромбина. Фактор V является кофактором в образовании протромбиназного комплекса, аналогичным по роли фактору VIII в образовании комплекса внутренней теназы. Как активация фактора VIII, фактор V активируется до фактора Va с помощью тромбина и инактивируется с повышением уровня тромбина. Фактор Va связывается с конкретными рецепторами на поверхностях активированных тромбоцитов и образует комплекс с протромбином и фактором Xa. В начале тромбин образуется в основном за счет активных факторов Xa и IXa и их кофакторов Va и VIIIa вблизи повреждения, но затем тромбин начинает активировать VII фактор, превращая его в VIIa, тем самым увеличивая скорость своей наработки за счет протромбиназного комплекса. Кроме того тромбин активирует факторы VIII и V, с помощью чего значительно возрастает скорость наработки активного тромбина. Это называется петлями положительной обратной связи. Ионы кальция служат «мостиками» между отрицательно заряженной фосфолипидной поверхностью и отрицательно заряженным белком, поэтому все реакции внутренней теназы, протромбиназового комплекса с образование тромбина происходят в присутствии ионов кальция Ca²⁺ [46,55–57].

Протромбин представляет собой одноцепочечный белок весом 72кДа, содержащий десять gla-остатков в его N-концевой области. В

протромбиназном комплексе протромбин расщепляется на 2 участка фактором Ха. Это расщепление генерирует 2-цепную активную молекулу тромбина, содержащую А и В-цепь, которые удерживаются вместе одной дисульфидной связью [52,55].

В дополнение к своей роли в активации образования фибринового сгустка тромбин играет важную регуляторную роль в свертывании. Тромбин связывается с тромбомодулином, присутствующим на поверхностях эндотелиальных клеток, образуя комплекс, который превращает протеин С (РС) в активированный протеин С (APC). Кофакторный белок Протеин S (PS) и РС расщепляют факторы Va и VIIIa, тем самым ограничивая активность этих 2 факторов в коагуляционном каскаде, это петля отрицательной обратной связи [13,52,56].

Тромбин связывается с классом рецепторов на тромбоцитах, связанных с G-белком, называемых рецепторами, активируемыми протеиназами (PARs), в частности PAR-1, PAR-3 и PAR-4. PARs представляют уникальный механизм для преобразования результата внеклеточного протеолитического расщепления во внутриклеточное сигнальное событие. Сигнальные каскады, активированные тромбином-PAR, включают выделение интерлейкинов (ILs), IL-1 и IL-6, усиление секреции молекулы межклеточной адгезии-1 и молекулы адгезии сосудистых клеток-1. Сигнал, индуцированный тромбином, также приводит к усилению активации тромбоцитов и адгезии лейкоцитов. На поверхности активированных тромбоцитов тромбин способен активировать фактор XI, который в свою очередь активирует фактор IX, это еще одна петля положительной обратной связи. Таки образом за счет автономной активации V, VII, VIII, XI происходит резкий скачок в скорости генерации активного тромбина. Этот механизм также участвует в распространении сгустка в пространстве. Если диффузия активного фактора Ха мала, так как вдали от

повреждения, он быстро подвергается ингибированию, то за счет активации фактора XI тромбином на расстоянии от места активации свертывания, происходит сборка внутренней теназы (FIXa-FVIIIa) и рост фибринового сгустка в пространство сосуда. Таким образом, наличие петель положительной обратной связи играет большую роль в формировании трехмерной структуры фибринового сгустка [52,56,57].

1.1.3. Ингибиторы свертывания

Неспособность организма контролировать уровень циркулирующего активного тромбина приведет к тяжелым последствиям. Существует два основных механизма, регулирующих активность тромбина. Преобладающей формой тромбина в кровотоке является неактивный протромбин, активация которого требует путей активации описанного выше коагуляционного каскада. На каждом этапе каскада механизмы обратной связи регулируют баланс между активными и неактивными ферментами. Активация тромбина также регулируется 4 специфическими ингибиторами тромбина. Антитромбин III (АТIII) является наиболее важным, так как он также может ингибировать активность факторов IXa, Xa, XIa и XIIa, плазмина и калликреина. Активность АТIII увеличивается в присутствии гепарина: гепарин связывается с определенным сайтом на АТIII, производя изменение в конформации белка, и новая конформация имеет более высокое сродство к тромбину, а также к другим субстратам. Этот эффект гепарина является основой для его клинического применения в качестве антикоагулянта. Естественный активатор гепарина АТIII присутствует как гепарин и гепаринсульфат на поверхности эндотелиальных клеток сосудов. Именно эта функция контролирует активацию внутреннего каскада коагуляции [58–60].

Однако активность тромбина также ингибируется α 2-макрोगлобулином, кофактором II гепарина, и α 1-антитрипсином [45,46,52].

PC представляет собой трипсиноподобную сериновую протеазу, которая также служит в качестве основного регулятора процесса свертывания крови. PS служит кофактором для функций APC. PC подвергается серии посттрансляционных модификаций, которые включают несколько N-связанных сайтов гликозилирования и γ -карбоксилирование девяти глутаматных остатков (gla-остатков) в амино-конце. Эти gla-остатки в амино-конце PC составляют «gla-домен» белка. В дополнение к gla-домену PC содержит две области эпидермального фактора роста, домен сериновой протеазы и активационный пептид. Активация протеина C происходит на поверхности эндотелия, когда тромбин связывается с тромбомодулином, захватывает циркулирующий в крови PC, расщепляет активационный пептид, образуя APC. APC взаимодействует с PS и расщепляет как фактор Va, так и фактор VIIIa в неактивные ферменты. Это приводит к прекращению образования комплекса внутренней теназы и протромбиназного комплекса. Основной целью активации PC в системе свертывания является прекращение дальнейшего увеличения производства тромбина и прекращение, таким образом, образования фибринового сгустка [61,62].

Единственная сериновая протеаза системы свертывания крови, которая не ингибируется АТIII и путем PC, является фактор VIIa. Существует специализированный ингибитор – ингибитор пути тканевого фактора (TFPI). Один из его домен связывается с фактором Xa, в результате чего комплекс способен инактивировать внешнюю теназу TF-FVIIa, это также своеобразная петля отрицательной обратной связи, когда растущая концентрация активного фактора Xa способствует остановке работы внешней теназы, а значит и, как следствие, продукции фактора Xa [50,52,62].

1.1.4. Маркеры эндотелиальной дисфункции

Эндотелий играет важную роль в свертывании крови, в норме он экспонирует на своей поверхности и выделяет в кровоток активаторы и регуляторы системы гемостаза [63]. При поиске причин тромботических состояний в последнее время все больше внимания уделяют маркерам, которые могут говорить об активации, повреждении или риске разрушения эндотелиального слоя сосудов. К этим маркерам относят тромбомодулин, оксид азот NO, тканевый активатор плазминогена, которые отвечают за атромбогенность сосудистой стенки; vWF, ингибиторы активатора плазминогена PAI-1 и PAI-2, которые отвечают за тромбогенность сосудистой стенки при повреждении; регуляторы адгезии лейкоцитов P-селектин и E-селектин; регуляторы сосудистого тонуса эндотелин, NO, ангиотензин II. В качестве основного маркера риска повреждения эндотелиальной выстилки сосудов называют гомоцистеин [63–65].

Человеческий тромбомодулин представляет собой одноцепочечный трансмембранный гликопротеин, состоящий из 557 аминокислотных остатков и содержащий пять внеклеточных доменов, которые участвуют в связи с тромбином, препятствуют связям тромбина с прокоагулянтными факторами и их активации, и способствуют активации протеина С. Таким образом тромбомодулин проявляет свою роль в свертывании в виде антикоагулянтной активности за счет ингибирования тромбина и путем ускорения образования APC. При связывании с тромбомодулином тромбин претерпевает уменьшение его сродства к прокоагулянтным факторам. Тромбомодулин ингибирует большинство прокоагулянтных функций тромбина, включая полимеризацию фибриногена, активацию тромбоцитов и активацию FV. Кроме того, тромбомодулин ускоряет инактивацию тромбина с помощью ингибитора АТIII и Протеина С. ТМ переключает специфичность тромбина на PC. APC усиливается кофактором, протеином

S, и подавляет дальнейшее образование тромбина путем протеолитического расщепления FVa и FVIIIa [63,66,67].

Оксид азота (NO) является многофункциональной эффекторной молекулой, которая играет центральную роль в регуляции гемостатической функции. NO синтезируется из L-аргинина семейством ферментов, называемых NO-синтазами. NO регулирует тонус сосудов, а также этот свободный радикал является мощным ингибитором пролиферации гладкомышечных клеток, миграции и синтеза белков внеклеточного матрикса. NO также может диффундировать в просвет кровеносного сосуда, где он ингибирует адгезию тромбоцитов и лейкоцитов к эндотелиальным клеткам, поддерживая естественные антикоагулянтные свойства крови. Кроме того, NO ингибирует агрегацию тромбоцитов, однако регуляторное действие NO на клетки крови, скорее всего, ограничено, поскольку NO быстро удаляется гемоглобином в эритроцитах и инактивируется радикалами, происходящими из кислорода, такими как супероксидный анион. NO также может влиять на фибринолитическую активность, регулируя высвобождение активатора плазминогена тканевого типа и ингибитора активатора плазминогена-1 [54,63].

1.1.5. Функции и прокоагулянтные свойства микровезикул

Большинство стадий каскада свертывания крови требует сборки комплексов сериновых протеаз, кофакторов белков и субстратов на подходящей поверхности мембраны. В частности, подходящая поверхность должна содержать фосфатидилсерин (PS⁺), который может быть обнаружен на активированных тромбоцитах, микровезикулах (MP) различного происхождения или поврежденных клетках. Плазматическая мембрана нормальных клеток имеет асимметричное распределение липидов во внутренней и внешней мембранах. Анионные фосфолипиды, такие как PS⁺, расположены почти исключительно во внутреннем монослое. Во время

образования MP происходит потеря мембранной асимметрии с ионными фосфолипидами, переносимыми на внешнюю мембрану MP [68]. Важно, что присутствие PS⁺ значительно увеличивает прокоагулянтную активность MP, потому что это облегчает сборку компонентов каскада свертывания крови. Это связано с электростатическим взаимодействием между положительно заряженными доменами γ -карбоксихлутаминовой кислоты (GLA) в свертывающих белках и PS⁺ на мембране. Свертывающие белки, которые содержат домен GLA, включают факторы VII (FVII), IX и X и протромбин. PS⁺ на поверхности MP можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. Активированные тромбоциты одни из главных клеток, которые генерируют PS⁺ MP в процессе свертывания, хотя PS⁺ обнаруживается на многих других микровезикулах [69]. Мембранное связывание белков свертывания крови имеет важное значение, поскольку высвобождение их из мембраны снижает их каталитическую активность во много тысяч раз [70]. Это требование позволяет ограничить реакции свертывания крови областями травмы или воспаления. Был предложен ряд идей для объяснения того, как поверхность мембраны повышает скорость активации белков свертывания крови, в том числе путем увеличения локальной концентрации веществ, а также вызывая конформационные изменения в локальном месте свертывания и ограничение движения белков относительно друг друга. Возможно, что все эти механизмы важны. Несмотря на их критическое значение, все еще нет детального понимания того, как белки свертывания крови взаимодействуют с поверхностями мембран микровезикул [71,72].

Эритроцитарные микровезикулы в норме составляют около 4% от общего числа MP и образуются в норме в процессе циркуляции эритроцита в кровотоке, однако точная их физиологическая роль не выяснена [73]. Существует предположения, что в процессе везикуляции эритроцит

избавляется от вредных агентов, которые накапливаются в процессе его жизни, таких как денатурированный гемоглобин, C5b-9 терминальный компонент каскада комплимента, иммуноглобулин G и другие [74]. Выяснение роли и прокоагулянтной функции эритроцитарных МР представляет собой сложную задачу, особенно в тех случаях, когда состояние пациента характеризуется гемолизом. Вероятно, влияние повышенной везикуляции на прокоагулянтную активность многофакторно, в том числе это и влияние на биодоступность NO(одного из главных агентов эндотелиальной функции) в кровотоке, а также эритроцитарные микровезикулы активно участвуют в генерации тромбина, повышая прокоагулянтные свойства крови, за счет своих поверхностей, на которых образуются комплексы активных факторов [75,76].

1.2. Нарушения системы свертывания при гемолитических анемиях

Гемолитические анемии - группы разных патологий, объединенных единым симптомом, гемолизом эритроцитов. К гемолитическим анемиям относятся такие заболевания как α - и β -талассемия, аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА), наследственный (врожденный) сфероцитоз и овалоцитоз (эллиптоцитоз), пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), микроцитарная гемолитическая анемия, серповидно-клеточная анемия, дизэритропоэтическая анемия и некоторые другие [77,78].

В зависимости от локализации принято выделять внутриклеточный и внутрисосудистый варианты гемолиза. При внутриклеточном гемолизе разрушение эритроцитов происходит в клетках ретикулоэндотелиальной системы, прежде всего в селезенке, в меньшей степени в печени, костном мозге. При внутрисосудистом гемолизе разрушение эритроцитов происходит непосредственно в кровеносном русле. У взрослых больных гемолитической анемией могут отмечаться так называемые гемолитические

кризы, которые характеризуются повышением концентрации лактатдегидрогеназы (ЛДГ), лихорадкой, болями различной локализации, иктеричностью кожных покровов и склер. Гемолитический криз напрямую связан с тромботическими осложнениями у взрослых [20,21,79].

У детей клиника гемолитической анемии разнообразна. Долгое время заболевание может ничем себя не проявлять, и больные считаются здоровыми до тех пор, пока не возникает обострение гемолитического процесса. Иногда с первых месяцев жизни у детей с наследственной гемолитической анемией наблюдается кризовое течение заболевания [28,78,80]. При кризе характерны повышение концентрации ЛДГ, лихорадка, боли различной локализации, иктеричность кожных покровов и склер. Кризы могут провоцироваться инфекциями, некоторыми химическими веществами, психическими травмами, переутомлением, травмами, переохлаждением, однако, обычно гемолитические кризы возникают спонтанно. Тяжелое кризовое течение заболевания является причиной развития кардиологических проблем, почечной недостаточности и тромботических осложнений у детей и подростков [19,28,30,78,80,81].

Талассемия - это группа наследственных заболеваний, связанная с патологическим разрушением эритроцитов. β -талассемия представляет собой наследственное нарушение синтеза гемоглобина, которое характеризуется различными дефектами β -цепей гемоглобина, дисбалансом в синтезе α/β -цепей гемоглобина, неэффективным эритропоэзом и анемией [30,77,78]. Генетические дефекты приводят к снижению синтеза β -глобина: дефицит (обозначается β^+ талассемия) и полное отсутствие (обозначается β^0 талассемия). В β -талассемии синтез нормальных α -глобиновых цепей из незатронутых генов α -глобина продолжается как нормальный, что приводит к накоплению внутри предшественников эритроцитов избытка α -глобина. Свободные α -глобиновые цепи не способны образовывать жизнеспособные

тетрамеры и вместо этого осаждаются в предшественниках красных клеток в костном мозге, образуя тела включения. β -талассемия подразделяется на большую (мутация, связанная с полным отсутствием синтеза β^0/β^0 в обоих аллелях гена β -глобина), промежуточную (мутации также в обоих аллелях β^0/β^+ и β^+/β^+ , с существенно сниженным синтезом) и малую форму (мутация в одном из аллелей гена β -глобина β^+/β или β^0/β , при которой чаще сохраняется синтез нормальных цепей β -глобина). Большая форма β -талассемии характеризуется тяжелой формой анемии и требует регулярных переливаний крови и лечения, промежуточная форма часто ведет себя схоже с большой формой, но течение заболевания проходит легче, в то время как малая форма часто протекает практически бессимптомно. Для этого заболевания характерен в основном хронический внутриклеточный гемолиз, то есть разрушение эритроцитов происходит в селезенке посредством поглощения дефектных эритроцитов макрофагами. В лабораторных показателях обращает на себя внимание общее снижение количества эритроцитов и/или гемоглобина (а также наличие свободного гемоглобина в крови вследствие активного разрушения эритроцитов), повышение уровня железа в крови, повышение ЛДГ вследствие внутриклеточного гемолиза [30,77,82]. Спленэктомия – удаление селезенки для снижения степени внутриклеточного гемолиза, является одним из основных методов лечения β -талассемии.

Существует все больше доказательств, что талассемия сопровождается состоянием гиперкоагуляции и повышенным риском тромботических осложнений [18,30,83,84]. Тем не менее, основной механизм для развития гиперкоагуляции при талассемии еще остается в значительной степени неясным. В дополнение к увеличению концентраций протромбина и фибриногена, у пациентов с талассемией происходит повышению концентрации циркулирующего в кровотоке тканевого фактора

и увеличение активации тромбоцитов, что может привести к тромботическим осложнениям и даже летальному исходу [18,20,83]. Механизм активации системы свертывания при гемолитической анемии, вероятно, многофакторный [18,30,84,85].

Механизмы, способствующие гиперкоагуляции при талассемии, разнообразны и включают в себя хроническую активацию тромбоцитов, аномалии эритроцитов, аномальную экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках сосудов, дисфункцию печени, сердечную дисфункцию и нарушение регуляции гемостаза. Регулярные переливания компонентов крови могут уменьшить риск развития тромбоза, а тромбоцитоз после спленэктомии может значительно увеличить этот риск [24,30,83–87]. Таким образом, за счет широкого спектра различных протромботических факторов состояние гемостаза пациента с β -талассемией должно находиться под контролем лабораторных тестов (клоттинговых тестов, концентрация фибриногена, D-димера, ТГТ, ТЭГ, ТД). Оценка системы гемостаза у таких пациентов особенно важна для терапевтических потребностей, например, после спленэктомии и при профилактике антикоагулянтами.

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), также известная как синдром Маркиафавы-Микели, это редкое приобретенное заболевание крови, для которого характерны комплемент-индуцированная внутрисосудистая гемолитическая анемия, гемоглобинурия и тромбозы [22,88–90]. Особенностью течения ПНГ являются периодические гемолитические кризы. Гемолитические кризы возникают, как правило, спонтанно, иногда они бывают спровоцированы переохлаждением, инфекцией, переутомлением [88–91].

Со стороны системы гемостаза ПНГ характеризуется состоянием гиперкоагуляции, риск развития тромбоза у таких пациентов в 62 раза

превышает риск в общей популяции. Тромбозы являются основной причиной смерти при ПНГ [22,25,90–92]. Однако до сих пор точная этиология повышенного тромботического риска у пациентов с ПНГ остается мало изученной [25–27,93]. Механизм активации свертывания, вероятно, многофакторный: циркулирующие в крови прокоагулянтные микрочастицы, выпущенные путем опосредованного комплементом лизиса эритроцитов, активация тромбоцитов, эндотелиальная дисфункция, хронический гипофибринолиз, понижение концентрации NO могут способствовать гиперкоагуляции при ПНГ [22,25,91–95], микровезикулы, высвобождающиеся при остром гемолизе у пациентов ПНГ, способны связывать фактор V, что служит причиной повышенного свертывания [27,34].

Наличие тромботического риска при ПНГ напрямую связывают с комплемент-индуцированным внутрисосудистым гемолизом. У больных ПНГ гемопоэтические стволовые клетки характеризуются недостатком гликозилфосфатидилинозитол-связанных белков, которые играют важную роль в регуляции каскада комплемента во врожденном иммунитете. Результатом является рост числа клеток крови, в частности эритроцитов, которые также имеют недостаток гликозилфосфатидилинозитол-связанных белков, а следовательно они повержены комплемент-опосредованному гемолизу [25,88,89].

Клинические симптомы, сопровождающие гемолитический криз (повышение активности ЛДГ, абдоминальные боли, гемоглобинурия) связаны с увеличением риска тромбоза в 1,5 раза по сравнению со стандартным риском в 30-40% во время хронического гемолиза[96–98]. Однако до сих пор не нет абсолютно точного понимания механизмов, приводящих к тромботическим осложнениям во время гемолитического криза у больных ПНГ [22,25,27,92,98].

Наследственный сфероцитоз – это врожденная патология, связанная с повышенным разрушением (гемолизом) эритроцитов из-за дефекта клеточной мембраны, встречается примерно с частотой 2-3 случая на 10000 населения [78,99–101]. Для наследственного сфероцитоза характерен в большей степени внутриклеточный гемолиз, то есть разрушение эритроцитов происходит не только в кровеносном русле, а в основном под действием макрофагов в селезенке. В патогенезе заболевания лежат аномалии белков, или спектринов, в мембране эритроцита, в связи с чем нарушается ее проницаемость и эластичность. В результате эритроциты приобретают шарообразную форму, легко подвергаются элиминации из кровотока преимущественно в макрофагах селезенки [78,99–102]. У пациентов со сфероцитарной гемолитической анемией могут отмечаться так называемые гемолитические кризы, которые характеризуются повышением концентрации билирубина в основном за счет непрямой фракции, лихорадкой, болями различной локализации, иктеричностью кожных покровов и склер. У взрослых гемолитический криз напрямую связан с тромботическими осложнениями [20,21,79,102].

Самые высокие риски развития тромбоза наблюдаются у детей во время проведения хирургических вмешательств, в особенности – спленэктомии. У 11% детей с наследственным сфероцитозом и серповидно-клеточной анемией присутствуют осложнения после спленэктомии, такие как тромбоз портальной вены, синдром острой груди и ишемический инсульт, а так же повышен риск инфекционных осложнений, которые в свою очередь могут повысить риск тромбоза до 30% [19,103,104]. Ретроспективное исследование 246 детей с наследственным сфероцитозом показало, что у 94% детей, у которых до и после спленэктомии была повышена концентрации тромбоцитов и наблюдалось пониженное содержание холестерина, имели тромботические осложнения после

спленэктомии [105]. Риск ишемического инсульта и тромбоза при гемолитических анемиях как послеоперационного, так и на фоне острого гемолиза начинает возрастать в подростковом периоде после 11 лет и приближаться к взрослым пациентам [106]. В исследовании Gelas et al. [103] сообщается о тромбозе портальной вены после спленэктомии у подростка 17 лет, всего в исследование включено 11 детей с наследственным сфероцитозом после операции.

Риск спонтанного тромбоза у детей с гемолитической анемией составляет 5% [19,103,105], однако это на несколько порядков выше риска развития тромбоза у детей в общей популяции, который составляет 0,0007% [17]. У части больных с микросфероцитарной анемией на коже голени образуются двусторонние язвы в области внутренних мышечков; они заживают только после спленэктомии. Одним из предполагаемых механизмов их возникновения являются микротромбозы [99].

Известно, что у взрослых с гемолитическими анемиями в среднем риск развития тромбоза составляет около 20% в зависимости от заболевания, его течения и терапии [20,21,78,86]. У детей с диагнозами серповидно-клеточная анемия, β -талассемия, сфероцитоз, овалоцитоз, гемоглобиноз Н, АИГА, дизэритропоэтическая анемия и ПНГ также повышен риск тромбоза. Повышенная свертываемость крови связана, как правило, с несколькими причинами, в том числе с наличием прокоагулянтных микрочастиц, высвобождающихся в процессе лизиса эритроцитов [18,19,28,34,35,81,87], активацией тромбоцитов [18,28,30,34,48,49,107], нарушениями в пути плазменного свертывания и фибринолиза [18,28,30,107,108], эндотелиальными нарушениями [28,31,104], изменениями концентрации NO [81,95,105,107,108], расстройством периферического кровообращения [21,32,78,80,102,108]. Все это приводит к различным нарушениям, в том числе легочной

недостаточности, тромбозам, кардиологическим нарушениям и ишемическим инсультам [19–21,29,79,81].

Дети с β -талассемией также имеют повышенный риск тромбозов (до 5%) в первый месяц после проведения спленэктомии [109]. У детей с АИГА повышен риск (около 5%) возникновения тромботических осложнений, инфарктов и перитонитов после проведения спленэктомии [110,111]. При любых оперативных вмешательствах, в том числе частых для детей аденэктомии или тонзилэктомии, удаление аппендицита и холецистэктомия ишемический инсульт, синдром острой груди, тромботические осложнения развиваются примерно в 5% случаев, а смертность составляет 0,2% [111–115].

Риск ишемического инсульта и тромбоза при гемолитических анемиях как послеоперационного, так и на фоне острого гемолиза начинает возрастать в подростковом периоде после 11 лет и приближаться к взрослым пациентам [99,103–106,109–111,116].

Дети с серповидно-клеточной анемией имеют 10% риск катетер-ассоциированного тромбоза и 40% риск катетерных инфекций, которые повышают риск тромбоза до 30% [117]. У детей с АИГА может возникнуть тромбоз на фоне инфекционного заболевания [118]. Дети с ПНГ имеют повышенный риск тромботических осложнений на фоне обострения гемолиза около 20% [108].

В современной лабораторной практике применяется ряд коагулологических тестов, каждый из которых имеет свою специализацию и направлен на выявление конкретных патологий гемостаза. Наиболее широкое распространение на территории РФ имеют следующие тесты коагулограммы: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПВ),

протромбиновый индекс (ПИ), определение концентрации фибриногена, D-димеров и антитромбина III (АТIII).

Существует ряд работ, показывающих что коагулологические тесты (АЧТВ, ТВ, ПВ) недостаточно чувствительны для оценки тромботических осложнений у пациентов с гемолитическими анемиями. Несмотря на известные гиперкоагуляционные изменения у детей с гемолитическими анемиями и случаи тромбоза, эти тесты не отличались от контрольных значений [18,19,36,38,111,119].

D-димеры отражают процесс лизиса фибрина в уже сформированном сгустке и традиционно используется для диагностики тромбоза [18,19,119]. Однако в последнее время этот тест рассматривается как один из перспективных маркеров гиперкоагуляции у взрослых [18–20,119,120]. Результаты оценки D-димеров у детей с гемолитическими анемиями показали, что в течение пяти лет после проведения спленэктомии D-димеры достоверно повышены у детей, однако это не сопровождалось тромботическими осложнениями. В этом же исследовании у детей с β -талассемией D-димеры были повышены перед спленэктомией, их концентрация сильно возрастала в первую неделю после спленэктомии и постепенно нормализовалась к бой неделе. Однако ни у кого из 12 детей не был зарегистрирован тромбоз [119]. В исследовании Das et al [19] D-димеры были повышены у 23% детей с наследственным сфероцитозом, 73% детей (19 из 26) имели тромбоцитоз после спленэктомии (при этом РС, АТIII и фибриноген были в основном в норме), однако в этой работе связь с тромботическими осложнениями не была прослежена.

Таким образом, не смотря на распространенность стандартных коагулологических тестов для мониторинга состояния гемостаза у пациентов детского возраста с гемолитической анемией, становится ясно, что не способны отражать гиперкоагуляционные нарушения системы

гемостаза у таких пациентов, при этом D-димеры являются лишь маркером фибринолиза, и не оценивают риски.

У детей с β -талассемией концентрация ТАТ-комплекса повышена такая картина характерна и для взрослых с данным заболеванием. Показано, что у детей с наследственными гемолитическими анемиями на 70% укорачивается время свертывания в тесте с ядом гадюки Рассела, что свидетельствует о повышенной концентрацией циркулирующих в крови микровезикул [18]. При обследовании детей с тяжелыми формами наследственной серповидно-клеточной анемии тесты ТГТ и ТЭГ выявили гиперкоагуляционные нарушения гемостаза [36,38].

1.3. Нарушения системы свертывания при остром лимфобластном лейкозе

У детей самым частым онкогематологическим заболеванием является острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), его доля среди всех лейкозов составляет около 80% [42,121,122]. У взрослых заболевание встречается гораздо реже, форма острого лейкоза диагностируется примерно у 10% пациентов [123]. Около 40% пациентов сталкиваются с кровоточивостью при остром лейкозе, однако она, как правило, не относится к жизнеугрожающим осложнениям [122,124]. Носовые кровотечения, десневые кровотечения и петехии, характерные для ОЛЛ, связаны с анемией и снижением количества тромбоцитов как следствие нарушения работы системы кроветворения и терапии при лейкозе [124,125]. Тяжелые геморрагии(желудочно-кишечные кровотечения, гематурия, внутричерепные кровоизлияния) чаще развиваются вследствие прогрессирования ОЛЛ или позднего обнаружения болезни [122–125]. Однако ранняя смерть у пациентов с ОЛЛ составляет всего 1% от всех диагностированных, при этом основной причиной являются инфекционные осложнения, которые могут привести к синдрому диссеминированного

внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрому), внутричерепные кровоизлияния вследствие угнетения гемопоэза являются второй причиной ранней смерти у пациентов с ОЛЛ до терапии [122,124–127]. ОЛЛ занимает первое место и в отношении частоты развития тромбозов у пациентов детского и подросткового возраста [42,127]. Частота развития тромбозов при этом заболевании колеблется, по данным разных исследователей риск развития симптоматических тромбозов достигает 36% [42,122,123,126–130], а асимптоматических тромбозов - 73% [43], что затрудняет своевременную оценку риска и изменение тактики терапии, и может привести к более серьезным осложнениям.

Использование центральных венозных катетеров (ЦВК) является причиной 2/3 всех тромбозов при ОЛЛ у детей. Несмотря на то, что большинство из них протекает бессимптомно, они опасны развитием повторных тромботических эпизодов, которые случаются у 4-19% больных [42,50,121,122,129]. Кроме того, тромбоз в системе центральных вен опасен из-за возможности тромбоэмболии легочной артерии - возникает у 8-15% больных [42,121]. По некоторым данным, посттромботический синдром развивается у 5 – 25% пациентов [42,121,122], а по данным мета-анализа – у 50% больных с тромбозом центральных вен [121]. В 2-4% тромбоз, ассоциированный с ЦВК, является непосредственной причиной смерти пациентов с ОЛЛ [42,122,123,126].

Второй по частоте причиной развития тромбозов при ОЛЛ у детей является совместное использование L-аспарагиназы (Coli-asp) [123,128–130] и глюкокортикостероидных гормонов (в основном в терапии индукции) [122,129–133]. Применение Coli-asp в терапии ОЛЛ основано на снижении содержания аминокислоты аспарагина и существенной редукции синтеза белков. В здоровых клетках восстановление содержания происходит благодаря ферменту аспарагинсинтетазе, экспрессия которого в лейкозных

клетках существенно снижена. Аспарагинсинтетаза может неплохо компенсировать недостаток аспарагина в большинстве здоровых клеток при терапии аспарагиназой. Но это не относится к печени, в которой идут массивные синтезы многих белков для всего организма, и, в первую очередь, для плазмы крови [123,127–129,132]. Применение аспарагиназы приводит к значительному снижению синтеза большинства белков системы свертывания, которые отвечают за про- и антикоагуляные свойства крови [128–135]. Считается, что уменьшение концентрации фибриногена и фактора Виллебранда [123,130,133,135] в плазме крови чревато развитием геморрагических осложнений, редукция синтеза АТIII [128–135] – тромбозами. Однако, как показали исследования, изменения в концентрациях белков системы свертывания не отвечают на вопрос о рисках и направленности гематологических осложнений при острых лейкозах. Ведь, несмотря на то, что уменьшение концентрации фибриногена и прокоагулянтных факторов в плазме крови может быть чревато развитием геморрагических осложнений, в то время как редукция синтеза антитромбина и протеина С – тромбозами, в клинической картине пациентов с ОЛЛ мы чаще наблюдаем тромбозы поверхностных и глубоких вен, тромбоз сагиттального синуса, артериальный тромбоз и тромбозы венозных катетеров, ДВС-синдром [128,133–135]. Многочисленные исследования показывают, что терапия аспарагиназой приводит к значительному снижению синтеза большинства прокоагулянтных факторов свертывания крови (фибриногена, FII, FV, FVII, FIX, FX, vWF), а также плазминогена, антитромбина, протеинов С и S [128–136], а использование в терапии ОЛЛ глюкокортикостероидов (ГКС), напротив, приводит к увеличению синтеза фактора свертывания VII, vWF, протромбина (FII), антитромбина, а также ингибитора активатора плазминогена [123,132]. Но лабораторно-подтвержденные изменения в концентрациях этих белков не

дают ответа на вопрос о рисках тромботических осложнений при ОЛЛ. В итоге показано, что наиболее частым гематологическим побочным эффектом терапии ОЛЛ являются именно тромботические осложнения, и сложно определить, какие именно концентрации белков системы свертывания приводят к высокому риску тромбообразования [129,131–133,136].

Что касается тестов на оценку состояния системы свертывания, то в исследовании Truelove, Fielding и Hunt [123], показано что в группе пациентов с ОЛЛ тесты на время свертывание (АЧТВ, ПВ, ТВ) и концентрация фибриногена оказались нечувствительны к известным тромботическим осложнениям у этих больных, находясь всегда области гипокоагуляции в связи с приемом L-аспарагиназы. При использовании результатов измерения концентрации АТIII для оценки протромботических тенденций, было показано, что пониженная концентрация АТIII не всегда является четким предсказателем тромботических осложнений, часто клинический эффект от снижения концентрации АТIII отложенный и сложно провести зависимость между уровнем снижения АТIII и наличием клиники тромбоза. Также тесты свертывания (АЧТВ, ПВ) и концентрация фибриногена оказались нечувствительны к гиперкоагуляционным изменениям у детей с ОЛЛ на терапии с L-аспарагиназой, показывая лишь удлинение времен свертывания из-за подавления синтеза всех факторов свёртывания крови в исследовании Appel et al. на 29-й день терапии дексаметазоном повышение концентраций факторов свертывания (FVII, FIX, FV) и снижение естественных антикоагулянтов (АТIII, РС, PS) указывало на протромботические тенденции, однако, при этом фибриноген оставался в норме. Корреляций с клиническим тромбозом не было [133].

В итоге показано, что стандартные тесты оценки системы свертывания крови (АЧТВ, ПВ и ТВ) чувствительны к снижению концентрации

прокоагулянтных факторов свертывания, обусловленных введением L-аспарагиназы и снижением белково-синтетической функции печени, однако не коррелируют с геморрагическими осложнениями при ОЛЛ, которые больше связаны со снижением количества тромбоцитов. При этом эти тесты состояния свертывающей системы не чувствительны к гиперкоагуляции и не помогают в оценке риска главного гематологического осложнения при ОЛЛ, тромбоза [123,129,130,132,133].

Исследование Mitchell et all [130] показало, что наибольший эффект снижения белкового синтеза во время применения L-аспарагиназы в терапии ОЛЛ можно наблюдать по концентрации АТШ, что является показателем тромботических рисков. Однако из-за снижения этого показателя у всех пациентов с ОЛЛ на терапии с применением L-аспарагиназы, сложно определить, какая именно концентрация АТШ приводит к высокому риску тромбообразования. Показано, что снижение концентраций фибриногена, АТШ, протеина С и плазминогена при применении L-аспарагиназы (препараты *E.coli-* and *Erwinia Coli-* asparaginase) является факторами, которые ведут к тромботическим и геморрагическим осложнениям у детей с ОЛЛ. Однако не определено насколько сильно эти концентрации должны снизиться для однозначного увеличения риска тромботических осложнений [135].

Молекулярные маркеры, указывающие на повышенное свертывание, такие как D-димер и PAI-1, изменяются у пациентов с ОЛЛ, но статистически не значимо [42,128]. У некоторых пациентов все-таки наблюдалось снижение tPA(тканевый активатор плазминогена)[132], и повышение D-димера и PAI-1, однако, корреляции с тромботическими осложнениями не обнаружено [123,134–137]. Еще несколько исследований, посвященных тромботическим рискам при ОЛЛ, указывают на изменения в маркерах - фрагментах протромбина F1.2 и ТАТ-комплекса, по которым

можно судить о повышенной генерации тромбина [123,133,134,136–138]. Но и эти тесты не дают ответа на вопрос о риске тромбоза у пациентов с ОЛЛ. Ранее показано, что тест генерации тромбина (ЭТП) в стандартной постановке не чувствителен к гиперкоагуляции у пациентов с ОЛЛ [139], однако, модифицированная постановка теста генерации тромбина с добавлением тромбомодулина показала статистически значимую разницу между пациентами с ОЛЛ и нормальным контролем, что, по мнению авторов, указывает на разбалансировку пути PS/PC [139,140]. Это согласуется со многими исследованиями, которые показывают, что только интегральные тесты системы гемостаза (ТЭГ, ТД и ТГТ) адекватно отражают гиперкоагуляционные состояния [141,142]. Исследования прокоагулянтной активности микровезикул у пациентов с ОЛЛ с помощью теста генерации тромбина показало наличие изменений у 6 пациентов (у 4 из которых случился тромбоз) из 53 [140].

На данном этапе у детей с ОЛЛ в рутинной практике не рекомендуется профилактика тромботических осложнений с помощью антикоагулянтной терапии, так как она может повысить токсичность лечения. Химиопрепараты, применяемые в терапии острых лейкозов, имеют ряд специфических побочных эффектов, которые связаны с кардио-, нейро- и гепатотоксичностью. Эти осложнения могут усилиться при взаимодействии препаратов химиотерапии с другими лекарствами. На данный момент не существует больших мультицентровых исследований, посвященных первичной тромбопрофилактике у детей [143]. Однако, на небольших группах показано, что частота ретромбозов не зависит от наличия тромбопрофилактики (применение профилактических доз низкомолекулярных гепаринов (НМГ)) у детей и составляет около 15% [144]. Профилактические дозы антикоагулянтов применяются лишь у группы пациентов со случившимся тромботическим осложнением в

анамнезе, то есть повышенным риском развития повторных тромбозов [143].

1.4. Постановка задачи

Традиционно используемые коагулологические методы диагностики (АЧТВ, ТВ, ПВ) состояния свертывающей системы не обладают достаточной чувствительностью для характеристики механизмов гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями и ОЛЛ. Их значения зачастую удлинены при ОЛЛ за счет снижения концентрации факторов свертывания на фоне терапии аспарагиназой, у пациентов с гемолитической анемией они часто находятся в области нормальных значений или возле нормы. Однако известная тенденция к тромботическим осложнениям остается плохо диагностируемой при этих патологиях. Все чаще появляются работы, в которых отражено, что наличие циркулирующих в крови микровезикул является одной из главных причин развития гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями.

Глобальные тесты исследования системы гемостаза, такие как ТЭГ, ТГТ и ТД, являются перспективными для проведения исследований нарушений в системе свертывания, особенно гиперкоагуляционных. ТЭГ не зарекомендовал себя в работах по исследованию активации свертывания и риска тромбоза у пациентов с ОЛЛ вследствие чувствительности к количеству клеток (эритроцитов и тромбоцитов), которое часто снижается у пациентов с ОЛЛ [145], однако, ТГТ показал себя чувствительным к развитию гиперкоагуляции и тромботическим осложнениям у пациентов с ОЛЛ [139,146]. ТЭГ и ТГТ показывают себя чувствительными к гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями [36,39]. Известно, что маркер активации свертывания и фибринолиза D-димер часто повышен у пациентов с гемолитической анемией в послеоперационный

период, однако это не всегда сопровождается тромботическими осложнениями [119]. При этом естественные антикоагулянты (АТIII, РС, PS) чаще остаются в норме. Повышенная концентрация D-димера, ТАТ-комплекса часто наблюдается у пациентов с ОЛЛ, также, как и снижение естественных антикоагулянтов на фоне терапии [123,129]. Однако эти концентрации не могут ответить на вопросы о наличии риска тромботического осложнения, так как только взаимодействие всех этих факторов в системе в целом, а не только их концентрации, может отразить общую картину состояния системы свертывания у пациента. Ведь, когда мы наблюдаем снижение концентраций как естественных про-, так и антикоагулянтных факторов, мы получаем разбалансировку системы гемостаза в целом, и поэтому снижение концентрации факторов не может говорить о риске кровотечения или тромбоза. Дело в том, что пространственно-неоднородная автоволновая природа свертывания крови, включающая в себя многие взаимодействия белков, ионов, клеток, фосфолипидных поверхностей, регулирующая про- и антикоагулянтные свойства крови, не может быть оценена исключительно концентрациями тех или иных белков или продуктов распада фибринового сгустка, необходимо исследование механизмов нарушений гемостаза биофизическими методами и оценка пространственной составляющей этого процесса.

Повышение достоверности лабораторных исследований и исследование биофизических механизмов развития гиперкоагуляции на основе современных глобальных тестов многокомпонентного плазменного звена гемостаза представляется крайне перспективным направлением современной науки.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Методы диагностики состояния системы свертывания

2.1.1. Стандартные тесты гемостаза: тесты времени свертывания

ПВ представляет собой анализ, предназначенный для выявления дефектов в факторах внешнего пути свертывания, протромбина и факторов V, VII и X и, таким образом, измеряет активность внешнего пути коагуляции. Когда какой-либо из этих факторов дефектен или его количество снижено, ПВ пролонгируется. ПВ запускается в РРР (бедной тромбоцитами цитратной плазме) с использованием тканевого фактора, запуская свертывание, начиная с активации фактора VII. В клинике широко используется ПИ, отношение ПВ пациента к ПВ нормы, полученное процентное соотношение позволяет оценить степень изменения ПВ у пациента.

АЧТВ используется для анализа дефектов во внутреннем пути свертывания крови. Анализ способен оценивать дефекты фибриногена и факторов VIII, IX, X, XI и XII. Дефект любого из этих факторов приведет к удлинению АЧТВ. АЧТВ запускается в РРР с активатором (каолин) в присутствии искусственных фосфолипидов, запуская свертывание, начиная с активации фактора XII [10,46,147,148].

ТВ запускается в РРР с использованием тромбина и отражает скорость преобразования из фибриногена фибрина[147].

Концентрация фибриногена измерялась клоттинговым методом, время в эксперименте рассчитывается автоматически с помощью калибровочной кривой зависимости времени свертывания (запускается тромбином) от концентрации фибриногена. Концентрация D-димера измерялась иммунотурбидиметрическим методом. Концентрация АТIII измерена хромогенным методом [10].

К недостаткам стандартных тестов свертывания относят то, что эти

тесты далеки от процессов гемостаза, которые протекают «in vivo» в организме. Во всех тестах присутствует не физиологически сильная активация свертывания, разбавление плазмы, все это ускоряет реакции в 2-3 раза, что не позволяет чувствовать многие нарушения системы свертывания крови. Стандартные тесты гемостаза обладают низкой чувствительностью, они способны чувствовать только серьезные дефициты факторов свертывания, при этом результаты тестов не всегда хорошо соотносятся с клинической картиной геморрагического синдрома. Многие умеренные нарушения остаются за гранью чувствительностью этих тестов. Из-за усиленной активации стандартные тесты гемостаза не применимы при гиперкоагуляционных состояниях.

В работе в качестве стандартных коагулологических тестов на свежей РРР(бедной тромбоцитами плазме) взрослых пациентов были измерены; АЧТВ, ПВ, ПИ, ТВ, концентрации фибриногена и D-димеров. Все исследования проводили в соответствии с инструкциями соответствующего производителя на автоматическом анализаторе Sysmex CA-1500 (Sysmex Corporation, Япония) в лаборатории Коагуляции ФГБУ «Гематологический научный центр».

Для условно здоровых детей и пациентов детского возраста на свежей РРР были измерены: АЧТВ, ПИ, ТВ, концентрации фибриногена, АТШ и D-димеров. Все исследования проводили в соответствии с инструкциями соответствующего производителя на полуавтоматическом анализаторе ACL TOP 700 (Instrumentation Laboratory, США) в группе клинического гемостаза ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева.

2.1.2. Тромбоэластография

ТЭГ основан на измерении механической плотности сгустка. Цельная кровь или плазма помещается в кювету, в которую вставляется вертикальный стержень. Кювета совершает медленные вращательные

движения, и при образовании сгустка стержень начинает вращаться вместе с кюветой. Пока кровь находится в жидком состоянии, она не связана со стержнем, поэтому он не отклоняется от своего исходного положения. При образовании сгустка волокна фибрина связываются со стержнем, и он начинает поворачиваться вместе с чашкой. Амплитуда движения стержня в зависимости от времени передается на компьютер. Кривая тромбоэластографии позволяет определить время начала формирования сгустка, скорость его образования и его механические характеристики. Специфические параметры рассчитываются автоматически:

- параметр R - время реакции; время задержки роста сгустка от начала теста до исходного образования фибрина (амплитуда 2 мм), то есть инициирование;
- параметр K - кинетика; время, необходимое для достижения определенного уровня силы тромба (амплитуда 20 мм), то есть усиление;
- параметр угол α (наклон между R и K); измеряет скорость, с которой происходит накопление фибрина и сшивание, следовательно, оценивается скорость образования сгустка, т. е. генерацию тромбина;
- параметр MA - максимальная амплитуда (мм); представляет конечную прочность фибринового сгустка; то есть отражает общую стабильность сгустка, оценивает свойства взаимодействия фибрина и тромбоцитов через GPIIb/IIIa, условно на 80% зависит от функции тромбоцитов, а на 20% от фибриногена, также чувствителен к количеству клеток крови [1–3].

ТЭГ проводили на тромбоэластографе ТЭГ 5000 Hemostasis Analyzer System с использованием одноразовых кювет (Haemonetics Corporation, США). Анализы были проведены в интервале 10-40 минут от времени забора крови. Тест ставили на образцах цитратной цельной крови (объем 340 мкл), которые были рекальцифицированы добавлением 20 мкл 0,2 М CaCl_2 .

2.1.3. Тест генерации тромбина

ТГТ основан на регистрации сигнала от продукта реакции тромбина с искусственным флуорогенным субстратом. По динамике концентрации этого продукта вычисляется динамика наработки в плазме крови тромбина. По кривой генерации тромбина определяют время начала наработки тромбина, общее количество тромбина, максимальное количество тромбина и время его достижения. Преимуществом метода является его высокая чувствительность к гиперкоагуляционным и гипокоагуляционным изменениям. Тромбин является основным регуляторным белком свертывания и поэтому его поведение определяет поведение всей системы. Активация свертывания в плазме крови запускается по внешнему пути с помощью добавления тканевого фактора.

В тесте генерации тромбина выделяют основные параметры – это пиковая концентрация тромбина (максимально наработанная концентрация фактора Па в образце, нмоль/л), время запаздывания (время от момента внесения всех реагентов в лунку с образцом до момента отклонения сигнала флуоресценции от горизонтальной линии более, чем на 2 стандартных отклонения, то есть временная задержка перед взрывной волной наработки тромбина), эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП, нМ*мин, площадь по кривой) [4,149,150].

Результаты теста генерации тромбина получены и любезно предоставлены Грибковой И.В. Пробоподготовка, проведение эксперимента, обработка изображений были реализованы, как описано в [151]. Вкратце: в ячейки стандартного плоскодонного 96-луночного планшета помещали по 80 мкл образцов бедной тромбоцитами плазмы, к которым добавляли 20 мкл раствора флуорогенного субстрата Z-Gly-Gly-Arg-AMC (конечная концентрация – 400 мкМ) и 20 мкл кроличьего тромбoplastина (конечная концентрация - 4 пМ) с

фосфолипидными везикулами (конечная концентрация – 4 мкМ). Непрерывную регистрацию флуоресценции продукта реакции тромбина с субстратом (7-амино-4-метилкумарина, АМС) проводили при 37°C на протяжении 60 мин с помощью флуориметрического ридера Appliskan (Thermo Fisher Scientific, Финляндия) (λ возбуждения = 355 нм, λ испускания = 460 нм). Вычисление кривой генерации тромбина и расчет ее параметров осуществляли с помощью стандартной графической программы Origin 6.0 (Microcal Software Inc., MA, USA). Определяли суммарное количество тромбина, образовавшегося в пробе за 50 минут – эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП).

2.1.4. Метод тромбодинамика

ТД – это глобальный тест гемостаза, в основе которого лежит имитация повреждения сосудистой стенки. Тромбодинамика позволяет оценить распространение фибринового сгустка в пространство кюветы и измерить скорость роста сгустка в приактиваторной области и вдали от нее, тем самым оценить скорость ответа системы гемостаза на повреждение и способность к формированию плотной пространственной структуры фибринового сгустка [7,152–154]. Свертывание плазмы активируется поверхностью, которая покрыта иммобилизованным тканевым фактором, а затем распространяется в объеме плазмы (рисунок 3а). Перед добавлением в кювету плазму рекальцифицируют путем добавлением 20 мМ CaCl₂. Изображения растущего сгустка снимаются каждые 6 секунд в течение получаса. На основании серии изображений построена кривая зависимости интенсивности светорассеяния от времени, размер сгустка рассчитывался как координата, при которой интенсивность светорассеяния равнялась 50% от максимальной интенсивности. На основании зависимости размера сгустка от времени были рассчитаны следующие параметры (рисунок 3в): задержка роста сгустка Tlag (задержка между контактом плазмы с

активатором и началом образования сгустка), начальная скорость роста сгустка V_i (тангенс угла наклона кривой зависимости размера сгустка от

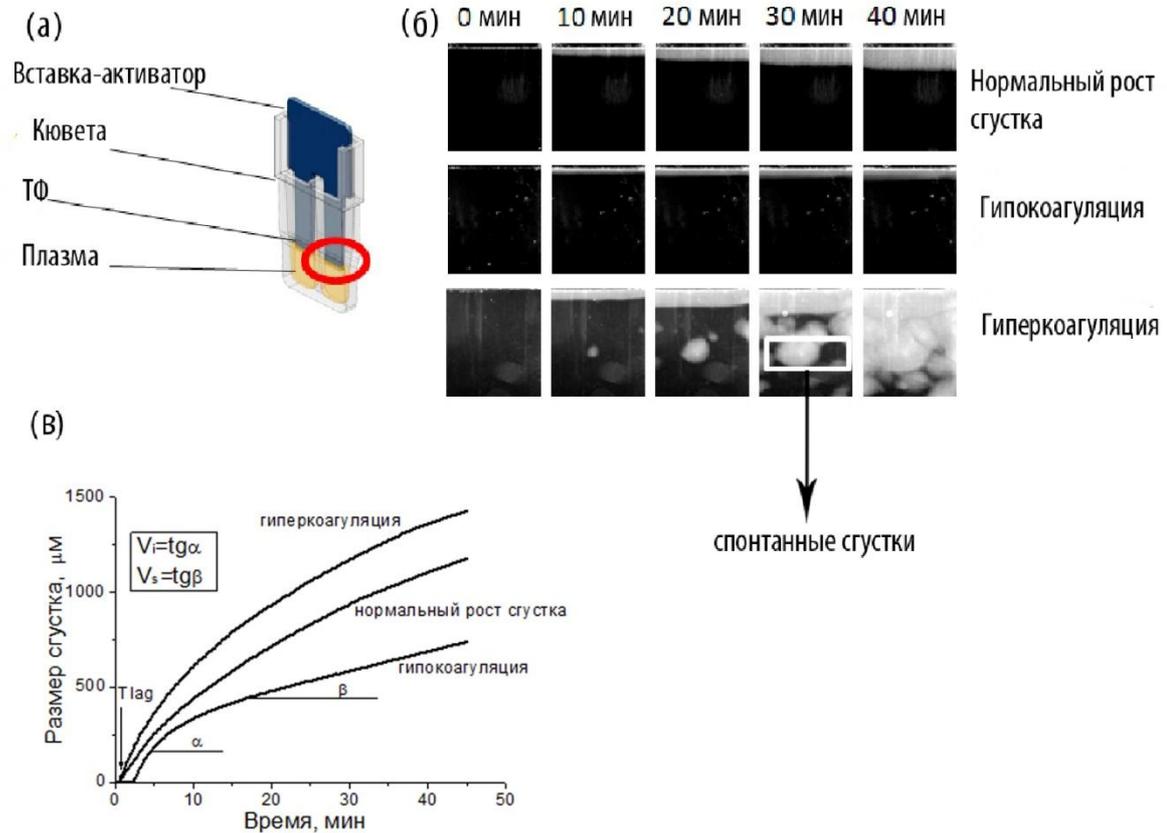


Рисунок 3. Тромбодинамика: метод чувствительный к различным состояниям системы гемостаза. (а) Кювета с плазмой, в которую опущена пластиковая вставка-активатор с нанесенным на торец иммобилизованным ТФ. (б) Типичные для указанных временных интервалов снимки роста сгустка, запущенного активатором с иммобилизованным ТФ, который на изображении виден как контрастная черная полоса над образующимся сгустком, для плазмы здорового донора, а так же пациентов с гипо- и гиперкоагуляционным состоянием гемостаза. Белый прямоугольник показывает область для расчета параметров спонтанного тромбообразования вдали от активатора, если оно присутствует в случае гиперкоагуляции. (в) Графики зависимости размера сгустка от времени для расчета стандартных параметров ТД к примерам, показанным в (б) в качестве образца изображений. На графиках так же указаны параметры: T_{lag} - время задержки роста сгустка, V_i ($tg\alpha$) – начальная скорость роста сгустка, V_s ($tg\beta$) – стационарная скорость роста сгустка.

времени в начальный период образования сгустка в приактиваторной области), и стационарная скорость V_s (тангенс угла наклона кривой зависимости размера сгустка от времени вдали от активатора). Данный метод способен отражать спонтанное активатор-независимое свертывание (рисунок 3 б).

Для проведения теста тромбодинамика использовали прибор Тромбоимаджер (Гемакор, Россия) Пробоподготовка, проведение эксперимента, обработка изображений были реализованы, как описано в [7]. Вкратце: 120 мкл свободной от тромбоцитов плазмы смешивали с лиофильно высушенным ингибитором контактной активации из кукурузы (corn trypsin inhibitor), и смесь инкубировали 15 мин при 37°C, чтобы остановить свертывание от стенок кюветы из-за контактной активации. Затем пробу рекальцифицировали, добавляя ее к сухому реагенту ацетата кальция, и помещали в экспериментальную пластиковую кювету. Для активации свертывания по внешнему пути в кювету вносили пластину, на краю которой был иммобилизован тканевый фактор (плотность ТФ составляла 90 пмоль/м²). Образец непрерывно фотографировали в течение 30 мин (6 секунд/кадр). На основании серии изображений была построена кривая зависимости интенсивности светорассеяния от времени. Размер сгустка рассчитывали как координату, при которой интенсивность светорассеяния составляла 50% от максимальной. Параметры теста рассчитывались в автоматическом режиме: время задержки роста сгустка T_{lag} (время, которое требуется до начала образования из фибриногена фибрина), начальная и стационарная скорости роста сгустка V_i и V_s , плотность сгустка D .

2.1.5. Метод проточной цитометрии

Проточная цитометрия - это метод, используемый для обнаружения и количественной оценки частиц, суспендированных в потоке жидкости,

например, клеток или микровезикул. Принцип проточной цитометрии заключается в том, что один или несколько лучей света (обычно лазерного света) направлены на гидросфокусированный поток жидкости. Ряд детекторов размещен на пересечении потока жидкости с лучом света, для обнаружения рассеянного света: прямое светорассеяние или FSC (рассеяние света под малыми углами от 1° до 10°) и боковое светорассеяние или SSC (рассеяние света перпендикулярно под углом 90° к потоку) и один или несколько флуоресцентных детекторов. Каждая взвешенная частица от 0,2 до 150 микрометров, проходящая через проточную ячейку, рассеивает свет, а флуоресцентные химические вещества, обнаруженные в частице или прикрепленные к ней, могут возбуждаться, излучая свет с большей длиной волны, чем источник света. Это сочетание рассеянного и флуоресцентного света регистрируется детекторами и, анализируя изменения яркости на каждом детекторе, получается информация о физическом и химическом строении каждой отдельной частицы. FSC коррелирует с объемом клетки, а SSC зависит от внутренней структуры частицы, например для клетки: форма ядра, количество и тип цитоплазматических гранул или шероховатость мембраны. Обнаруженная флуоресценция, как правило, связана с наличием специфических клеточных структур (антигены, нуклеиновая кислота) или функций (жизнеспособность, активность ферментов, мембранный потенциал, внутриклеточная концентрация ионов) [155,156].

С помощью метода проточной цитометрии измеряли концентрацию PS+(прокоагулянтных) микровезикул, пометив их аннексином V, и эритроцитарных микровезикул, пометив их специфическими антителами к гликофору CD235a+.

2.1.6. Метод иммуноферментного анализа

Иммуноферментный анализ (ИФА) представляет собой метод предназначенный для обнаружения и количественного определения

низкомолекулярных соединений, белков, антител, гормонов. Этот метод основан на реакции «антиген-антитело». В ИФА антиген должен быть иммобилизован на твердой поверхности с помощью специфического антитела, а затем образовать комплекс с вторичным антителом, которое связано с ферментом (конъюгирование). Детекцию осуществляют оценкой активности конъюгированного фермента путем инкубации с субстратом, что в итоге обеспечивает цветовую реакцию [157,158]. ИФА выполняли на микропланшетном ридере Thermomax Precision Microplate Reader с использованием набора для определения концентрации тромбомодулина ELISA Kit for Thrombomodulin (Cloud Clone, США). Все этапы подготовки выполняли по инструкции от производителя, оптическую плотность образцов измеряли на длине волны 450 нм. Для построения калибровочной кривой, получения уравнения полинома и расчета концентраций в образцах использовали программу OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, США).

2.2. Материалы

В работе были использованы следующие материалы:

- Pathrimtin SL (реагент для измерения АЧТВ), Thromborel S (реагент для измерения ПВ), Test Thrombin Reagent (реагент для измерения ТВ), и D-димер PLUS (все из Dade Behring, Германия) – измерение тестов у взрослых пациентов;
- SynthASil (реагент для измерения АЧТВ), ThromboPlastin (реагент для измерения ПВ), Thrombin Time (реагент для измерения ТВ), QFA Fibrinogen (реагент для измерения концентрации фибриногена), D-dimer HS (набор для измерения концентрации D-димера), Liquid Antithrombin (набор для измерения концентрации АТIII) (из HemoSil, США) - измерение тестов у пациентов детского возраста и контрольной группы;
- Набор реагентов для теста тромбодинамики (ООО «ГемаКор», Россия);

- Одноразовые кюветы со стержнем для ТЭГ (Haemonetics Corporation, США);
- Кроличий тромбопластин (RENAM, Россия);
- Флуорогенный субстрат для определения активности тромбина Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem, США);
- ELISA Kit for Thrombomodulin (набор для измерения концентрации свободного Тромбомодулина) (Cloud-Clone Corp., США);
- Фикоэритрин-аннексин V (an-PE) (для окрашивания фосфотидилсерин-положительных микровезикул) (BioLegend, США);
- Антитела Anti-human CD235a, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (Glycophorin A) (для окрашивания гликофорин-положительных эритроцитарных микровезикул) (BioLegend, США);
- Антитела Anti Mouse IgG2a Antibody, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (BioLegend, США);
- CaCl₂, HEPES, PBS, NaCl, KCl, бычий сывороточный альбумин и Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, США)

2.3. Пациенты

В исследовании принимали участие взрослые пациенты Отделения Редких Болезней ФБГУ «Гематологический научный центр», а также пациенты детского возраста, проходящие лечение на базе ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева. Все эти пациенты или их доверенные лица подписали информированное согласие на проведение исследований.

2.4. Подготовка плазмы крови

Кровь детей с гемолитическими анемиями, детей из контрольной группы и всех взрослых пациентов, включенных в исследование, получали путем венепункции. В случае пациентов с ОЛЛ забор крови осуществлялся

из центрального венозного катетера (с учетом правил забора крови из катетера: катетер промывался 10мл физиологического раствора, первая порция крови примерно 5 мл набиралась на другие анализы). Кровь забирали в специальную пробирку, содержащую 3,2% раствор цитрата натрия, соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь тщательно перемешивали в процессе забора. 340 мкл цельной цитратной крови шла на постановку тромбоэластографии. Для выполнения стандартных коагулологических тестов, а также тестов методом иммуноферментного анализа, готовили PPP: кровь центрифугировали 15 мин при 1600 g и отбирали надосадок. Для выполнения теста ТД PPP центрифугировали дополнительно для получения свободной от тромбоцитов плазмы (PFP) в режиме 5 мин при 10000 g.

2.4.1. Протокол получения микровезикул

- Цельную кровь центрифугировали до PPP (15 мин×1600 g), а затем полученную PPP центрифугировали еще раз (5мин×10000 g) для получения свободной от тромбоцитов плазмы (PFP);
- Далее PFP центрифугировали 30 мин при 16000 g для получения плазмы обедненной микровезикулами (MPP);
- Полученные после MPP-центрифугирования микровезикулы (MP) (осадок) отмывали трижды в буфере А (150 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 1 mM MgCl₂ + 0,4 mM NaH₂PO₄ + 20 mM HEPES + 5 mM глюкозы + 0,5% бычьего сывороточного альбумина, pH 7,4) в режиме 30 мин×16000 g: полученный образец содержал сконцентрированные в 10 раз относительно плазмы MP(10x MP), который затем исследовали методом проточной цитометрии;
- Затем часть 10x MP концентрировали еще в 4-6 раз в том же режиме 30 мин×16000 g для исследования прокоагулянтной активности с помощью Тромбодинамики;
- После выделения MP проводили измерение Тромбодинамики в MPP

здоровых доноров с добавлением различных концентраций микровезикул. При этом концентрацию МР последовательно снижали в каждом следующем образце в 2 раза. Максимальная концентрация в различных образцах МР находилась в области 4-6 кратной от исходной, а минимальная была равна 0 (в этом образце к МРР вместо МР был добавлен буфер А. Микровезикулы, сконцентрированные в 4-6 раз, последовательно разбавляли в 2 раза. На 117 мкл МРР из пула здоровых доноров добавляли 13 мкл микровезикул нужной концентрации или буфера А.

- Фосфатидилсерин-положительные везикулы были окрашены с помощью флуоресцентной метки an-PE (стоковая концентрация аннексина – 3 мкг/мл, конечная при окрашивании – 30 пг/мл).
- Эритроцитарные микровезикулы были окрашены с помощью меченных FITC anti-human CD235a (Glycophorin A) (стоковая концентрация – 0,5 мг/мл, конечная при окрашивании – 10 мкг/мл)
- Концентрации фосфатидилсерин-положительных везикул ($MP_{\text{ФС}+}$ per мкл) и эритроцитарные везикул ($CD235a+MP_{\text{ГФ}+}$ per на мкл) в штуках на мкл были рассчитаны из данных проточной цитометрии.

2.4.2. Протокол окрашивания и оценки концентрации микровезикул методом проточной цитометрии

Все проточные цитометрические анализы проводились на цитометре NovoCyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences Inc.).

Приготовление краски:

- краски PE-Annexin V и Glycophorin A разводились до 10% концентрации буфером HEPES (pH=7,5);
- смесь для окрашивания микровезикул на 1 образец(10мкл микровезикул): 2,5мкл an-PE(10%) + 2 мкл 100мМ CaCl₂ + 5 мкл CD235a(10%)+5,5мкл буфера А.

Далее к 15 мкл смеси краски добавляли 10 мкл образца 10х МР (микровезикул, сконцентрированных в 10 раз относительно плазмы) и инкубировали образец 10 минут. Потом его разводили, добавляя 250 мкл буфера А, содержащего дополнительно 2,5 мМ CaCl₂. Полученный образец объемом 275 мкл помещали в проточный цитометр для оценки количества связанной метки (по количеству окрашенных событий). Измерения проводили в 30 мкл на скорости «slow» с минимальным порогом по прямому светорассеянию и с порогом по каналу флуоресценции PE, отсекающем большую часть мусора. Область фосфатидилсерин-положительных микровезикул на гистограммах в координатах: связанный с

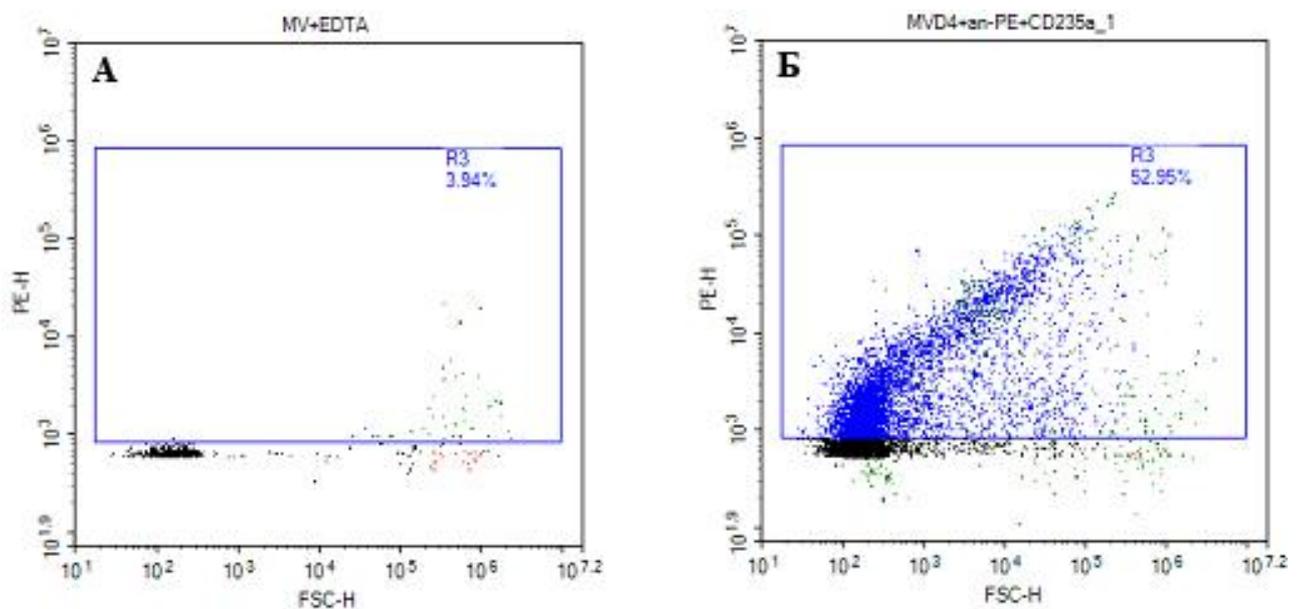


Рисунок 4. Гистограммы в координатах: Фикоэритрин и прямое светорассеяние(FSC-H). Слева (А) указан ЭДТА-контроль и справа (Б) Фосфатидилсерин-положительные микровезикулы здорового добровольца (меченые an-PE).

аннексином фикоэритрин/прямое светорассеяние (FSC-H) была выбрана с помощью ЭДТА-контроля (при связывании CaCl_2 с ЭДТА, не происходит связывание метки с везикулами, вследствие чего можно выбрать область событий, соответствующую фосфатидилсерин-положительным МР), область CD235a-положительных МР – по изотипному контролю (рисунки 4,5).

Синяя область – фосфатидилсерин-положительные микровезикулы, окрашенные an-PE. Зелёная область – гликофоринположительные (эритроцитарные) микровезикулы, окрашенные FITC anti-human CD235a. Таким образом, учитывая все разведения и объем исследуемого образца, абсолютное количество микровезикул на 1 мкл в каждом образце плазмы

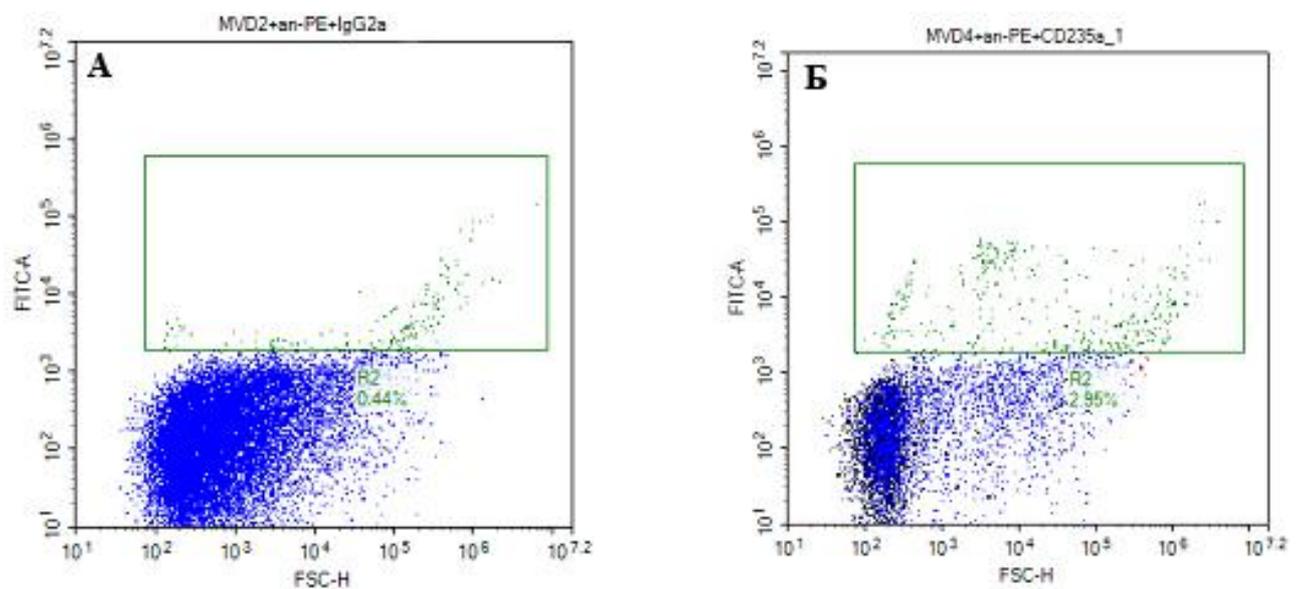


Рисунок 5. Гистограммы в координатах: Флуоресцеинизотиоцианат (FITC) и прямое светорассеяние (FSC-H). Слева (А) указан изотипный контроль для выбора эритроцитарных микровезикул с антителами Anti Mouse IgG2a Antibody, меченными по FITC. Справа (Б) гликофорин-положительные микровезикулы здорового добровольца (меченые по Anti-human CD235a (Glycophorin A)).

рассчитывали по формуле: $MP/мкл = (\text{кол-во событий в выбранной области} \times 275/30/10) \times n$, где n – это во сколько раз были сконцентрированы микровезикулы.

2.5. Статистическая обработка результатов

Для всех расчетов была использована программа OriginPro 8,0 (OriginLab Corporation, США). Оценку динамики изменения показателей во времени для пациентов с ПНГ проводили с помощью однокомпонентного дисперсионного анализа повторных измерений (ANOVA). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для пациентов с ПНГ анализ статистических различий между наборами данных проводили с использованием критерия Вилкоксона с уровнем статистической значимости ($p^* < 0,05$). Для оценки корреляций между показателями использовали коэффициент корреляции Пирсона. Для всех остальных данных использовали U-критерий Манна-Уитни (уровень статистической значимости различий также принимали равным $P < 0,05$).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Пациенты и клинические характеристики

3.1.1. Пациенты с гемолитической анемией и контрольная группа в исследовании влияния микровезикул на гиперкоагуляцию

В качестве контрольной группы для исследования вклада микровезикул в гиперкоагуляцию у пациентов с гемолитическими анемиями, в исследование включено 6 взрослых здоровых добровольцев (2 мужчины и 4 женщины в возрасте от 20 до 40 лет, медиана возраста 29 лет). Из пациентов в исследование включено 3 пациента с наследственным сфероцитозом (мальчики 4, 5 и 12 лет). Все пациенты вне криза. У двоих пациентов тяжелое кризовое течение заболевания. У одного пациента легкое течение заболевания, нет трансфузионной зависимости и кризов. Также в исследование включено 5 пациентов (2 девочки 8 и 17 лет, 3 мальчика 2, 14 и 15 лет) с большой формой β -талассемии. Для заболевания характерен хронический гемолиз.

3.1.2. Взрослые пациенты с гемолитической анемией

В исследовании принимал участие один 45-летний мужчина с β -талассемией (до и после спленэктомии) с тромботическим осложнением после операции (идентификация гемолитической анемии была проведена уже во взрослом возрасте; ДНК-диагностика, проведенная при помощи определения первичной структуры всех функционально важных фрагментов гена β -глобина, показала, что пациент является носителем 2х мутаций в гене β -глобина), а также три пациента с диагнозом пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), который был подтвержден при помощи иммунофенотипирования с выявлением ПНГ-клонов эритроцитов, гранулоцитов и моноцитов, положительной пробы Хема и Сахарозной пробы. У всех пациентов с ПНГ наблюдалась отрицательная динамика со времени постановки точного диагноза: увеличивалась частота

гемолитических кризов с 1 криза в год до 1-2 кризов в 3 месяца, периодичность спастических болей в области живота, характерных для ПНГ, а также увеличивалась трансфузионная зависимость. Все эти пациенты поступили в клинику в состоянии гемолитического криза, сопровождающегося лихорадкой с температурой от 37°C до 40°C, ретикулоцитозом, повышением билирубина за счет непрямой фракции, повышением ЛДГ, снижением гемоглобина, желтушностью кожных покровов и склер. Особенностью протекания гемолитических кризов у пациента В являлась несущественная билирубинемия (таблица 1).

Таблица 1. Демографические и клинические параметры пациентов с ПНГ до терапии экулизумабом.

Пациент	Возраст, лет	Пол	Длительность ПНГ, лет	Антикоагулянты	Стероиды	WBC (10 ⁹), кл/л	НЬ, г/л	Тромбоциты (10 ⁹), кл/л	Ретикулоциты, %	ЛДГ, Е/л
А	29	М	6	Эноксапарин 0,6мг/день	Нет	2.8	54	178	101	6569
В	33	М	2	Нет	Нет	3.6	53	85	52	1874
С	27	Ж	4	Нет	Нет	2.9	67	171	32	3173

3.1.3. Пациенты детского возраста с гемолитической анемией

В исследование было включено 62 пациента с диагнозом наследственный сфероцитоз (40 мальчиков и 36 девочек от 0,5 до 17 лет, медиана возраста - 5,5 лет). Диагноз наследственный сфероцитоз у всех пациентов был подтвержден с помощью генетической диагностики. Эти пациенты были разбиты на 2 группы: в состоянии гемолитического криза (28 пациентов, 18 мальчиков и 10 девочек в возрасте от 0,5 до 17 лет) и вне гемолитического криза (34 пациента, 20 мальчиков и 14 девочек в возрасте от 1 до 17 лет). Гемолитический криз характеризовался клиническими симптомами в виде общего плохого самочувствия, желтухи и бледности,

слабости, одышки, болью в области подреберья и мезентриальными болями, в некоторых случаях также повышением артериального давления.

В исследование было включено также 49 пациентов с диагнозом β -талассемия, из них 22 пациента с большой формой (14 мальчиков и 8 девочек в возрасте от 1,5 до 15 лет, медиана возраста - 7 лет), 16 с промежуточной формой (8 мальчиков и 8 девочек в возрасте от 1,5 до 14 лет, медиана возраста - 6 лет) и 11 с малой формой (5 мальчиков и 6 девочек в возрасте от 1 до 9 лет, медиана возраста - 5 лет).

3.1.4. Пациенты детского возраста с острым лимфобластным лейкозом

В данное исследование включено 73 ребенка в возрасте от 1 года до 17 лет (45 мальчиков, 28 девочек, медиана возраст - 5 лет) с диагнозом ОЛЛ.

Пациенты включены в исследование перед началом этапа консолидации по протоколу ALL-MB-2015 (без дополнительных критериев отбора).

3.2. Контрольная группа и нормы

Нормальные значения параметров свертывания у детей были определены в контрольной группе, которая включала 102 ребенка, проходивших ежегодное клиническое обследование на базе ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Д. Рогачева. Эти дети считались условно здоровыми, т.к. не имели исследованных в работе патологий, а также заболеваний, влияющих на систему свертывания крови.

Показатели для взрослых набраны на 91 условно здоровом доноре (17 мужчин и 74 женщины, в возрасте от 18 до 70 лет, медиана возраста 32 года). В качестве нормальных областей для значений различных параметров в тесте Тромбодинамики были приняты области значений этих параметров, включающие от 5 до 95 перцентилей всех значений. Демографические показатели пациентов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Клинические и демографические показатели детей в контрольных группах.

Возрастная группа	Средний возраст	Пол М/Ж*	Количество детей с диагнозами			Условно здоровые дети, N (%)
			Легкая анемия, N(%)	Пищевая аллергия, N(%)	Аденоидные вегетации, N(%)	
1-5 лет	3,2	18/14	9 (28%)	5 (15%)	4 (13%)	14 (44%)
6-10 лет	7,8	20/11	4 (13%)	3 (10%)	5 (16%)	19 (61%)
11-17 лет	14,4	24/15	6 (15%)	5 (13%)	1 (3%)	27 (69%)
Взрослые (>18 лет)	35,4	17/74	-	-	-	-

* М=мужской, Ж=женский

3.3. Дизайн исследования

Протоколы исследований были одобрены этическим комитетом ФГБУ НМИЦ Гематологии Минздрава России и этическим комитетом ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Все взрослые пациенты с диагнозами β -талассемия, ПНГ и АИГА являлись пациентами ФГБУ ГНЦ Минздрава России.

Все пациенты детского возраста с диагнозами β -талассемия, наследственный сфероцитоз, ОЛЛ являлись пациентами ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Взрослые и дети с гемолитическими анемиями, которые поступали для контрольного обследования и коррекции терапии, имеют однократное исследование состояния системы гемостаза – точка 1.

3.3.1. Дизайн исследования пациента с β -талассемией и последующим тромбозом

Точки коагулологического мониторинга пациента с β -талассемией и последующим тромбозом представлен на рисунке 6. Первые четыре точки (24 дня от поступления) мониторинга пациент не принимал никакой терапии. Спленэктомия была выполнена на 17 день от поступления между

второй и третьей точками коагулологического мониторинга.

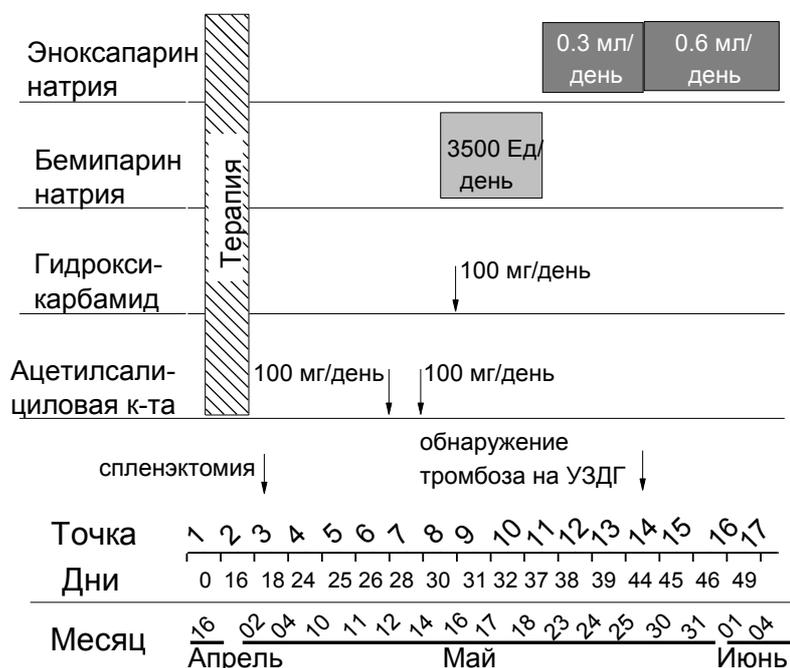


Рисунок 6. Терапия и точки забора крови у пациента 45 лет с β -талассемией и развитием тромбоза (по оси x указаны точки коагулологического мониторинга, дни от поступления и даты).

Антиагрегантная терапия, ацетилсалициловая кислота 100мг в день, была назначена на 6-й точке мониторинга. Антикоагулянтная терапия, бемипарин натрия 3500Ед в день, была назначена на 8-й точке коагулологического мониторинга. Больной был выписан в удовлетворительном состоянии на следующий день после 17-й точки коагулологического мониторинга.

3.3.2. Дизайн исследования пациентов с ПНГ

Протокол коагулологического мониторинга трех пациентов с ПНГ представлен: после обследования и принятия решения о терапии экулизумабом, препарат вводили в лечебной дозе (600 мг) 1 раз в неделю в виде инфузии в течение 45 минут. Забор крови проводили за день до и через 1-2 дня после введения экулизумаба в течение первого. Со второго месяца

терапии, то есть с 30 дня, в соответствии с протоколом лечения, пациентов перевели на поддерживающую терапию экулизумабом в дозе 900 мг 1 раз в 2 недели (инфузия в течение 45 минут). Забор крови на поддерживающей терапии проводили за день до введения экулизумаба. Первые 4 месяца поддерживающей терапии забор крови осуществлялся перед каждым введением, то есть 2 раза в месяц. В последующие месяцы терапии забор крови осуществлялся 1 раз в месяц до введения препарата.

3.3.3. Дизайн исследования пациентов с ОЛЛ

На рисунке 7 представлена схема забора крови у пациентов с ОЛЛ. Всего предусмотрено 10 точек в течение 1, 2 и 3 консолидации до и после введения L-аспарагиназы. Каждая консолидация занимает 6 недель. После чего начинается 2х-недельный курс реиндукции. Всего предусмотрено 3 курса консолидации по 6 недель каждый. L-аспарагиназа вводится 1 раз в неделю.

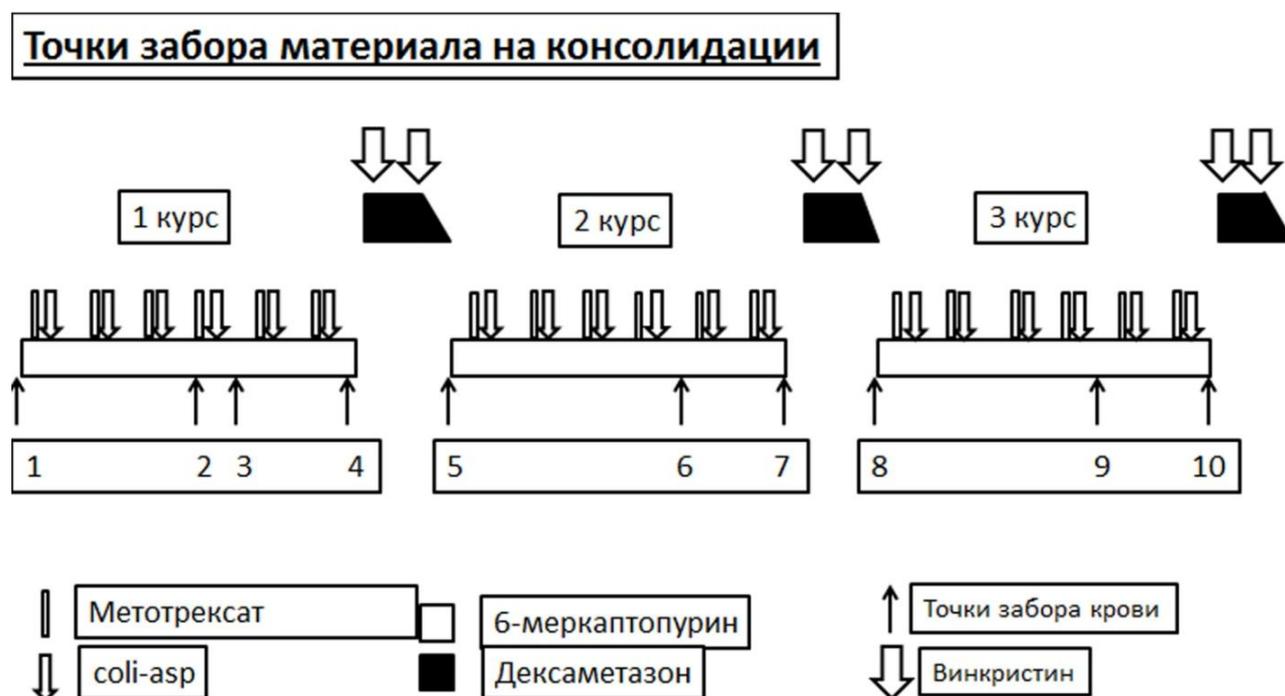


Рисунок 7. Терапия и точки забора крови у детей с ОЛЛ.

В течение первой консолидации обследование проводят 1 точка – до начала консолидации, 2 точка за сутки до 4 ого введения, 3 точка через 1-2 суток после 4ого введения L-аспарагиназы(*coli-asp*), 4 точка через 1-2 суток после 6ого введения препарата. На второй и третьей консолидации точки 5 и 8 до начала консолидации, точки 6 и 9 через 1-2 суток после 4ого введения, точки 7 и 10 через 1-2 суток после 6 введения L-аспарагиназы.

Обследование состояния системы гемостаза проводили с помощью измерения стандартных тестов: АЧТВ, концентрации фибриногена, D-димеров, и антитромбина III, а также интегральных тестов системы гемостаза: ТЭГ и ТД.

Также измеряли маркеры дисфункции эндотелия, концентрации свободного тромбомодулина. Тромбозы регистрировали с помощью ультразвукового исследования вен.

3.4. Исследование Тромбодинамики в группах здоровых детей от 1 года до 17 лет

Глобальные тесты гемостаза, такие как ТЭГ и ТГТ, все чаще используются в клинической практике. Тромбодинамика является новым тестом, который также дает глобальную оценку гемостаза, характеризуя разные этапы развития сгустка. О способности Тромбодинамики прогнозировать такие осложнения как тромбозы и кровоизлияния сообщалось ранее для септических пациентов [6], и пациентов с множественной миеломой [41], в которых проводилось сравнение с группой условно здоровых добровольцев. Все эти исследования были проведены для взрослой популяции. Параметры ТД у детей старше 1 года (как здоровых, так и с различными патологиями) изучены не были. Современные исследования в области детской гематологии показали, что детский гемостаз развивается с возрастом, особенно, в течение первого года жизни. Прежде

всего, это выражается в изменении с возрастом концентраций факторов и ингибиторов свертывания [11]. Однако, несмотря на различия в концентрации факторов свертывания, результаты тестов скрининга коагуляции АЧТВ и ПВ в группах детей и взрослых были одинаковыми [12,159]. Опубликованные данные [160,161] свидетельствуют о том, что между детьми (1-17 лет) и взрослыми нет также различий в показателях ТЭГ. Авторы объяснили это тем, что изменения в концентрациях факторов свертывания и естественных антикоагулянтов у детей незначительны и совместно каскад работает аналогично взрослому. Тест генерации тромбина, напротив, выявил почти 15%-ное снижение ЭТП у детей в возрасте от 0,5 до 17 лет по сравнению с взрослыми [162], что связывают с прямой зависимостью от концентрации тромбина, снижение которой у детей пропорционально снижению ЭТП.

Настоящее исследование было проведено для определения контрольных значений параметров нового глобального теста Тромбодинамики у здоровых детей в возрасте от 1 до 17 лет для использования их в качестве нормы при оценке гемостатического статуса детей с помощью метода Тромбодинамики.

После получения письменного информированного согласия родителей образцы крови были собраны у 102 условно здоровых детей, проходящих ежегодное клиническое обследование. Включенные в исследование дети не находились в состоянии острой болезни и не имели никакого известного наследственного дефицита коагуляции. В то же время, у 18% детей наблюдалась незначительная анемия с дефицитом железа, у 12% - пищевая аллергия, а у 10% - гипертрофия аденоидной растительности. Остальные 60% испытуемых считались полностью здоровыми. Все входящие в группу дети не получали никакой антикоагулянтной или иной терапии. Их общий анализ крови был в нормальном диапазоне. Возрастные группы,

используемые в этом исследовании (1 год-5 лет, 6-10 лет, 11-17 лет), согласуются с ранее опубликованными исследованиями, в которых излагаются возрастные диапазоны гемостаза. Для сравнения параметров Тромбодинамики во взрослой популяции и различных педиатрических группах, кровь была также собрана у 91 здорового взрослого добровольца (средний возраст 32 года (диапазон 18-70 лет), 74 женщины и 20 мужчин).

Таблица 3. Параметры Тромбодинамики для гендерных групп здоровых детей разного возраста*

Параметр	1-5 лет		6-10 лет		11-17 лет	
	М (N=18)**	Ж (N=14)**	М (N=20)	Ж (N=11)	М (N=24)	Ж (N=15)
Тлаг, мин	0.9 (0.7-1)***	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.8-1.2)	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.8-1.2)
Vi, μ м/мин	51 (45-58)	51 (47-57)	51 (43-58)	52 (48-57)	51 (46-56)	49 (45-56)
Vs, μ м/мин	24 (21-27)	25 (22-28)	24 (21-27)	25 (22-28)	25 (21-29)	24 (22-27)
CS_30, μ м	1058 (907-1162)	1078 (970-1168)	1056 (920-1221)	1093 (1012-1223)	1059 (925-1189)	1032 (906-1180)
D, усл. ед.	22716 (17450-29930)	24413 (20908 - 28394)	24079 (20467-26966)	23262 (17240-28331)	23931 (17906-30216)	24200 (20643-27214)

* Представлены средние величины и диапазон (в скобках), включающий от 5 до 95 перцентилей всех значений. Нет статистически достоверной разницы между всеми возрастными группами ($P>0.05$).

** М=мужской пол, F=женский пол

** М=мужской пол, F=женский пол

После прохождения полного обследования были определены параметры теста тромбодинамики в разных гендерных группах (таблица 3), параметры

Таблица 4. Стандартные тесты свертывания у здоровых взрослых и детей разных возрастов*

Тест	1-5 лет (N=32)	6-10 лет (N=31)	11-17 лет (N=39)	Взрослые (N=91)
АЧТВ, сек	35.7 (31.1-39.3)	36.9 (31.9-42.0)	35.1 (30.4-41.1)	34.3 (29.1-39.6)
МНО	1 (0.9-1.2)	1 (0.9-1.2)	1 (1.0-1.3)	0.9 (0.8-1.0)
ТВ, мин	23 (20-25)	23 (19-25)	23 (20-26)	20 (17-22)
Фибриноген , г/л	2.6 (2.0-3.5)	2.7 (2.1-3.7)	2.6 (2.0-3.3)	2.9 (2.1-3.8)

* Представлены средние величины и диапазон (в скобках), включающий от 5 до 95 перцентилей всех значений. Нет статистически достоверной разницы между всеми возрастными группами ($P>0.05$).

стандартных тестов коагуляции (таблица 4) и тромбодинамики (таблица 5) для взрослых и детей различного возраста. Все контрольные значения представлены как средние величины и диапазон, включающий от 5 до 95 перцентилей значений. Ни в одном из исследованных параметров, включая параметры теста Тромбодинамики, не было идентифицировано достоверных различий между детьми различного возраста и взрослыми (таблицы 3-5).

Таблица 5. Референсные значения для теста тромбодинамика для здоровых взрослых и детей разного возраста*

Параметр	1-5 лет (N=32)	6-10 лет (N=31)	11-17 лет (N=39)	Взрослые (N=91)
----------	-------------------	--------------------	---------------------	--------------------

Тлаг, мин	0.9 (0.8-1.0)	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.7-1.1)
Vi, мкм/мин	51 (46-57)	51 (44-57)	51 (45-56)	52 (45-57)
Vs, мкм/мин	25 (22-29)	24 (21-28)	25 (21-29)	26 (22-30)
CS_30, μм	1064 (933-1191)	1068 (940-1230)	1055 (920-1991)	1108(955-1230)
D, усл. ед.	23362 (17646- 29771)	23789 (18445- 28209)	23891 (17765- 29905)	24011 (18155- 30595)
Tsp, мин	Нет спонтанных сгустков	Нет спонтанных сгустков	Нет спонтанных сгустков	Нет спонтанных сгустков

* Представлены средние величины и диапазон (в скобках), включающий от 5 до 95 перцентилей всех значений. Нет статистически достоверной разницы между всеми возрастными группами ($P>0.05$).

3.5. Вклад микровезикул в гиперкоагуляцию у пациентов с гемолитическими анемиями

Все больше исследований посвящено изучению прокоагулянтных частиц, образующихся при гемолитической анемии, как предположительно одному из вероятных механизмов развития гиперкоагуляции и тромбоза [33,72,75,76].

Целью нашего исследования было оценить вклад фосфатидилсерин-положительных(PS+) и эритроцитарных (CD235a+) микровезикул в гиперкоагуляцию в пациентов с наследственным сфероцитозом и β-талассемией.

Для решения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценить вклад везикул в гиперкоагуляцию, наблюдаемую у пациентов с гемолитическими анемиями по различию в скорости роста сгустка до и после очищения плазмы от микровезикул у доноров и у пациентов;

- 2) Сравнить концентрации фосфатидилсерин-положительных и эритроцитарных микровезикул у пациентов с гемолитическими анемиями и у здоровых доноров с использованием проточной цитометрией;
- 3) Определить, есть ли качественное различие между прокагулянтной активностью микровезикул у пациентов с гемолитическими анемиями и у здоровых доноров: выполнить титровку различных концентраций микровезикул здоровых добровольцев и пациентов на МРР пуле нормальной плазмы в тромбодинамике.

3.5.1. Количественный вклад микровезикул в гиперкоагуляцию у пациентов с гемолитической анемией

Проведено сравнение стандартной постановки ТД на РФР с постановкой в МРР, очищенной от МР плазме. В исследование включено 3 пациента с диагнозом наследственный сфероцитоз (мальчики 4, 5 и 12 лет). Все пациенты вне криза. У двоих тяжелое, кризовое течение заболевания (ПВ и СИ). У одного пациента нет трансфузионной зависимости и кризов (ПМ). А также 5 пациентов с диагнозом большая форма β -талассемии (2 девочки 8 и 17 лет, 3 мальчика 2, 14 и 15). Для заболевания характерен хронический гемолиз. Трое с отсутствием ремиссии после спленэктомии (ИД, ГД, АА), двое без оперативного лечения, один из которых с тяжелым течением заболевания (ША) и один с легким (ГМ).

Таблица 6. Показатели пациентов с гемолитической анемией.

	НЬ (115- 138) г/л	Билирубин прямой (0-3,4) мкмоль/л	АЧТВ (25,1- 36,5) сек	ПИ по Квику (70-120) %	DD (0-243) нг/мл	ТВ (15,8- 24,9) сек	Концентрация фибриногена (2-3,93) г/л
Пациенты с большая формой β-талассемии							
ИД	75	15,6	31,8	70	154	23,4	3,33

	НЬ (115- 138) г/л	Билирубин прямой (0-3,4) мкмоль/л	АЧТВ (25,1- 36,5) сек	ПИ по Квику (70-120) %	DD (0-243) нг/мл	ТВ (15,8- 24,9) сек	Концентрация фибриногена (2-3,93) г/л
ГД	104	7,9	32,5	16	109	22	1,57
ГМ	78	7,8	35,8	10	41	22	1,93
АА	89	13,6	31,8	95	82	23,6	3,1
ША	94	17,4	31,8	70	506	22	2,3
Пациенты с наследственным сфероцитозом							
ПВ	107	10,6	31,2	88	16	28,8	1,64
ПМ	146	7,9	31,6	79	67	26,6	2,03
СИ	136	4,7	28,6	80	-	-	2,54

***жирным шрифтом** выделены изменения в показателях

** бежевым выделены пациенты с отсутствием ремиссии после спленэктомии

*** голубым выделены пациенты с тяжелым течением заболевания

В таблице 6 указаны показатели гемоглобина, прямого билирубина, ЛДГ, показатели стандартной коагулограммы, показатели D-димера и концентрация фибриногена. Биохимические показатели соответствуют тяжести течения заболевания и состояния в момент исследования, стандартная коагулограмма оставалась малоинформативной, некоторое снижение фибриногена и удлинение ТВ характерно для пациентов с гемолизом вследствие потребления этого белка [163]. Обращают на себя внимание два пациента ГД и ГМ, снижение ПИ по Квику связано с врожденным дефицитом FVII у этих пациентов.

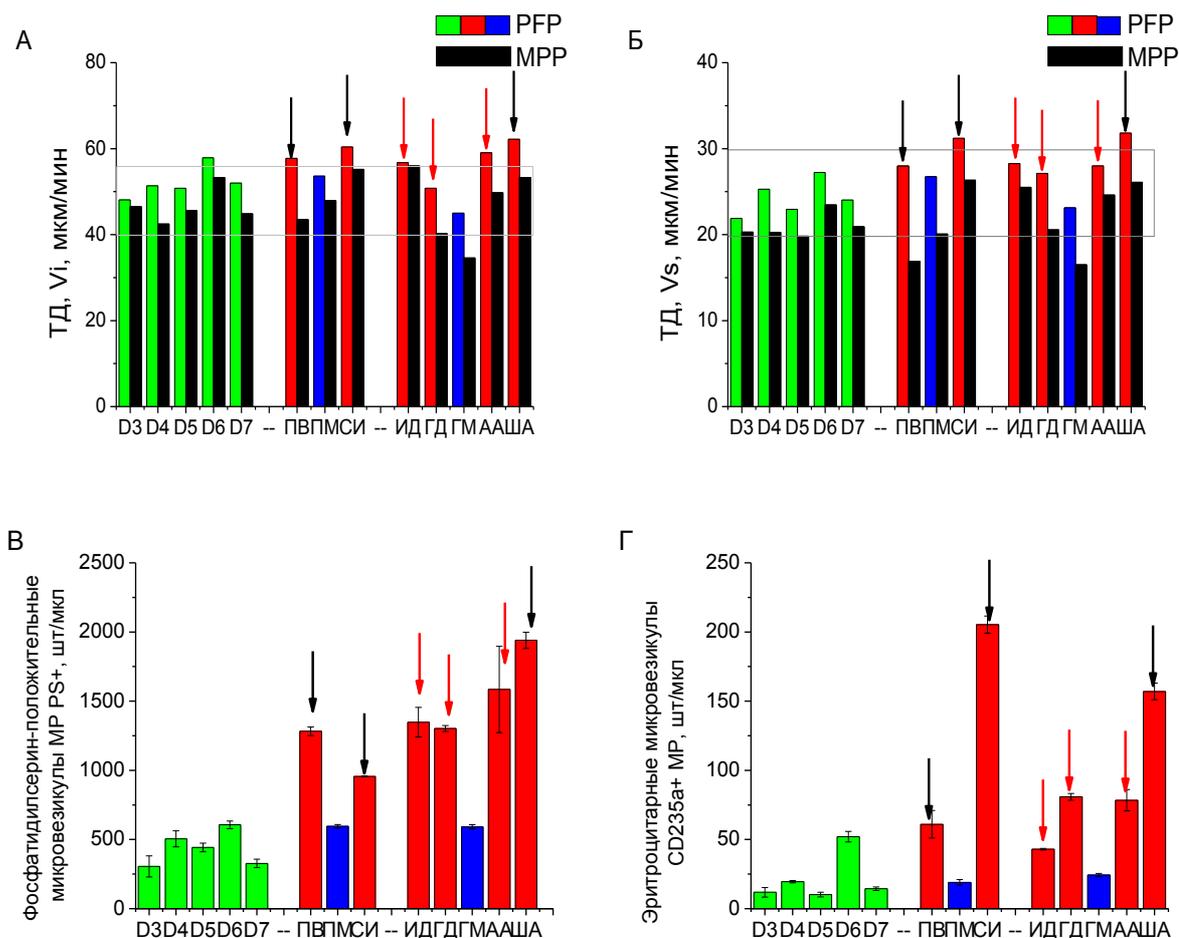


Рисунок 8. Параметры тромбодинамики (V_i и V_s) и концентрации фосфатидилсерин-положительных микровезикул (PS⁺ MP) и эритроцитарных микровезикул (CD235a⁺ MP) для здоровых доноров (D3-D7), пациентов с наследственным сфероцитозом (ПВ, ПМ, СИ) и пациентов с большой формой β -талассемии (ИД, ГД, ГМ, АА, ША), сравнение плазмы богатой везикулами (PFP) и плазмы, очищенной от везикул (MPP). Тяжелые пациенты выделены красным цветом, легкие – синим, доноры – зеленым.
 *черной стрелкой обозначено тяжелое течение заболевания
 ** красной стрелкой обозначены пациенты с сохранением гемолиза после спленэктомии

Количество микровезикул, оцененное с помощью проточной цитометрии (PS⁺ MP мечены с помощью аннексина-V, эритроцитарные MP мечены с помощью гликофорина CD235a⁺) представлено в виде диаграммы на рисунке 8 В и Г. Нормы для содержания микровезикул оценены на 5

здоровых взрослых добровольцах.

Мы видим самое большое количество фосфатидилсерин-положительных везикул у тех пациентов, у которых наблюдалась гиперкоагуляция по ТД (рис 8 А и Б). Выделяется пациент ГД, однако, отсутствие гиперкоагуляции у этого пациента связаны с сопутствующей коагулопатией (снижение концентрации фактора FVII до 1,5%). Общий уровень как всех прокоагулянтных МР, так и эритроцитарных МР у пациентов значительно выше, чем у здоровых добровольцев.

В сравнении исходной плазмы и плазмы, очищенной от везикул, мы видим снижение скоростей роста сгустка, как для доноров, так и для пациентов с анемиями (рисунок 8 А и Б). Разница между стационарной скоростью сгустка в PFP и MPP у пациентов несколько больше, чем у доноров, что говорит о большем вкладе МР в свертывание у пациентов, однако разница не достоверна. У многих пациентов в MPP сохраняются скорости роста сгустка выше скоростей в MPP нормальных доноров, что указывает на наличие дополнительных факторов гиперкоагуляции у пациентов, отличных от микровезикул. Пациенты с наличием гиперкоагуляции в среднем имеют повышенные концентрации как PS+, так и CD235a+ везикул по сравнению со здоровыми добровольцами, при этом концентрация МР коррелирует с тяжестью состояния и степенью гемолиза, а также с повышением скоростей роста сгустка (рисунок 9).

Разница стационарной скорости между PFP и MPP у пациентов больше, что указывает на больший вклад микровезикул в свертывание у пациентов с гемолитическими анемиями по сравнению с нормой (рисунок 8 А и Б).

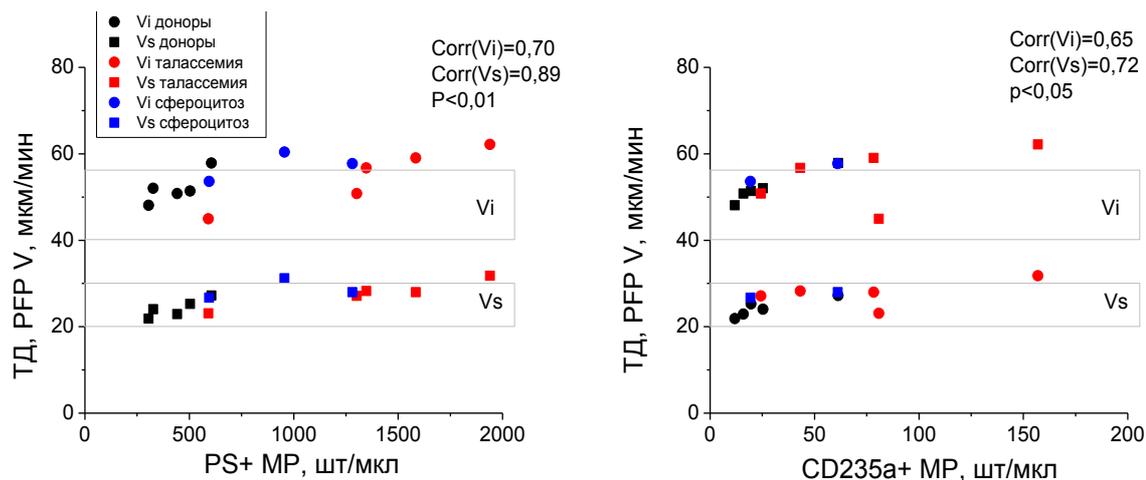


Рисунок 9. Параметры тромбодинамики (Vi и Vs) в зависимости от естественной концентрации фосфатидилсерин-положительных микровезикул (PS+ MP) и эритроцитарных микровезикул (CD235a+ MP) для здоровых доноров, пациентов с наследственным сфероцитозом и пациентов с большой формой β-талассемии.

3.5.2. Качественные характеристики микровезикул у пациентов с гемолитической анемией и у здоровых добровольцев.

Для оценки прокоагулянтной активности MP, MP пациентов и здоровых доноров были сконцентрированы в 5-6 раз по сравнению с исходной концентрацией путем центрифугирования.

Далее была проведена титровка на MPP пуле нормальной плазмы с добавлением от самой высокой концентрации до 0 (добавление буфера А), примерно с шагом 2. Концентрация MP была оценена с помощью проточной цитометрии. Результаты в виде усредненных кривых интерполяции для разных концентраций представлены на рисунке 10.

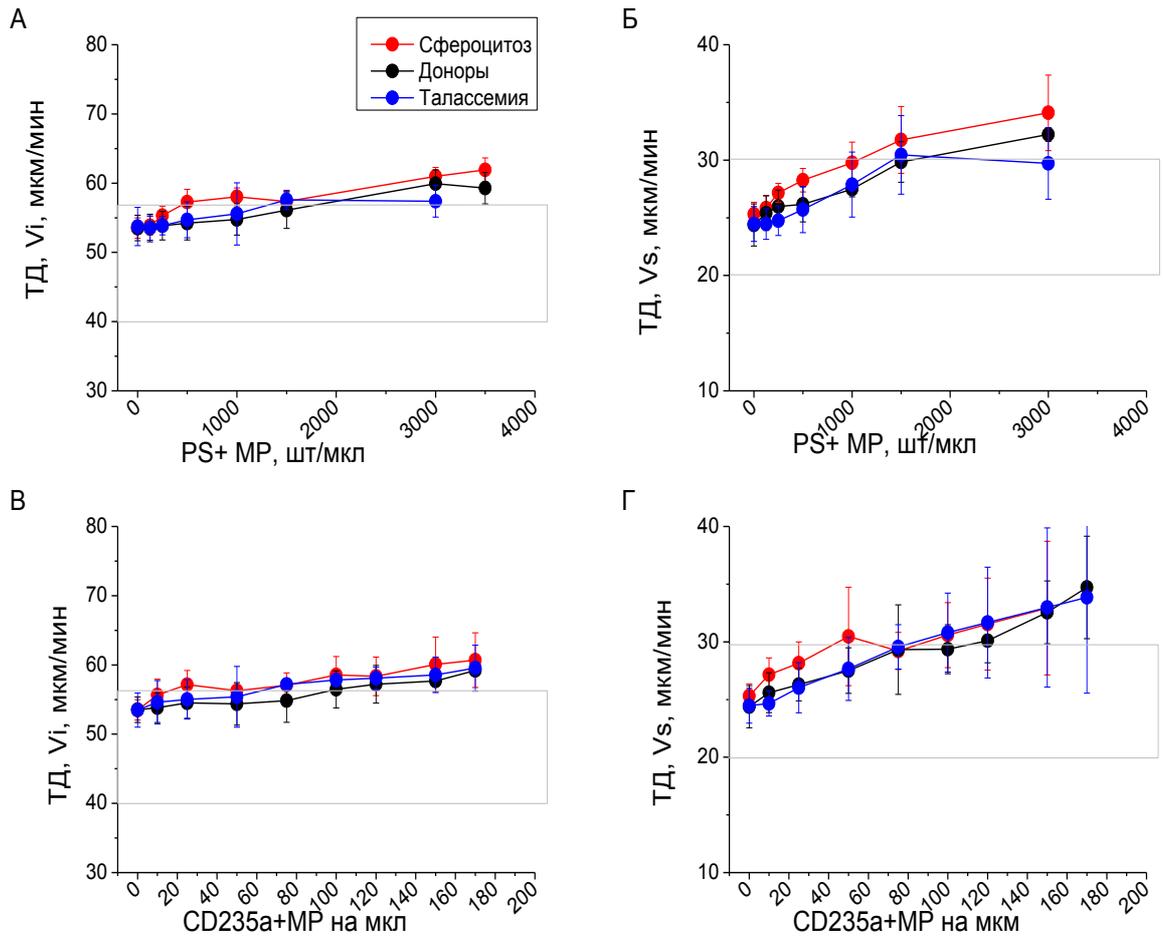


Рисунок 10. Параметры тромбодинамики (V_i и V_s) в зависимости от концентрации фосфатидилсерин-положительных микровезикул (PS+ MP) – А и Б - и от концентрации эритроцитарных микровезикул (CD235a+ MP) – В и Г - для здоровых доноров (черная кривая – усредненная интерполяция для 5 доноров), пациентов с наследственным сфероцитозом (красная кривая – усредненная интерполяция для 3 пациентов) и пациентов с β -талассемией (синяя кривая – усредненная интерполяция для 5 пациентов).

Активность микровезикул пациентов и доноров сравнивали на основе титровок в ТД. В среднем достоверного различия в зависимости скоростей от концентрации МР между донорами и пациентами не наблюдается.

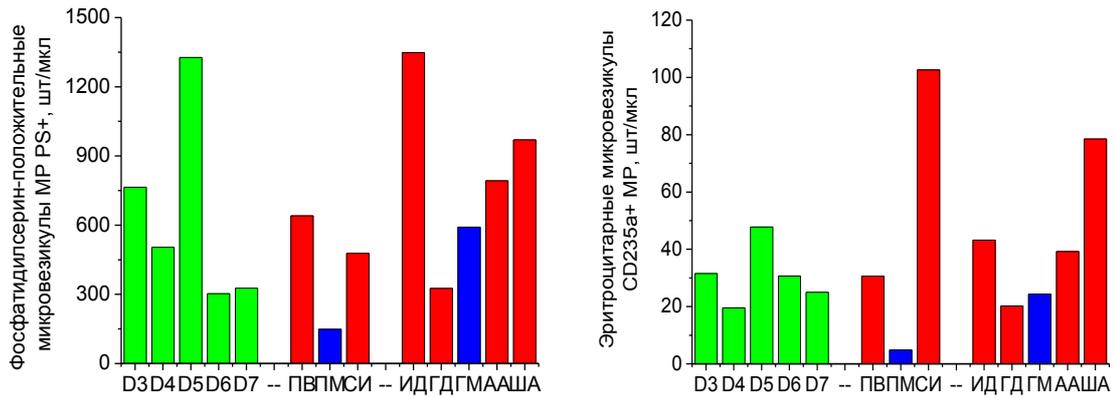
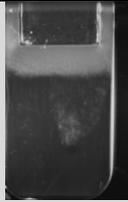
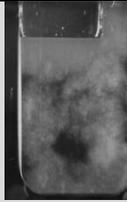
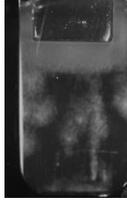
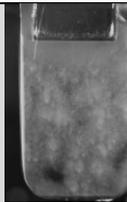


Рисунок 11. Концентрации фосфатидилсерин-положительных микровезикул (PS+ MP) и эритроцитарных микровезикул (CD235a+ MP) для здоровых доноров (D3-D7), пациентов с наследственным сфероцитозом и пациентов с β -талассемией, которые вызывают образование спонтанных сгустков в тесте тромбодинамика. Тяжелые пациенты выделены красным цветом, легкие – синим, доноры – зеленым.

Также не наблюдается различий в концентрациях микровезикул, при которых образуются спонтанные сгустки (рисунок 11). Характерные фотографии спонтанных сгустков в зависимости концентрации микровезикул для пациентов с тяжелым и стабильным состоянием, а также для здорового донора представлены в таблице 7. Таким образом, качественная разница между активностью MP доноров и пациентов отсутствует, отличается только количество MP.

Таблица 7. Характерные фотографии спонтанных сгустков на 60 минуте эксперимента в зависимости от концентрации микровезикул.

Степень концентрации *	0	0,5x	1x	3x
Пациент СИ (тяжелое течение)				
концентрация микровезикул, шт/мкл	0	478	956	2867
Пациент ГМ (стабильное состояние)				
концентрация микровезикул, шт/мкл	0	296	592	1775
Донор D6				
концентрация микровезикул, шт/мкл	0	221	442	1327

* степень концентрации МР в х раз относительно концентрации в плазме равной 1х

3.6. Состояние системы гемостаза у пациентов с ПНГ на терапии экулизумабом

В течение первых трех суток с момента поступления и до назначения терапии пациенты проходили обследование. До начала терапии все пациенты находились в состоянии гемолитического криза. При этом была существенно повышена активность ЛДГ (min-max=1874-7106 Ед/л при норме 208-378 Ед/л, а уровень гемоглобина (Hb) существенно понижен до 40-71 г/л при норме 130-160 г/л. Показатели стандартной коагулограммы АЧТВ (min-max=27-34 сек при норме 25-37 сек), ТВ (min-max=17-19 сек при норме 15-19 сек), ПИ по Квику (min-max=70-94 сек при норме 80-132 %), Фибриноген (min-max=1,4-4 мг/мл при норме 2-4,5 мг/мл), находились в пределах нормы или даже гипокоагуляции у всех пациентов. У пациентов А и В был повышен уровень D-димера до 1096 и 3122 мкг/мл соответственно при норме до 500 мкг/мл, что характерно для больных ПНГ в состоянии гемолитического криза, тогда как у пациента С он был в норме. Параметр угол α в ТЭГ у пациентов А и В находился в области гиперкоагуляции (59,5 и 41,3 град при норме 20-40 град); у пациента С он был в норме. ЭТП в тесте ТГТ находился в области нормы у всех пациентов. Параметр Vs в методе ТД был повышен у всех пациентов (min-max=31-32 мкм/мин при норме 20-29 мкм/мин). До начала терапии все пациенты находились в состоянии гемолитического криза. При этом была существенно повышена активность ЛДГ (min-max=1874-7106 Ед/л при норме 208-378 Ед/л, а уровень гемоглобина (Hb) существенно понижен до 40-71 г/л при норме 130-160 г/л.

Клинико-лабораторные характеристики всех трех пациентов (перманентный гемолиз, гемолитические кризы 1-2 раза в месяц, понижение гемоглобина до 40 г/л, спастические боли в животе без признака тромбозов по УЗДГ, сопровождающие гемолитические кризы лихорадка, слабость и

головные боли, а в связи с этим высокий риск тромбоза и трансфузионная зависимость) явились показанием для назначения экулизумаба.

Экулизумаб - это моноклональное антитело, которое блокирует расщепление C5 компонента комплемента, тем самым предотвращая опосредованный лизис эритроцитов, уменьшая внутрисосудистый гемолиз, гемоглобинурию и потребность в трансфузиях компонентов крови у пациентов с ПНГ. Применение экулизумаба для терапии ПНГ приводит к снижению частоты гемолитических кризов и частоты необходимых трансфузий в 3 раза. По данным литературы экулизумаб также предупреждает развитие тромбозов у больных с ПНГ [22,164–167].

Экулизумаб вводился в лечебной дозе 600 мг 1 раз в неделю (в течение 4 недель) в виде инфузии в течение 45 минут. Забор крови проводили за день до и через 1-2 дня после введения экулизумаба.

У пациента А первые 3 введения препарата происходили на фоне антикоагулянтной терапии НМГ эноксапарином в дозе 0,3 мг 2 раза в день, назначенной в связи с сохранением острого гемолиза и высокой концентрацией D-димеров. Забор крови проводили перед очередным введением антикоагулянта во всех точках, кроме третьего введения. В этой пробе кровь была взята через час после введения НМГ, поэтому данная точка была исключена из исследования.

Мы наблюдали снижение активности ЛДГ в течение первого месяца этой терапии у всех троих пациентов (таблица 8, $p < 0,05$), что свидетельствует о снижении гемолитической активности. Отличительной чертой пациента В являлось то, что у него уровень ЛДГ не снизился сразу же после первого введения экулизумаба, но постепенно достиг верхней границы нормы (таблица 8). Показатели гемоглобина все еще оставались низкими и не достигали границ нормы у всех пациентов, что также характерно для пациентов с ПНГ на терапии экулизумабом.

Таблица 8. Динамика лабораторных тестов в первый месяц терапии пациентов с ПНГ экулизумабом

Тест	Референ- сные значени я	1 введение		2 введение		3 введение		4 введение		P*	
		до	посл е	до	после	до	после	до	после		
<i>Пациент А</i>											
АЧТВ, сек	25-37	35	40	41	40	-	-	38	39	0,29	
ПИ по Квику, %	80-132	66	73	57	76	-	-	87	87	0,83	
ТВ, сек	15-19	16	18	17	18	-	-	17	16	0,22	
Фибриноген, мг/мл	2-4,5	2,3	1,6	1,6	1,3	-	-	2	2	0,59	
D-димер, мкг/мл	0-500	497	65	97	62	-	-	100	88	0,07	
ТЭГ	α, град	18-40	61,4	26,4	52,4	-	-	-	53,2	49,3	0,29
ТГТ	ЭП, нМ*ми н	800- 1560	1275	1891	1026	2175	-	-	1213	1424	0,14
ТД,	Vs, мкм/м ин	20-29	35	28	29	30	-	-	37	34	0,29
ЛДГ, Ед/л	208- 378	7106	4771	1809	971	-	565	-	-	0,86	
Гемоглобин, г/л	130- 160	51	-	-	67	64	64	-	-	0,37	
<i>Пациент В</i>											
АЧТВ, сек	25-37	38	39	37	52	36	41	37	37	0,11	
ПИ по Квику, %	80- 132	87	97	105	92	93	94	94	93	1,00	
ТВ, сек	15-19	18	17	18	19	17	17	16	17	1,00	
Фибриноген, мг/мл	2-4,5	2,5	3,1	2,5	2	2,1	2	2,1	2,2	0,66	
D-димер, мкг/мл	0-500	244	861	229	115	138	144	91	79	0,89	
ТЭГ	α, град	18-40	39,3	40,7	53,7	38,7	34,9	39,8	34	39,7	0,47
ТГТ	ЭП, нМ*ми н	800- 1560	2922	1433	1385	1498	1650	1387	1277	1700	0,89

ТД,	Vs, мкм/мин	20-29	27	25	27	24	27	25	23	30	0,88
ЛДГ, Ед/л		208-378	1472	1486	1219	865	749	546	536	516	0,89
Гемоглобин, г/л		130-160	77	54	74	70	84	64	86	87	0,31
<i>Пациент С</i>											
АЧТВ, сек		25-37	29	30	32	27	30	32	29	31	0,88
ПИ по Квику, %		80-132	81	98	84	98	93	97	88	85	0,11
ТВ, сек		15-19	16	18	17	18	15	17	17	16	0,22
Фибриноген, мг/мл		2-4,5	2,4	2	1,6	2,3	2	1,8	2	2	1,00
D-димер, мкг/мл		0-500	214	250	270	273	282	229	217	103	0,89
ТЭГ	α, град	18-40	37,3	44,4	43,4	41,9	28,5	45,4	48	26,8	1,00
ТГТ	ЭТП, нМ*мин	800-1560	-	1205	-	1284	1145	1071	1201	1392	0,49
ТД,	Vs, мкм/мин	20-29	31	35	31	30	27	33	29	25	0,66
ЛДГ, Ед/л		208-378	3173	-	980	791	573	430	-	406	0,19
Гемоглобин, г/л		130-160	75	92	71	75	80	72	-	79	0,72

* для расчета использовали парный критерий Вилкоксона для точек до и после введения экулизумаба

У всех пациентов стандартные коагулологические тесты не изменялись ($p^* > 0,05$) в точках до и после введения экулизумаба, находясь в области нормы или даже в области гипокоагуляции. Концентрация D-димера повышалась у пациента В после 1-ого введения экулизумаба и далее нормализовывалась (при этом угол α в ТЭГ был повышен, а ЭТП и Vs оставались в норме). Параметры глобальных тестов оценки системы гемостаза также не изменялись ($p^* > 0,05$) у всех троих пациентов (таблица

8). Параметр ТЭГ α периодически был повышен у всех троих пациентов (в 66, 25 и 63% измерений для пациентов А, В и С, соответственно).

Параметр ЭТП в ТГТ периодически был повышен у двоих пациентов (у пациента А в 33% измерений, у пациента В в 38% измерений). У всех пациентов показатель ТД Vs периодически находился в области гиперкоагуляции (в 66%, 12% и 63% измерений для пациентов А, В и С, соответственно). При этом в 9 из 17 случаев гиперкоагуляция была выявлена сразу по обоим тестам.

Клинические симптомы гемолитического криза (гемоглобинурия, слабость, лихорадка, желтушность кожных покровов и склер, спастические боли в области живота) сохранялись у пациентов в течение первой недели терапии. В качестве побочных эффектов от введения препарата у двух пациентов (А и С) была отмечена тошнота и головная боль, у пациента А отмечалась ноющая боль в конечностях. При дальнейшей терапии экулизумабом в течение 4х недель самочувствие пациентов постепенно улучшалось, в итоге через месяц исчезли клинические проявления гемолитического криза и признаки гемоглобинурии.

Со второго месяца терапии, в соответствии с протоколом, пациентов перевели на поддерживающую терапию экулизумабом в дозе 900 мг 1 раз в 2 недели (инфузия в течение 45 минут). Забор крови проводили в день введения экулизумаба (до введения) 2 раза в месяц в течение первых 4 месяцев и далее 1 раз в месяц.

У всех пациентов стандартные коагулологические тесты не изменялись ($p > 0,05$) на протяжении всей терапии экулизумабом, находясь в области нормы или даже в области гипокоагуляции: АЧТВ(min-max=32-42 сек при норме 25-37 сек), ТВ(min-max=16-20 сек при норме 15-19 сек), ПИ по Квику (min-max=56-130 сек при норме 80-132 %), Фибриноген(min-max=1,5-2,9 мг/мл при норме 2-4,5 мг/мл).

Полная картина изменений некоторых лабораторных показателей пациентов с ПНГ, находившихся на длительной терапии экулизумабом, представлена на рисунке 12. Динамика коагулологических параметров глобальных тестов в течение первого и следующих месяцев на терапии сохранялась аналогичной.

Параметр ТЭГ α периодически был повышен у всех троих пациентов (в 55, 10 и 60% измерений для пациентов А, В и С, соответственно). Параметр ТГТ ЭТП периодически был повышен у всех троих пациентов (в 25, 40 и 10% измерений для пациентов А, В и С, соответственно). У всех пациентов показатель ТД Vs периодически находился в области гиперкоагуляции (в

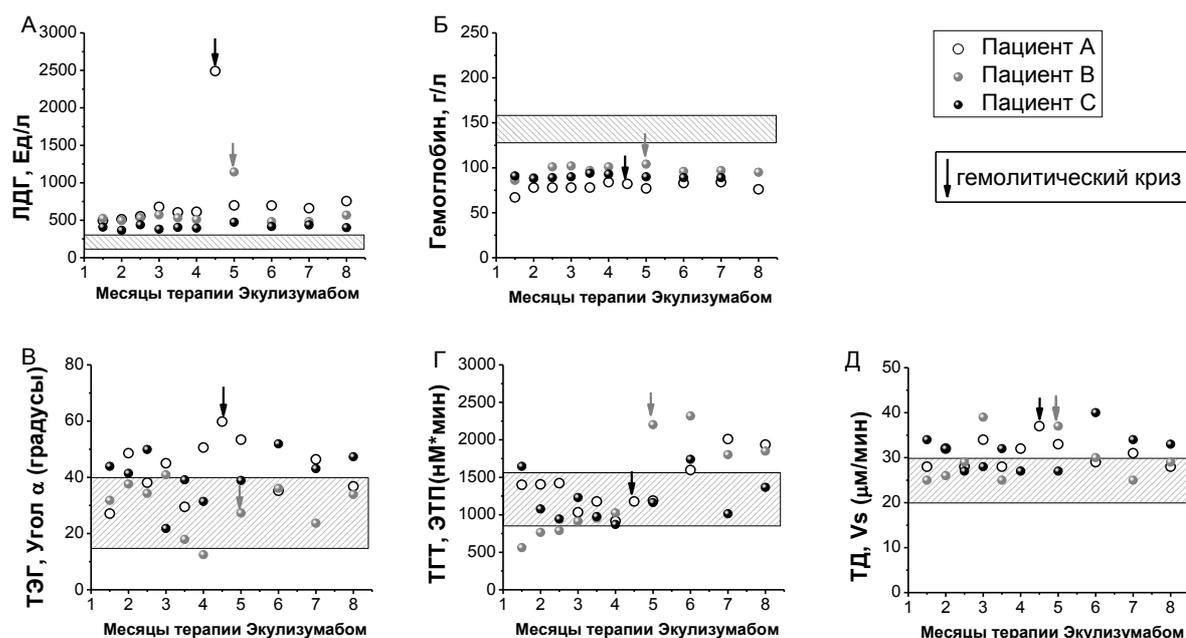


Рисунок 12. Динамика ЛДГ (А), гемоглобина (Б), параметра α в тесте ТЭГ (В), параметра ЭТП в тесте ТГТ (Г) и параметра Vs в тесте ТД (Д) у пациентов в течение 8 месяцев терапии экулизумабом. Серая заштрихованная область – диапазон нормальных значений. Два гемолитических криза произошли за период наблюдения – у пациента А (черная стрелка) и у пациента В (серая стрелка).

55%, 30% и 60% измерений для пациентов А, В и С, соответственно (рисунок 12). При этом в 10 из 20 случаев гиперкоагуляция была выявлена сразу по 2 тестам, а в 3 случаях – по всем трем глобальным тестам.

На третьем месяце терапии у пациента В наблюдался повышенный в 5 раз по сравнению с предыдущими значениями уровень D-димеров (515 мкг/мл при норме до 500 мкг/мл), при этом параметры всех глобальных тестов были в норме (рисунок 12).

На пятом месяце терапии экулизумабом у пациентов А и В повторился гемолитический криз с повышением ЛДГ, билирубинемией и ретикулоцитозом. В плазме крови отмечен гемолиз, выявлен положительный гемосидерин в моче и положительная прямая проба Кумбса, титр которой нарастал, что свидетельствует о роста антиэритроцитарных антител. Параметр α был повышен у пациента А и в норме у пациента В, ЭТП, наоборот, был в норме у пациента А и повышен у пациента В, V_s была повышена у обоих пациентов во время криза. Интересно отметить, что даже при отсутствии гиперкоагуляции по показателям глобальных тестов, сравнение с предыдущим измерением показывает усиление свертывания в 1,5-2 раза по параметрам интегральных тестов у обоих пациентов (рисунок 12).

3.7. Состояние системы гемостаза у пациентов с β -талассемией

3.7.1. Биофизические методы предсказания риска тромбоза у взрослого пациента с большой формой β -талассемии

Мы наблюдали пациента 45-ти лет с большой формой β -Талассемии, наследственным заболеванием, при котором нарушен синтез β -цепей гемоглобина, что ведет за собой повышенное разрушение эритроцитов, анемию и рост риска тромботических осложнений по сравнению с общей

популяцией. Пациент поступил в Гематологический научный центр с жалобами на слабость, бледность и абдоминальную боль.

При поступлении, а также в первой и второй точке коагулологического мониторинга (до спленэктомии) большинство коагулологических тестов пациента находилось в диапазоне нормальных значений, лишь АЧТВ указывало на гипокоагуляцию (таблица 9). У пациента наблюдалась тромбоцитопения. Тромбодинамика при поступлении демонстрировала увеличение начальной и стационарной (V_i и V_s , соответственно) скоростей роста сгустка, тем самым подтверждая известную прокоагулянтную активность гемостаза у пациентов с β -талассемией (таблица 9).

Таблица 9. Первые точки коагулологического мониторинга пациента с β -Талассемией (до терапии).

Тест	Референсные значения	1 точка	2 точка	3 точка	4 точка	5 точка	6 точка	7 точка
АЧТВ, сек	32-37	46	44	42	35	40	38	38
ПИ, %	70-130	78	81	60	92	73	68	69
ТВ, сек	12-19	18	17	15	15	16	15	15
Фибриноген, мг/мл	1,8-3,5	2,6	2,8	3,8	6,7	5,8	6,2	6
D-димер, мкг/мА	50-250	185	217	26780	4490	2695	-	2471
ТД, Плаг, мин	0,3-1,5	0,5	0,7	1	1,4	1,3	0,6	0,6
ТД, V_i , мкм/мин	36-56	59	57	59	64	65	61	66
ТД, V_s , мкм/мин	20-30	32	32	34	38	36	31	35
ТЭГ, R, мин	9-27	14,2	15,2	14,8	9,6	9,1	11	12,6
ТЭГ, K, мин	2-9	4,4	9,1	4,5	1,2	2,4	2,2	2,2
ТЭГ, α , град	22-58	37,2	23,8	40,5	72,3	59,8	63,3	63,9

Тест	Референсные значения	1 точка	2 точка	3 точка	4 точка	5 точка	6 точка	7 точка
ТЭГ, МА, мм	44-64	53,5	50	52,8	71,1	68,5	76,8	76,3
ЭТП, нМ*мин	950-1450	1035,5	1063,4	804,1	1219,2	963,1	617,5	970,8
Тромбоциты, (10 ⁹)клеток/л	180-320	60	55	24	176	-	456	830

На первые сутки после операции (3-я точка коагулологического мониторинга), пациент начал жаловаться на абдоминальные боли. Клоттинговые тесты (АЧТВ, ПИ) и ЭТП указывали на гипокоагуляцию. Параметры ТЭГ и ТВ были в области нормальных значений, в то время как по показаниям Тромбодинамики гиперкоагуляция сохранялась. После операции так же существенно возросли концентрации фибриногена и D-димеров (таблица 9).

Лабораторные тесты указывали на сохранение тромбоцитопении, гемолиза и анемии в первые дни после операции (таблица 9). Для уменьшения абдоминальных болей после операции пациенту был назначен тимеперидин (1 мл внутривенно) в дополнение к плановой анестезии в 1 г парацетамола 3 раза в день. Из-за низкого числа тромбоцитов (в среднем $121 \pm 52 \times 10^9$ клеток/л) и удлинённого АЧТВ антиагреганты и антикоагулянты в первые дни после спленэктомии назначены не были.

В следующих точках коагулологического мониторинга после спленэктомии, (точки 4-6), параметры Тромбодинамики находились в области гиперкоагуляции, концентрации фибриногена и D-димеров также сохранялись повышенными, указывая на протромботические факторы риска у пациента после спленэктомии. Начальная и стационарная скорости роста сгустка возрастали с 1 по 5 точку мониторинга. Параметры α и МА в ТЭГ оказались в области гиперкоагуляции на 4-ой точке мониторинга, что может

быть связано с резким повышением количества тромбоцитов (с 25×10^9 клеток/л до 176×10^9 клеток/л) и дальнейшим ростом их числа (таблица 9).

После 6-ой точки коагулологического мониторинга, когда количество тромбоцитов возросло до 456×10^9 клеток/л, была назначена профилактическая терапия дезагрегантами (ацетилсалициловой кислотой в дозе 100 мг в день). Профилактическая антикоагулянтная терапия была назначена на 8-ой точке коагулологического мониторинга.

В течение последующих точек коагулологического мониторинга (8-17) пациент находился на терапии антикоагулянтами (схема терапии пациента представлена на рисунке 6). Начиная с 8-ой точки мониторинга пациенту была назначена терапия НМГ бемипарином натрия в дозе 3500 Ед в день. У пациента сохранялся тромбоцитоз и в качестве антиагреганта был назначен

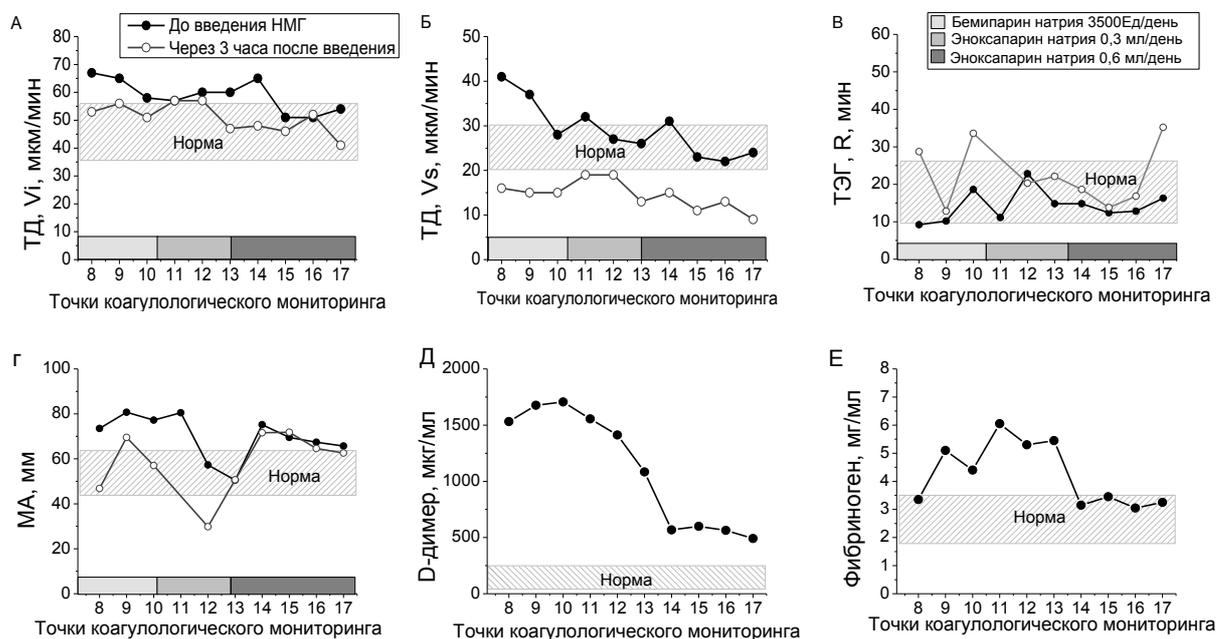


Рисунок 13. Динамика начальной Vi скорости (А) и автоволновой Vs скорости (Б) роста сгустка в ТД, динамика R(В) и МА(Г) в ТЭГ, а также концентрации D-димеров(Д) и фибриногена(Е) в ходе терапии пациента с большой формой β -талассемии низкомолекулярными гепаринами.

гидроксикарбамид в дозе 100 мг в день. Терапия эноксапарином натрия началась между 10 и 11 точками коагулологического мониторинга с дозы 0,3 мг в день. После 14-ой точки коагулологического мониторинга у пациента поднялась температура до 38,7°C, возник кашель. При аускультации прослушивались хрипы в нижних отделах легких, после чего была диагностирована пневмония.

Пациенту была назначена антибактериальная терапия, которая дала хороший эффект. После 14-ой точки на контрольной доплерографии брюшной полости был обнаружен тромбоз в просвете портальной и селезеночной вен. Тромбоз был бессимптомным, поэтому нет четкого представления о том, в какой именно день после спленэктомии он развился. В связи с обнаруженным тромбозом доза эноксапарина была повышена до 0,6 мг в день. Контрольная доплерография на седьмой день терапии эноксапарином (17-я точка коагулологического мониторинга) показала частичную реканализацию сосудов и, таким образом, разрешение тромбоза. Результаты исследования динамики показателей ТД, ТЭГ, D-димеров и фибриногена у пациента с большой формой β -талассемии представлены на рисунке 13.

Для оценки эффективности антикоагулянтной НМГ все тесты выполняли дважды в день, до введения и через 3 часа после введения НМГ. Как и ожидалось, стандартные клоттинговые тесты (АЧТВ, ТВ, ПИ) были не чувствительны к терапии НМГ и находились в норме (данные не представлены). Начальная и стационарная скорости роста сгустка показали статистическое значимое различие между точками до и через три часа после введения НМГ в течение всей терапии $P(V_i) = 0,007$, $P(V_s) < 0,001$ (рисунок 13 А и Б).

Параметры ТЭГ так же показывали свою чувствительность к терапии НМГ в течение всей терапии $P(R)=0,03$ и $P(MA)=0,03$ (рисунок 13 В и Г),

однако находились в основном в области нормальных значений до и после введения НМГ. Иногда параметр МА находился в области гиперкоагуляции, что может быть связано с нарастающим тромбоцитозом после операции (количество тромбоцитов составляло 840×10^9 клеток/л после 1-ого введения НМГ и 1692×10^9 клеток/л после 5-ого введения НМГ).

Таким образом, ТД и ТЭГ показывали эффект от введения НМГ через 3 часа после инъекции в виде уменьшения начальной и стационарной скоростей роста сгустка, что указывает на достигнутую гипокоагуляцию (рисунок 13).

В начале терапии антикоагулянтами начальная и стационарная скорости роста сгустка возвращались в область гиперкоагуляции через 24 часа после введения НМГ, указывая на сохранение тромботических рисков. На последних 3-х точках коагулологического мониторинга начальная скорость роста сгустка уже находится в области нормальных значений через 24 часа после введения НМГ, указывая на нормализацию состояния пациента на фоне терапии (рисунок 13 А и Б). Концентрации фибриногена и D-димеров постепенно снижались в течение терапии НМГ (рисунок 13 Д и Е).

3.7.2. Прогностические гиперкоагуляционные риски у пациентов детского возраста с β -талассемией

У пациентов с β -талассемией наблюдается статистически значимое снижение гемоглобина, повышение общего билирубина и активности ЛДГ по сравнению с группой условно здоровых детей, при этом наибольшие изменения в этих показателях характерны для более тяжелых форм, большой и промежуточной, что хорошо соотносится с известными данными об этом заболевании (рисунок 14).

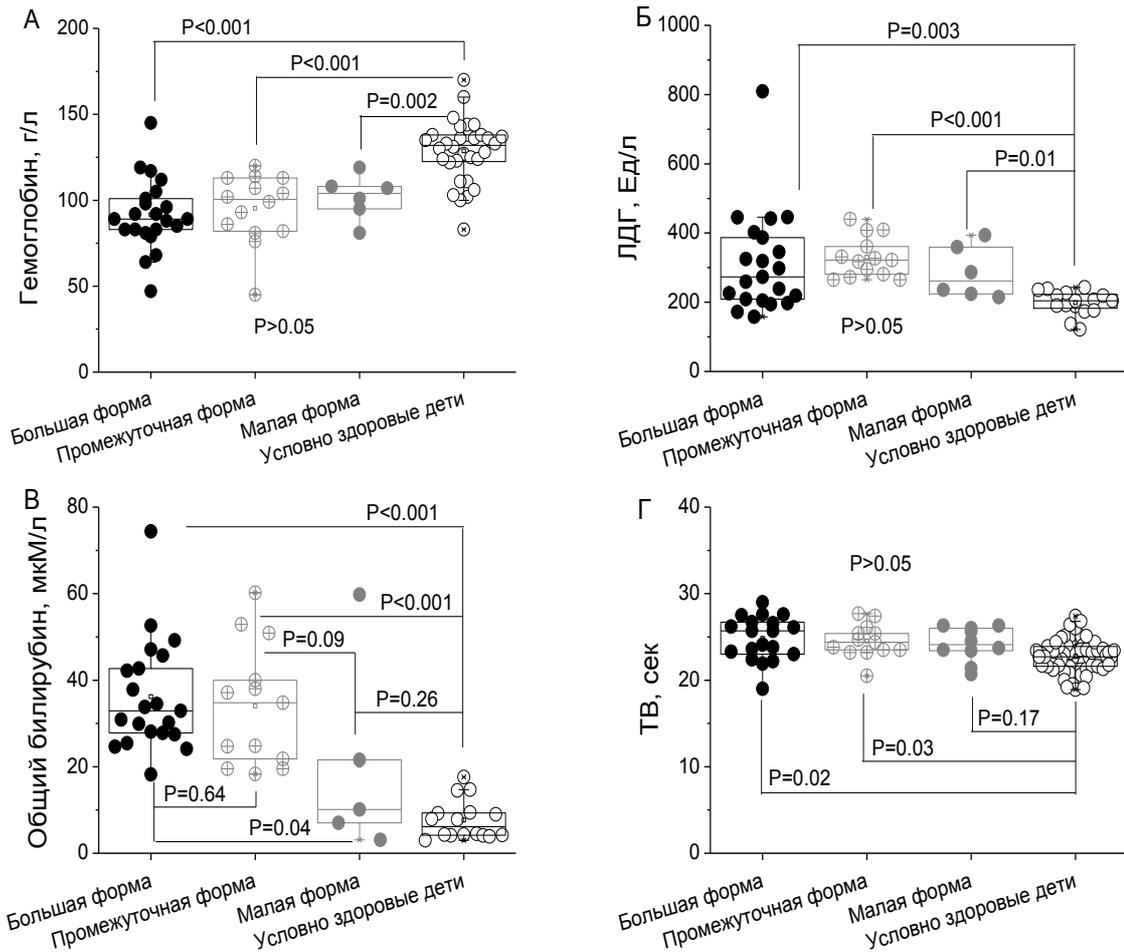


Рисунок 14. Показатели общего, биохимического анализа крови и стандартной коагулограммы у пациентов с β -талассемией по сравнению с контрольной группой (А – гемоглобин, Б – активность ЛДГ, В – общий билирубин сыворотки, Г – ТВ).

При малой форме наблюдается снижение гемоглобина, обычно она протекает практически бессимптомно, однако, как правило, дети, обратившиеся в клинику имеют изменения в общем анализе крови, соответственно в группу исследования были включены дети с признаками анемии при малой форме. При этом для одного пациента с малой формой β -талассемии характерен хронический гемолиз.

У пациентов с большой и промежуточной формой β -талассемии ТВ было несколько удлинено по сравнению с группой условно здоровых детей

(рисунок 14). Это связывают в первую очередь с некоторым потреблением фибриногена при гемолизе [163].

Стандартные клоттинговые тесты коагулограммы АЧТВ и ПИ по Квику не отличались ($p > 0,05$) у пациентов от контрольной группы и остаются неинформативны, находясь в норме (данные не представлены вследствие отсутствия информативности).

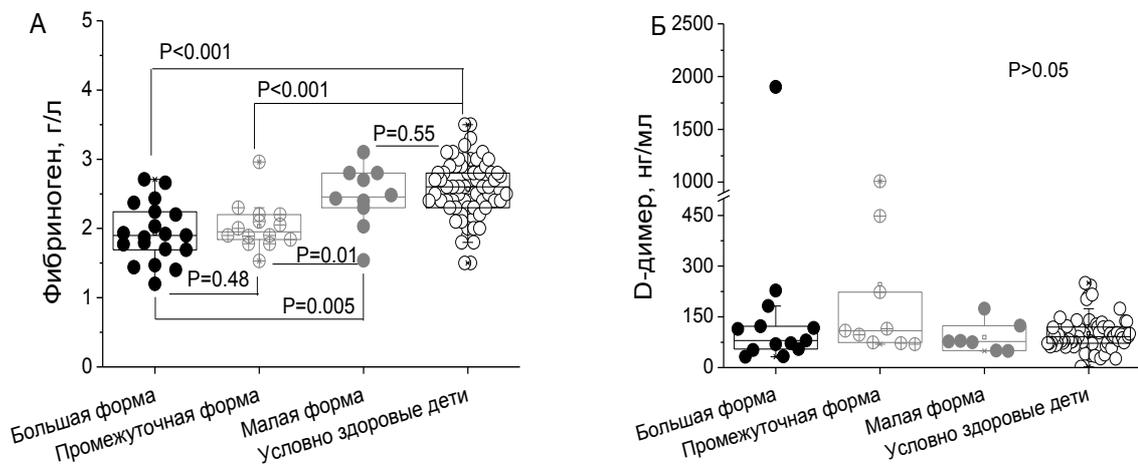


Рисунок 15. Показатели А – концентрация фибриногена и Б – концентрация D-димера у пациентов с β -талассемией по сравнению с контрольной группой.

Как отмечалась выше концентрация фибриногена была несколько снижена у пациентов с большой и промежуточной формой β -талассемии по сравнению со здоровой группой, в то время как в группе с малой формой наблюдался нормальный фибриноген, что хорошо соотносится с клинической картиной заболеваний. Также у некоторых пациентов с большой и промежуточной формой β -талассемии наблюдался всплеск маркера лизиса фибрина D-димера, что также подтверждает наличие патологического свертывания при этом заболевании (рисунок 15).

Глобальный тест ТЭГ позволяющий оценить вклад как плазменного, так и тромбоцитарного звена в состояние системы гемостаза показал

склонность к повышенному свертыванию пациентов с большой и промежуточной формой β -талассемии. Параметры ТЭГ R и k, которые связывают в большей степени с плазменным звеном свертывания, находятся в области гиперкоагуляции у пациентов с большой и промежуточной формой по сравнению с контрольной группой, пациенты с малой формой β -талассемии только по

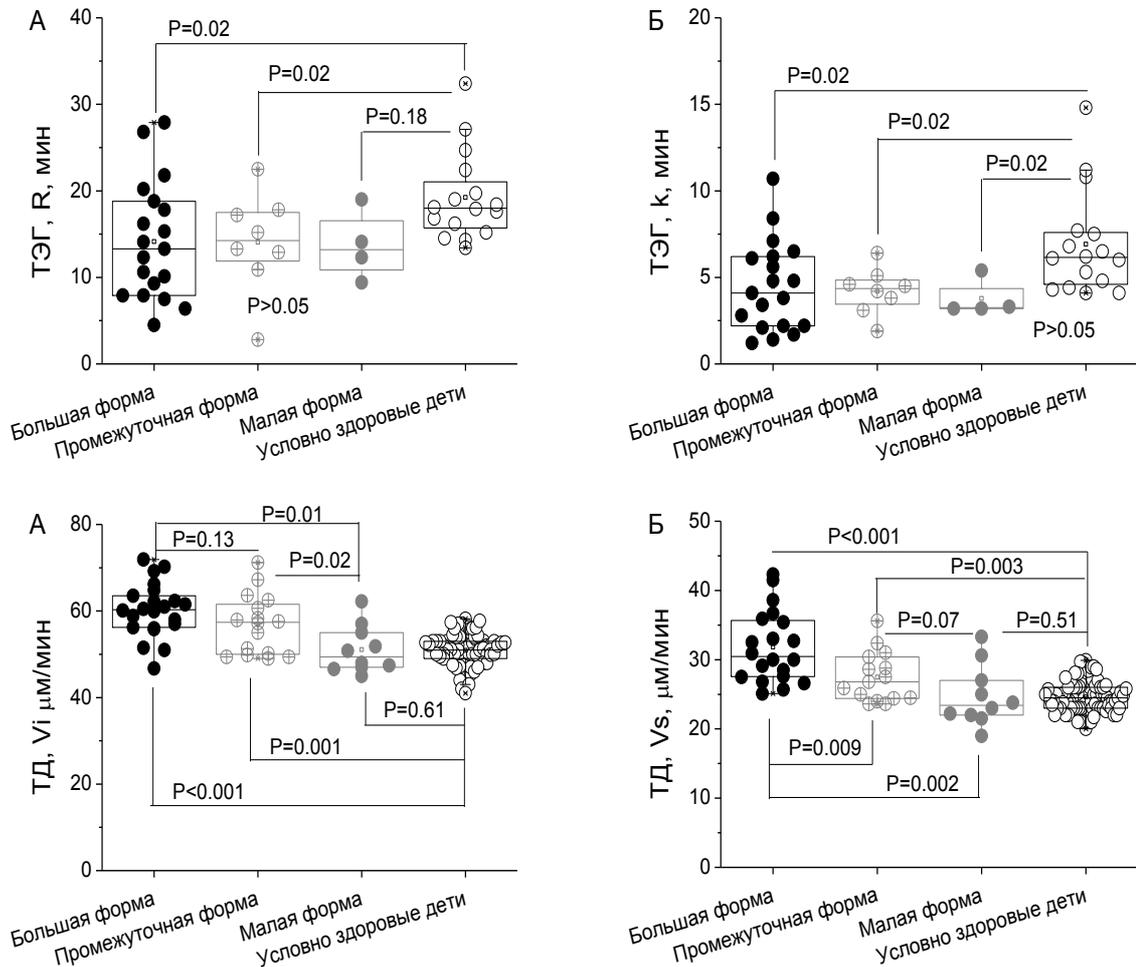


Рисунок 16. Параметры ТЭГ и ТД у пациентов с β -талассемией по сравнению с контрольной группой (А – время реакции R, Б – время образования сгустка k, В – начальная скорость роста сгустка Vi, Г – стационарная скорость роста сгустка Vs). *ТЭГ был выполнен не для всех пациентов.

параметру k отличались от группы здоровых детей (рисунок 16). Статистически значимая разница наблюдается с контрольной группой, в то время как разница между группами пациентов статистически не достоверная для ТЭГ.

Еще один глобальный тест системы гемостаза, ТД, позволяющий оценить пространственную динамику роста сгустка и вклад биофизических аспектов связанных с повышенными концентрациями циркулирующих МР, также показал наличие гиперкоагуляции по параметрам V_i и V_s у пациентов с большой и промежуточной формой по сравнению с контрольной группой, в то время как у пациентов с малой формой значения тромбодинамики не отличались от нормальной группы, что хорошо соотносится с литературными данными о возрастании риска тромбоза именно в группах с тяжелым течением заболевания [78,86].

Также параметры ТД V_i , V_s показывают статистически значимую разницу между группами пациентов, что также соотносится с клиникой заболевания (рисунок 16). У одного пациента с малой формой β -талассемии, у которого наблюдается хронический гемолиз, также наблюдаются высокие скорости роста сгустка V_i и V_s , что подтверждает связь повышенного гемолиза с возникновением тенденций к гиперкоагуляции. При наличии индивидуальных особенностей течения заболевания, пациенты с малой формой также требуют динамического наблюдения за состоянием системы гемостаза.

3.8. Состояние системы гемостаза у пациентов с наследственным сфероцитозом

Пациенты разбиты на две группы, в стабильном состоянии и в состоянии гемолитического криза. Гемолитический криз характеризовался клиническими симптомами в виде общего плохого самочувствия, желтухи и

бледности, слабости, одышки, болью в области подреберья и мезентриальными болями, в некоторых случаях также повышением артериального давления. При кризе в общем анализе у пациентов наблюдалось падение гемоглобина, повышение активности ЛДГ и повышение содержания билирубина в сыворотке крови (рисунок 17).

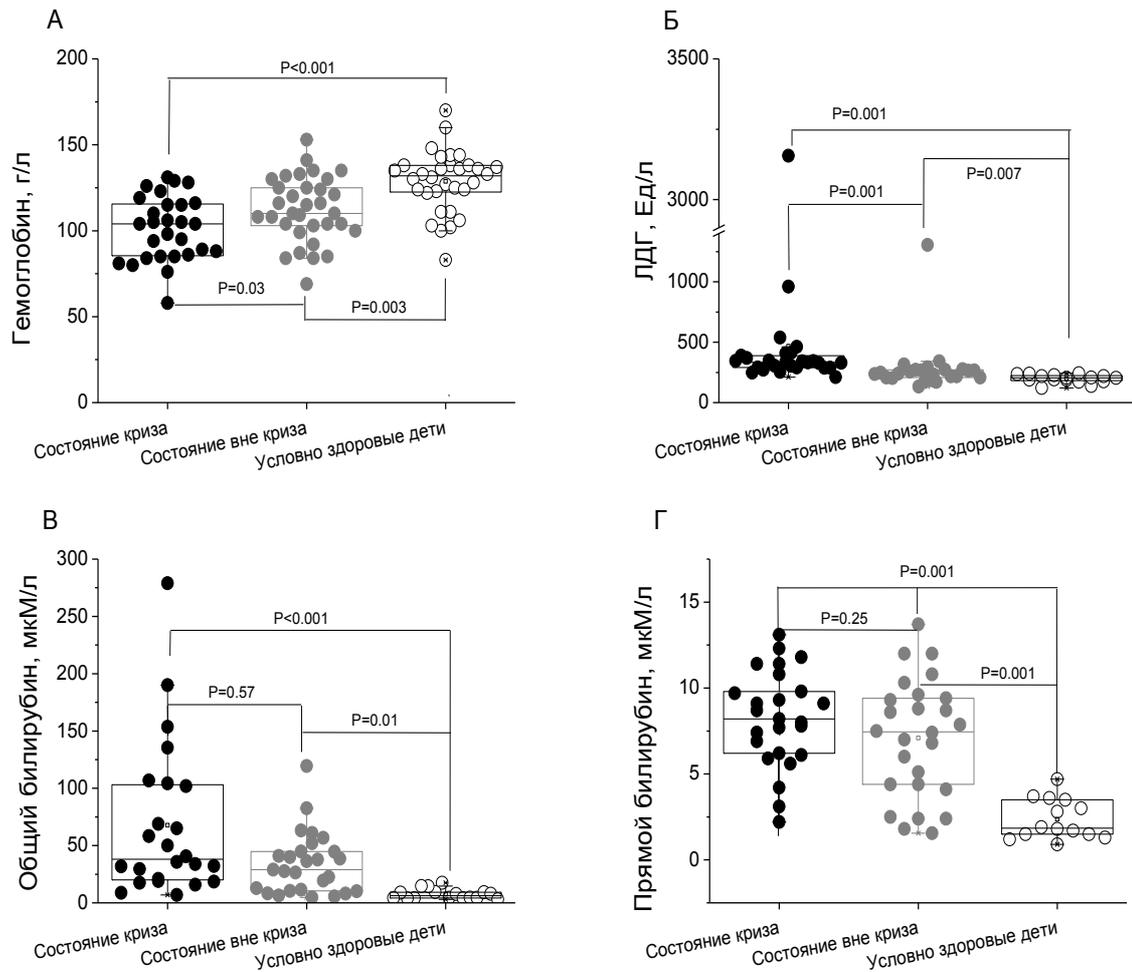


Рисунок 17. Показатели общего анализа крови у детей с наследственным сфероцитозом по сравнению с контрольной группой (А – гемоглобин, Б – активность ЛДГ, В – общий билирубин сыворотки, Г – прямой билирубин сыворотки). *На скобках указаны уровни значимости различий для соответствующих групп.

Стандартные клоттинговые тесты (АЧТВ, ТВ и ПИ по Квику) не отличались значительно от контрольной группы у пациентов в обеих группах (рисунок 18). У пациентов в состоянии гемолитического криза

наблюдались более короткие времена свертывания АЧТВ и ТВ, чем в группе условно здоровых детей, однако, параметры находились в диапазоне нормальных значений. Значения ПИ по Квику значимо не различались во всех трех группах.

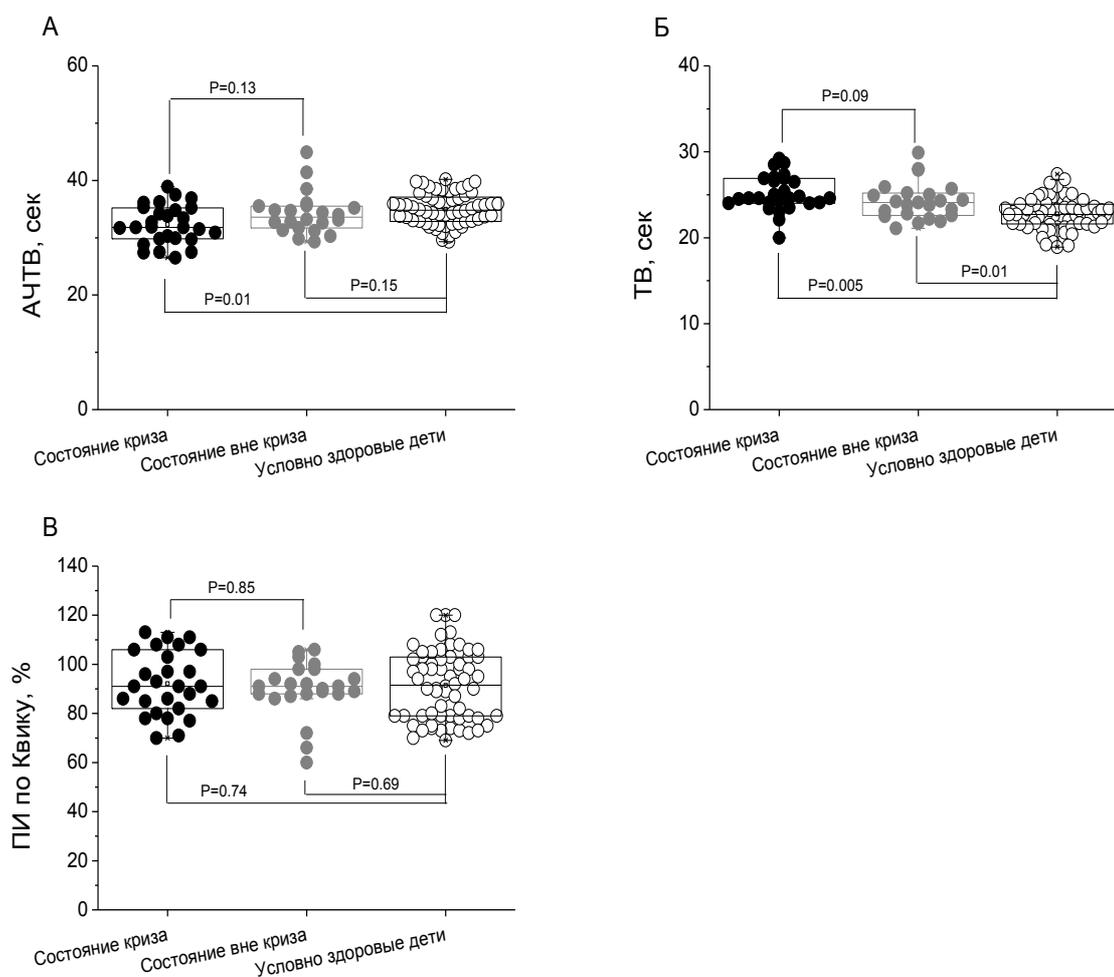


Рисунок 18. Показатели стандартных тестов свертывания крови (АЧТВ, ТВ и ПИ по Квику) у детей с наследственным сфероцитозом по сравнению с контрольной группой (А – АЧТВ, Б – ТВ, В – ПИ по Квику). На скобках указаны уровни значимости различий для соответствующих групп.

Глобальный тест ТЭГ, позволяющий оценить вклад как плазменного, так и тромбоцитарного звена в состояние системы гемостаза, показал склонность к повышенному свертыванию у всех пациентов с

наследственным сфероцитозом. Параметры ТЭГ пациентов (k и MA) находились в области гиперкоагуляции по сравнению с контрольной группой (рисунок 19). Статистически значимая разница наблюдалась как между пациентами и контрольной группой, так и между группами пациентов в состоянии гемолитического криза и в стабильном состоянии по параметру MA.

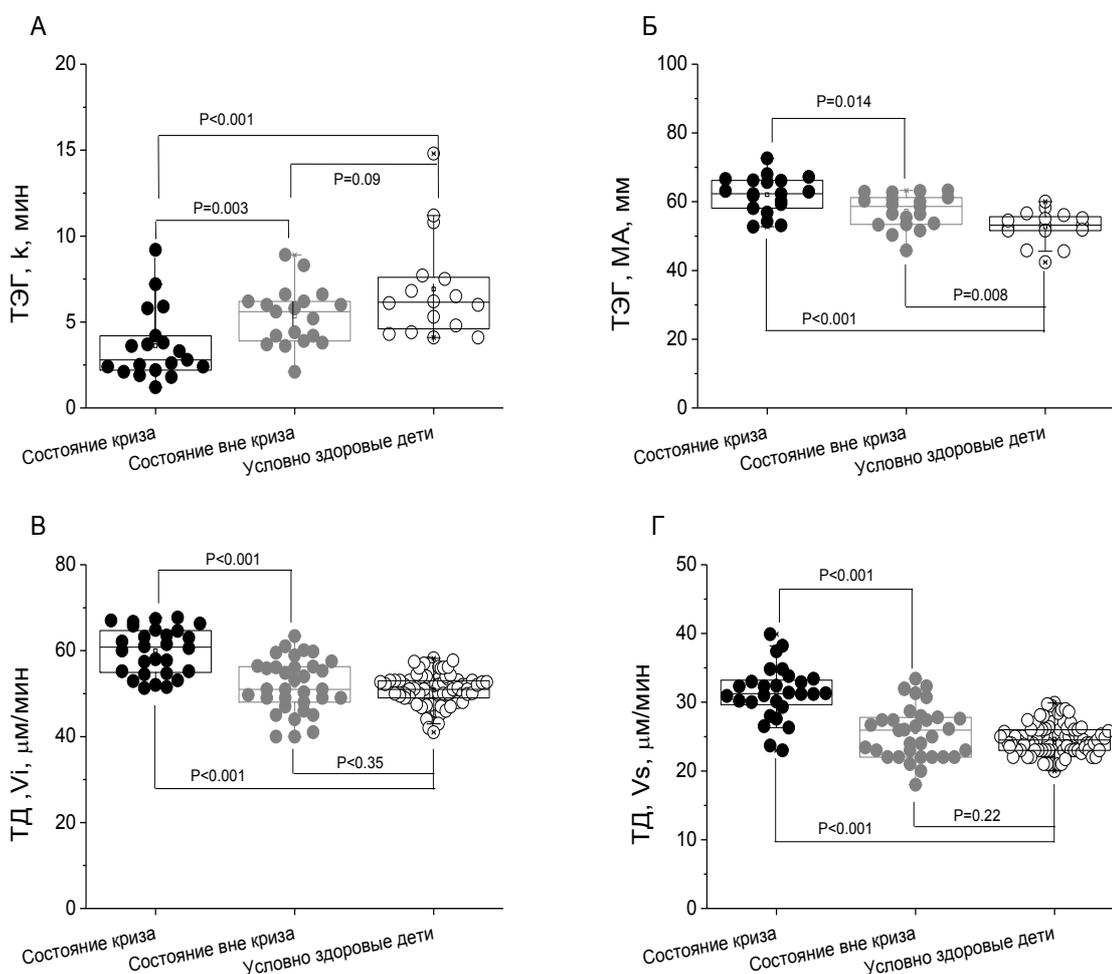


Рисунок 19. Параметры ТЭГ и ТД у детей с наследственным сфероцитозом по сравнению с контрольной группой (А – время образования сгустка k, Б – максимальная амплитуда МА, В – начальная скорость роста сгустка (Vi), Г – стационарная автоволновая скорость роста сгустка (Vs)). *ТЭГ был выполнен не для всех пациентов. На скобках указаны уровни значимости различий для соответствующих групп.

ТД, кротоя, как показана выше, чувствительна к повышенным концентрациям МР у пациентов с гемолизом за счет оценки автоволны распространения каскада свертывания крови, позволяющий оценить пространственную динамику роста сгустка, также показала наличие гиперкоагуляции по параметрам V_i и V_s у пациентов с наследственным сфероцитозом в состоянии гемолитического криза, что хорошо соотносится с литературными данными о возрастании риска тромбоза именно в момент криза, в то время как вне криза состояние близко к норме [20,21,30,99].

Параметры V_i и V_s показывают также статистически значимую склонность к повышенному свертыванию в группе пациентов во время криза по сравнению с группой пациентов вне гемолитического криза (рисунок 19).

Интересно, что концентрация фибриногена была несколько снижена у пациентов с анемией по сравнению со здоровой группой, что в литературе часто связывают с потреблением этого белка в процессах патологического свертывания при гемолизе [166].

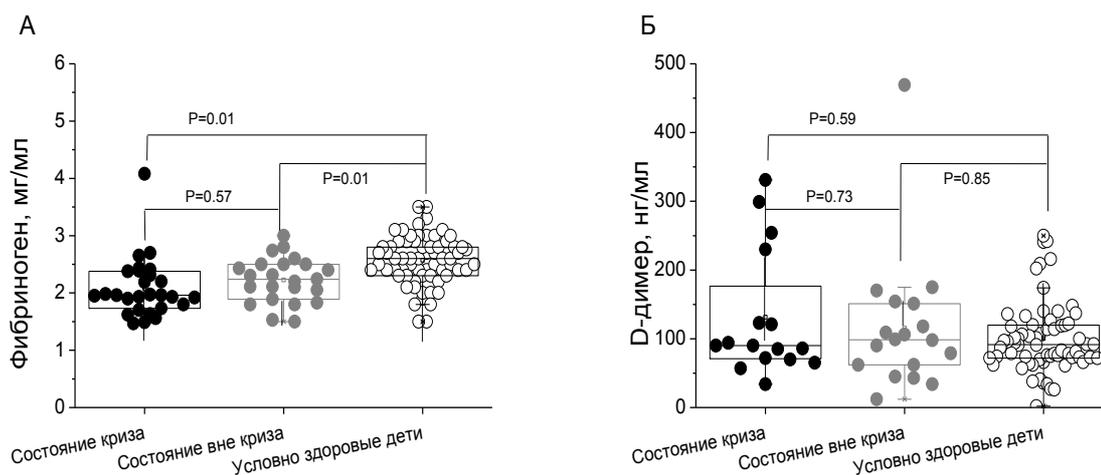


Рисунок 20. Показатели концентрации фибриногена (А) и концентрации D-димера (Б) у пациентов с гемолитической анемией по сравнению с контрольной группой. На скобках указаны уровни значимости различий для соответствующих групп.

У некоторых пациентов со сфероцитозом наблюдался всплеск маркера лизиса фибрина - D-димера, что также подтверждает наличие патологического свертывания при этом заболевании (рисунок 20).

3.9. Оценка автоволнового процесса свертывания крови позволяет выделить группы повышенного риска тромбоза среди пациентов с острым лимфобластным лейкозом

Частота тромбозов у детей с ОЛЛ может достигать 73% [43]. В данном исследовании включаем 73 ребенка в возрасте от 1 года до 17 лет (45 мальчиков, 28 девочек, медиана возраст 5 лет), проходящих лечение по протоколу ALL MB 2015 на базе ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева, значимые носовые кровотечения случились у 10 пациентов – 14% , все они связаны со снижением числа тромбоцитов менее 30 тысяч. Тромботическое осложнение на УЗИ зарегистрированы у 40 пациентов – 55%: 5 тромбозов симптоматические (9% от всех тромбозов) остальные асимптоматические катетер-ассоциированные тромбозы, обнаруженные на контрольном УЗИ области постановки ЦВК. Полученные клинические исходы хорошо согласуются с литературными данными.

Пациенты были разбиты на 2 группы, в которой были тромботические осложнения в процессе лечения (40 пациентов, 25 мальчиков и 15 девочек, медиана возраста 5 лет) и группа без осложнений (33 пациента, 20 мальчиков и 13 девочек, медиана возраста 7 лет). На рисунке 21 представлены результаты стандартных коагулологических тестов во всех точках забора крови у пациентов с ОЛЛ.

Статистически значимой разницы между группами в течение лечения нет ($P > 0,05$). У 51% пациентов, независимо от группы, наблюдается удлинение АЧТВ, связанное со снижением синтеза факторов свертывания в

связи с применением L-аспарагиназы в лечении пациентов. АЧТВ не чувствительно к снижению естественных антикоагулянтов. 63% точек у пациентов с ОЛЛ

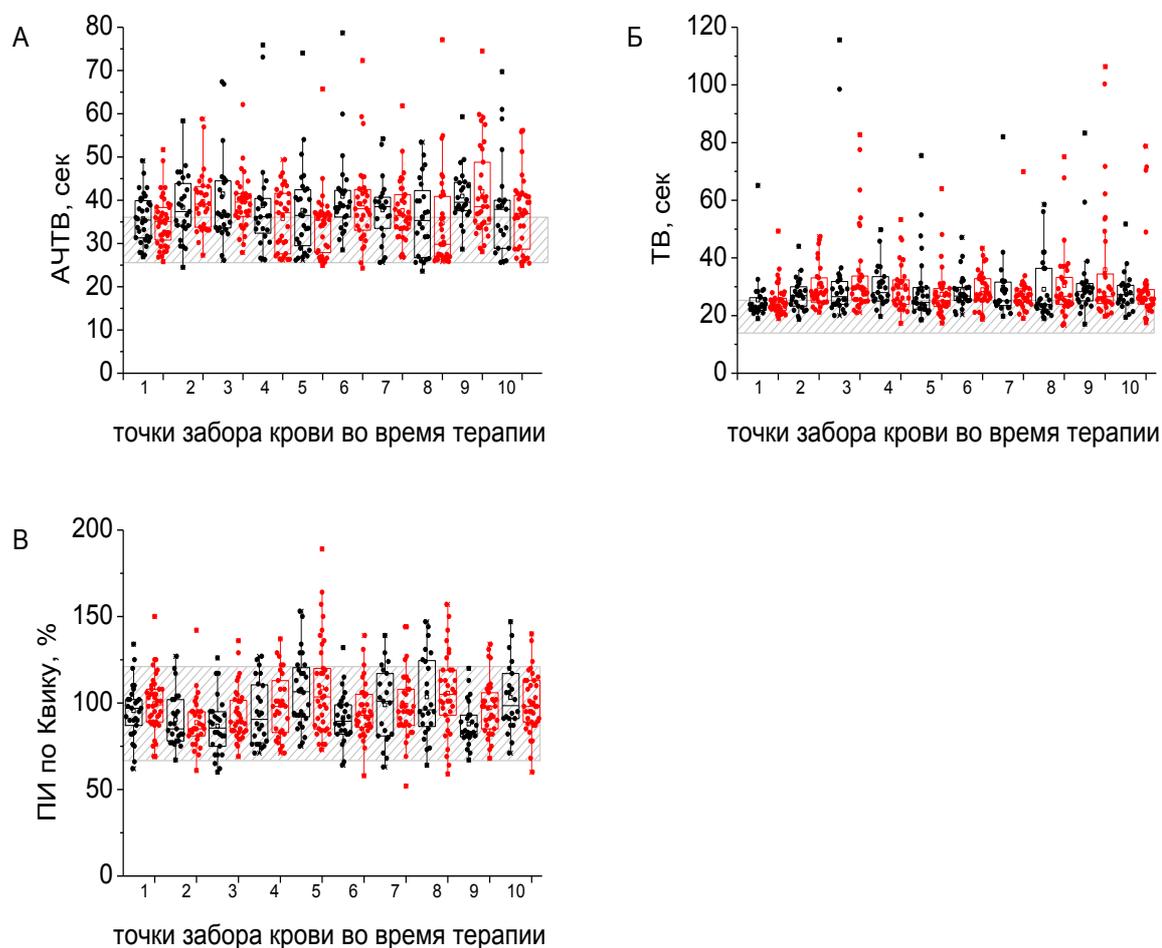


Рисунок 21. Стандартные коагулологические тесты у детей с ОЛЛ на фоне терапии. Черные точки – пациенты без тромбоза, красные точки – пациенты с тромбозом (А - АЧТВ, Б - ТВ, В - ПИ по Квику).

находились в области гипокоагуляции по тесту ТВ, в то время как по ПИ по Квику – только 4%, однако известно, что Протромбин по Квику мало чувствителен к минорным снижениям факторов свертывания, и даже при гепаринотерапии показывает нормальное значение из-за сильной активации

свертывания в тесте [10,147]. Интересно, что 12% точек пациентов находится в зоне повышенного свертывания по ПИ по Кивку, однако корреляции с автоволновым процессом в ТД не наблюдается (корреляция Пирсона=0,009, $p=0,022$).

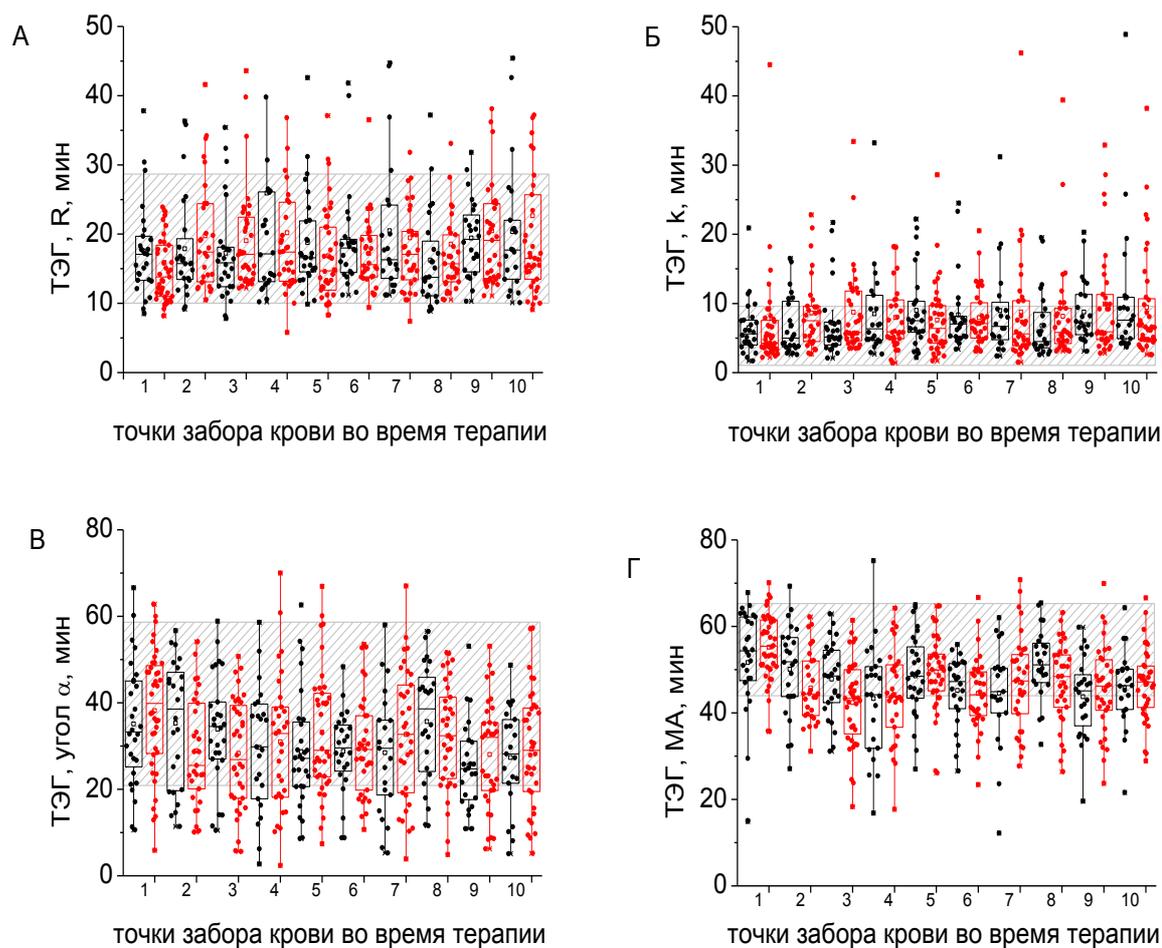


Рисунок 22. Показатели ТЭГ у пациентов с ОЛЛ. Черные точки – пациенты без тромбоза, красные точки – пациенты с тромбозом (А – время реакции R, Б – время образования сгустка к, В – угол α , Г – максимальная амплитуда МА).

На графиках рисунка 22 представлены значения параметров ТЭГ. Статистически значимой разницы между группами в течение лечения нет ($P>0,05$). Известно, что параметры ТЭГ, особенно МА сильно зависят от

общего числа клеток в крови, как тромбоцитов (рисунок 23 А), так и эритроцитов. Известно, что количество клеток крови часто снижается у пациентов на фоне терапии ALL МВ 2015, что связано с приемом препаратов. МА также коррелирует напрямую с концентрацией фибриногена в плазме, который тоже понижен на фоне приема препаратов аспарагиназы (рисунок 23 Б).

Из графиков на рисунке 22 видно, что 27% точек находятся в гипокоагуляции по параметрам ТЭГ k и угол α , время реакции R удлинено в 11% точек, максимальная амплитуда снижена в 34% точек. Примерно 1% точек или меньше находились в области гиперкоагуляции по параметрам ТЭГ. Из-за изменений в общем анализе крови на фоне ОЛЛ (в 62% точек у пациентов было снижено количество эритроцитов, в 35% точек снижено количество тромбоцитов) ТЭГ оставался неинформативным с точки зрения тромботических осложнений у пациентов с ОЛЛ.

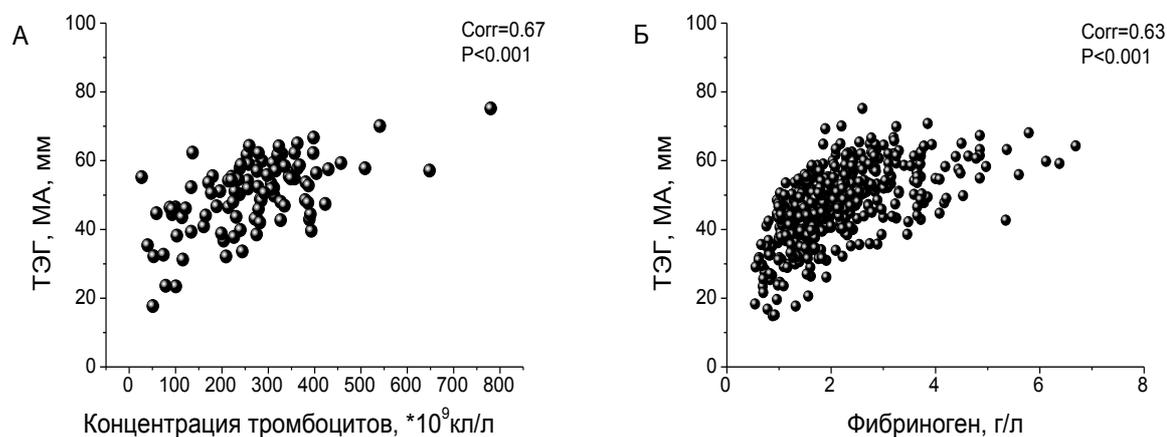


Рисунок 23. Корреляция между максимальной амплитудой (МА) и концентрацией тромбоцитов (А) и фибриногена (Б) у пациентов с ОЛЛ на фоне терапии.

На рисунке 24 представлены результаты концентрации фибриногена, концентрации АнтитромбинаIII и D-димеров. 72% точек указывает сниженную концентрацию фибриногена, что хорошо соотносится с известными фактами о снижении факторов свертывания и естественных антикоагулянтов на фоне терапии аспарагинозой при ОЛЛ. На графиках концентрации АТIII, D-димера видно, что концентрация естественного антикоагулянта АТIII снижается в 41 % точек у пациентов, схожим образом, как и концентрация фибриногена.

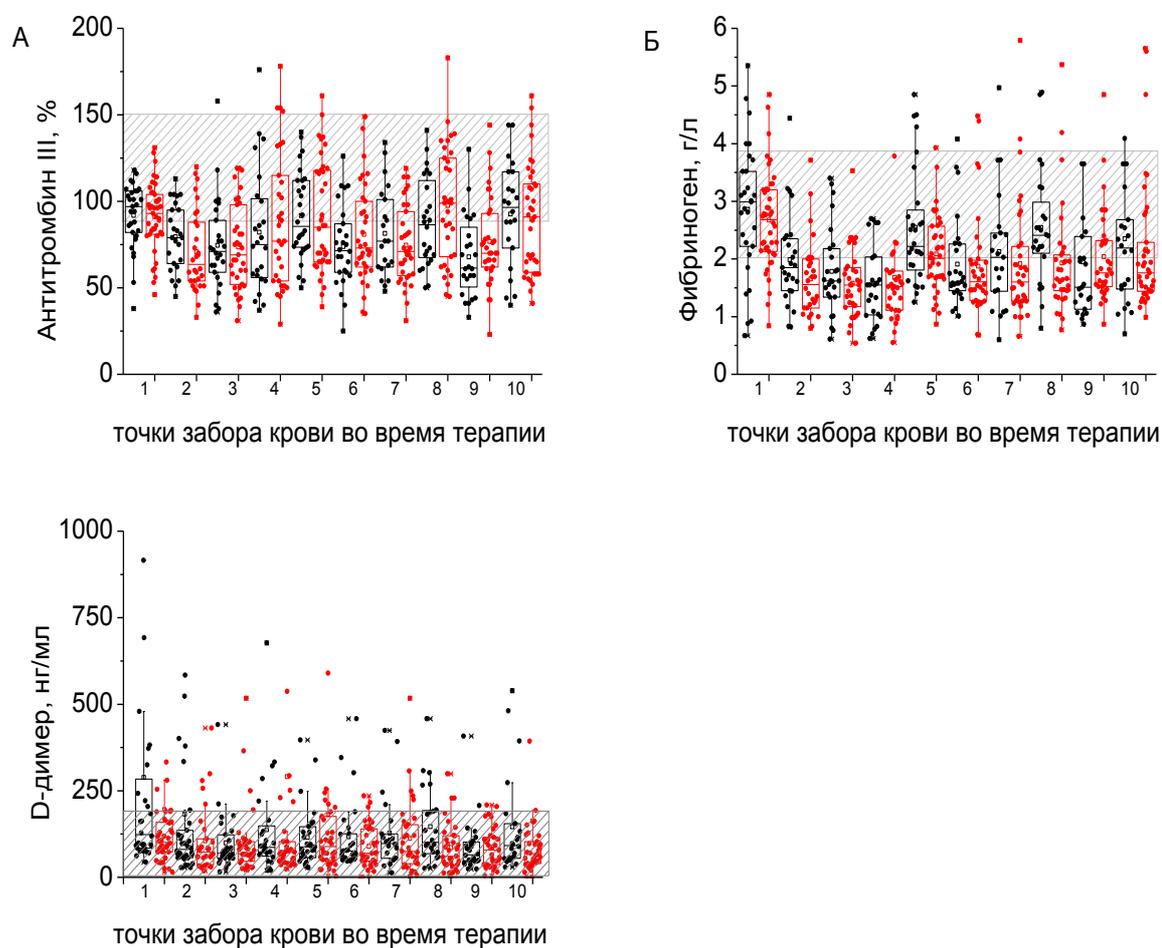


Рисунок 24. Концентрация АнтитромбинаIII (А), фибриногена (Б) и концентрация D-димеров (В) у пациентов с ОЛЛ. Черные точки – пациенты без тромбоза, красные точки – пациенты с тромбозом.

D-димер, как маркер лизиса сгустка, повышен в 15% точек, в других же остается в норме. Однако статистически значимой разницы между показателями также нет ($P > 0,05$).

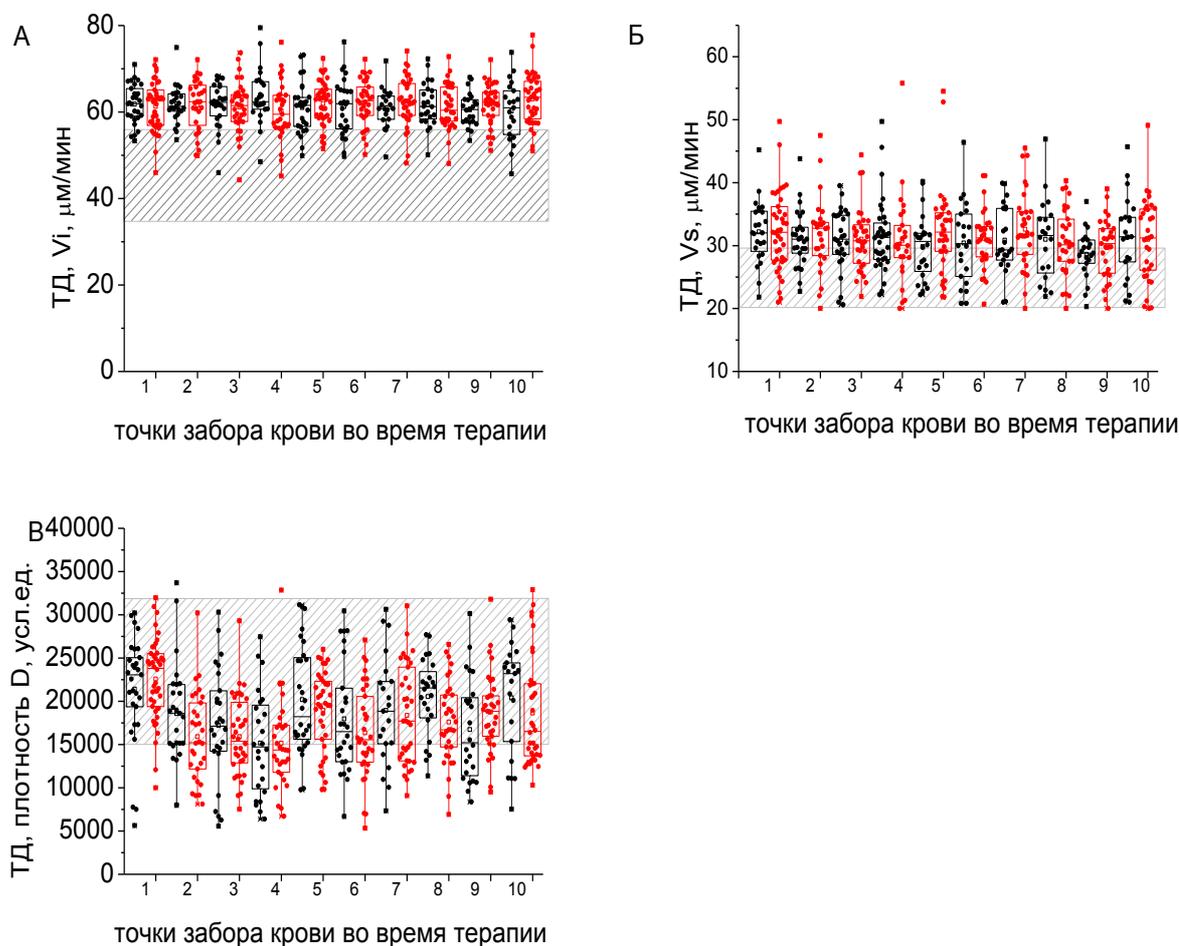


Рисунок 25. Параметры тромбодинамики начальная (А) и стационарная (Б) скорость роста сгустка, плотность сгустка (В) у пациентов с ОЛЛ. Черные точки – пациенты без тромбоза, красные точки – пациенты с тромбозом.

В то время как тромбодинамика (рисунок 25) показывает повышение скоростей роста сгустка периодически у всех пациентов, указывая на гиперкоагуляцию в 80% точек по начальной скорости и 64% точек по стационарной скорости.

То есть присутствует разбалансировка системы гемостаза в целом, снижение

не только про-, но и антикоагулянтных свойств плазмы (что мы видим по концентрации АТШ), отражается в виде повышенного свертывания в тесте тромбодинамика. Плотность сгустка в тромбодинамике снижена, что хорошо коррелирует со снижением уровня фибриногена (рисунок 26).

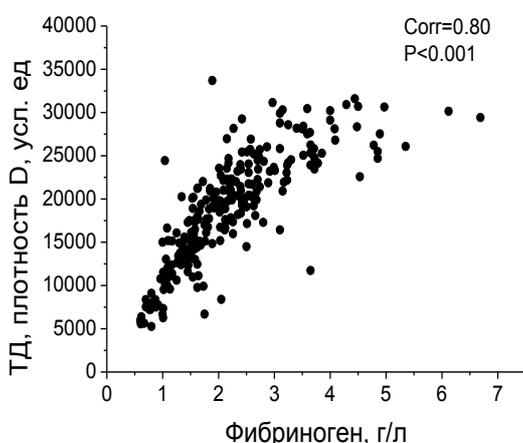


Рисунок 26. Корреляция между плотностью сгустка (D) и концентрацией фибриногена у пациентов с ОЛЛ на фоне терапии.

Глобальные тесты также не показали значимой разницы между группой с тромбозами и нет ($P > 0.05$). Так как врачи сейчас ориентируются на концентрацию естественного антикоагулянта, для оценки риска тромбоза, пациенты были разбиты на 2 группы: группа с нормальной концентрацией АТШ и группа со снижением концентрации АТШ – таблица 10. Если показатели Тромбодинамики указывали на гиперкоагуляцию и при этом концентрация D-димеров была в норме при сниженной концентрации АТШ, то в этой группе пациентов наблюдалось 53% тромботических осложнений по УЗИ. Если же D-димер был повышен или показатели Тромбодинамики были в норме, то процент тромбоза снижался до 16%. При

этом даже при наличии нормальной концентрации АТШ, но гиперкоагуляции по Тромбодинамике процент тромбозов оставался на уровне 45%. Гипотезой может служить нарушение в функции системы лизиса сгустка у пациентов с ОЛЛ. Гиперкоагуляция наблюдается у 70% пациентов в течении терапии, однако, если D-димер повышен, то это может означать, что даже образующиеся тромботические наложения вовремя лизируются, не представляя угрозы. Однако, даже в случае сохранения концентрации АТШ, в целом работа системы лизиса может быть нарушена. И тогда гиперкоагуляция, подтвержденная Тромбодинамикой, может привести к тромботическим осложнениям.

Таблица 10. Совокупность показателей скорость роста сгустка в тромбодинамике, концентрация АТШ, концентрация D-димера и процент тромбоза.

Антитромбин Ш, %	Скорость роста сгустка Vs, мкм/мин	D-димер, нг/мл	Процент тромбоза, %
понижен	повышена	норма	53%
	повышена/норма	повышен	16%
норма	повышена	норма	45%
	норма	повышен/норма	12%

***цветом обозначены группы с высоким риском тромбоза**

На рисунке 27 изображена концентрация тромбомодулина. Точки тромбозов, обнаруженных на УЗДГ, обозначены цветными стрелками в цвет всех точек пациента. Мы наблюдаем примерно трехкратное увеличение концентрации свободного Тромбомодулина (по сравнению с собственным уровнем) у пациентов в точках, после которых обнаружено тромботическое

осложнение, что в некой мере подтверждает нарушение работы естественной антикоагулянтной системы свертывания крови и системы лизиса. У пациентов без тромбозов, имеющих черные точки на графике, таких всплесков тромбомодулина практически не наблюдается, за исключением трех пациентов. Можно предполагать, что сосудистая стенка пациентов без тромбозов не так активно теряет тромбомодулин, а значит лучше сохраняет свою атромбогенность, а вместе с этим активность пути протеина С. В группе детей с тромбозами у 100% детей наблюдается минимум трехкратное увеличение концентрации свободного тромбомодулина в точке в районе тромбоза, в то время как в группе детей без тромботических осложнений, только у 8% наблюдается повышение тромбомодулина по сравнению со своим собственным средним уровнем.

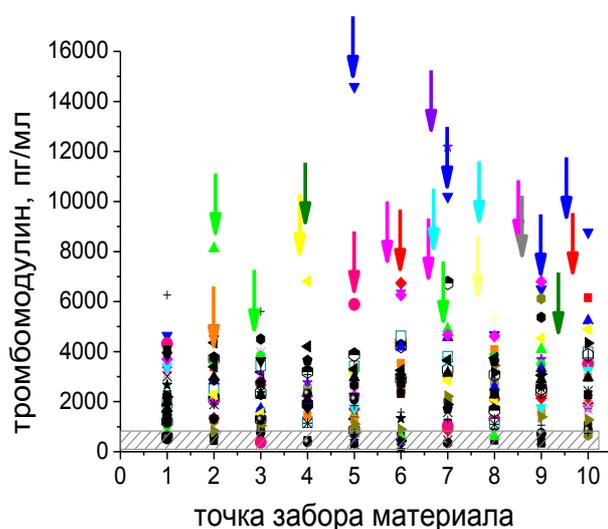


Рисунок 27. Концентрация тромбомодулина у детей с ОЛЛ.

В качестве обобщения, можно сказать, что отдельно друг от друга тесты гемостаза не могут показать риск гематологических осложнений у детей с ОЛЛ. Однако, комбинация из трех параметров (скорость роста сгустка V_s в ТД, концентрация АТШ и концентрация D-димеров) может

служить для оценки риска тромботических осложнений. При доборе данных по концентрации Тромбомодулина можно судить о нем как о еще одном маркере тромботических осложнений у детей с ОЛЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе получен диапазон нормальных значений параметров ТД для детей. Учтены результаты тестов, выполненных для 102 условно здоровых детей. Эта контрольная группа позволила рассчитать референсные значения с учетом демографических данных о поле и возрасте. Показано, что диапазон значений теста для детей от 1 года не отличается от диапазона, принятого в тесте для взрослых, что хорошо соотносится с известными из литературы данными, что после года жизни гемостаз ребенка в целом ведет себя практически в соответствии с поведением гемостаза взрослого человека.

Гемолитические анемии характеризуются повышенным риском тромбоза. Есть предположение, что повышенная везикуляция эритроцитов, ведет к изменениям в автоволновом процессе свертывания крови, предоставляя поверхность для сборки комплексов активных факторов. Исследование состояния системы гемостаза у детей и взрослых с гемолитическими анемиями с помощью биофизических методов не только помогает исследовать механизм и вклад МР в свертывание при данной патологии, но и детектирует гиперкоагуляцию у пациентов и может в перспективе использоваться для оценки риска тромботических осложнений. Чувствительность ТД для оценки тромботических рисков уже исследовалась ранее и показала высокую клиническую значимость [6,41].

У трех обследованных пациентов с ПНГ наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) снижение ЛДГ на фоне терапии экулизумабом, что хорошо согласуется с литературными данными [33,164–167]. Как правило,

со снижением активности ЛДГ связывают уменьшение гемолиза, а вместе с ним снижение числа прокоагулянтных МР, циркулирующих в кровотоке - одного из тромбогенных механизмов при ПНГ. Однако, за 8 месяцев терапии, мы не зафиксировали нормализацию во всех параметрах, дающих объективизацию биофизических процессов каскада свертывания. Несмотря на непрерывную терапию экулизумабом (препарат сохраняет свою активность в течение 2х недель от введения [166,167]) параметры глобальных тестов, ТЭГ, ТГТ и ТД периодически оказывались в области гиперкоагуляции у всех троих пациентов. При этом стандартные коагулологические тесты (АЧТВ, ТВ, ПИ, концентрация фибриногена) находились в области нормальных значений, не давая возможность оценить объективно состояние системы свертывания. Сохранение признаков гиперкоагуляции на фоне терапии экулизумабом согласуется с литературными данными. Так, было показано, что у 20% пациентов с ПНГ на фоне терапии экулизумабом отмечается сохранение повышенных концентраций маркеров тромботических рисков: D-димеров и фрагменты протромбина F1+2 [168]. При этом известно, что не у всех пациентов с ПНГ достигается 100% эффект от терапии экулизумабом. Примерно у 9% пациентов полностью сохраняется гемолитическая активность, а у 20% наблюдается частичное улучшение. Несмотря на 85% снижение рисков тромбоза на фоне терапии, тромботические осложнения у пациентов все равно случаются [169–172]. Мониторинг состояния именно интегральными тестами гемостаза может быть важен при этой патологии.

У детей с наследственным сфероцитозом по литературным данным тромбозы наблюдаются в основном в послеоперационном периоде, риск таких осложнений около 5% [19,29,99]. Также риск тромбозов повышается во время гемолитического криза. Нарушения в цитоскелете эритроцита ведут к потере им пластичных свойств, а вместе с этим к нарушению

микроциркуляции, а также повышенному разрушению эритроцитов, что ведет за собой появление в крови больших концентраций прокоагулянтных микрочастиц [32,76]. Это может служить одним из механизмов активации системы свертывания, и при возникновении дополнительных условий риска это может привести к тромботическим осложнениям. Стандартные тесты гемостаза (АЧТВ, ТВ, ПИ по Квику) оказались не чувствительны к протромботическим тенденциям при наследственном сфероцитозе. Однако, обращает на себя внимание снижение концентрации фибриногена и повышение концентрации D-димера у пациентов в состоянии криза, что может быть связано с потреблением фибриногена и образованием патологических фибриновых сгустков с последующим их лизисом при обострении гемолиза. Эта гипотеза хорошо соотносится с показателями ТЭГ и ТД, которые указывают на высокую прокоагулянтную активность у пациентов при остром гемолизе.

Наше исследование показало, что стандартные лабораторные тесты по своей специфике оказались не всегда чувствительны к мультифакторному гиперкоагуляционному состоянию системы гемостаза у пациентов с β -талассемией, как у детей, так и у взрослого. Параметры стандартной коагулограммы находились в основном в области нормальных значений. У детей ТД и ТЭГ демонстрировали хорошую корреляцию между тяжестью течения заболевания и усилением свертывания. Риск развития тромбоза значительно выше у пациентов с тяжелыми формами β -талассемии. Также ТД демонстрировала наличие риска тромботических осложнений у взрослого пациента с β -талассемией еще до проведения спленэктомии. После операции первыми еще сильнее возросли скорости роста сгустка в ТД, указывая на развития протромботических тенденций у данного пациента, не смотря на параметры ТЭГ находящиеся в норме после операции. Затем параметры ТЭГ также существенно возросли,

демонстрируя высокий тромботический риск и гиперкоагуляцию по α и МА. Тромбоз портальной и селезеночной вен далее был обнаружен у взрослого пациента на доплерографии.

Оценивая клинический случай пациента с β -талассемией, состояние системы гемостаза у пациентов с ПНГ и состояние системы свертывания у детей с β -талассемией и наследственным сфероцитозом, становится понятно, насколько сложны и неоднозначны изменения гемостаза, отражаемые разными коагулологическими тестами, у пациентов с гемолизом. Для таких пациентов врачам в итоге необходимо изучить целую совокупность показателей различных тестов для оценки системы гемостаза, для назначения и коррекции терапии. Для пациентов с гемолизом, имеющих высокий риск тромботических осложнений, для оценки протромботических тенденций наиболее эффективен коагулологический мониторинг с использованием глобальных тестов гемостаза.

В рамках исследования механизмов гиперкоагуляции у пациентов с различными формами гемоглобинопатий, было показано, что скорости распространения сгустка и концентрация МР были повышены у пациентов с тяжелым течением заболевания. Однако качественного отличия МР пациентов не наблюдалось ни по влиянию МР на пространственную динамику роста сгустка, ни по активации спонтанного свертывания. Таким образом, прокоагулянтные МР, в том числе эритроцитарного происхождения, способствуют гиперкоагуляции у пациентов с гемолитическими анемиями, в первую очередь, за счет повышения концентрации.

У пациентов с острым лимфобластным лейкозом по данным литературы риск тромбоза достигает до 73% [42,43,121,122]. В нашем исследовании из 73 детей с ОЛЛ без дополнительных критериев отбора, проходящих терапию консолидации по протоколу МВ-2015,

тромботические осложнения встречались в 55% случаев, однако только 9% всех тромбозов симптоматические, остальные обнаружены на контрольном УЗИ. Стандартные коагулологические тесты показали себя не способными чувствовать активацию каскада свертывания, вызванное известным изменением в концентрации естественных про- и антикоагулянтных факторах под действием препаратов аспарагиназы, влияющих на синтетическую функцию печени. В то время как параметры ТЭГ периодически находились в гипокоагуляции, являясь чувствительными к снижению концентрации фибриногена, а также количества тромбоцитов на фоне полихимиотерапии. Однако параметры ТД находились в области гиперкоагуляции, и единственные отражали активацию системы свертывания, совместно с повышенной концентрацией D-димера. Удалось выделить 2 группы с высоким риском тромбоза, независимо от концентрации антитромбина III, при гиперкоагуляции по тромбодинамике и отсутствии повышения D-димера наблюдалось около 50% пациентов с тромботическими осложнениями, в то время как в группах с повышением D-димера, пациентов с тромбозами минимум в 3 раза меньше. ТД адекватно отражает гиперкоагуляцию у пациентов с ОЛЛ, для которых характерна активация свертывания, которая приводит к возникновению тромбозов. Можно предполагать, что, так как гиперкоагуляцию периодически наблюдается у всех пациентов с ОЛЛ, с сохранением функциональной активности системы лизиса сгустка, тромботические наложения вовремя подвергаются фибринолизу, о чем свидетельствует периодическое повышение концентрации D-димера у пациентов без тромбозов, чего почти не наблюдается у пациентов с тромбозами, а также с отсутствием резких изменений в концентрации свободного тромбомодулина у пациентов без тромбозов, что позволяет сделать предположение о сохранении атромбогенности сосудистой стенки за счет трансмембранного

тромбомодулина, а значит активности пути протеина С, который участвует в остановке роста фибринового сгустка.

Таким образом, только тесты, в которых активация свертывания приближена к естественной, которые чувствительны к автоволновым процессам как прокоагулянтных, так и антикоагулянтных компонентов свертывания крови, смогли детектировать известное состояние активации свертывания у пациентов с гемолитическими анемиями и ОЛЛ в ситуации, когда стандартная коагулограмма неинформативна.

ВЫВОДЫ

1. Стандартные тесты времени свертывания, широко применяемые в клинической практике, не чувствительны к активации свертывания как у пациентов с гемолитическими анемиями даже в острой фазе заболевания с высоким риском тромбоза, так и у пациентов с ОЛЛ. Более адекватно регистрируют развитие гиперкоагуляции интегральные тесты гемостаза, в первую очередь, скорость роста фибринового сгустка.
2. Показано, что в основе механизма развития гиперкоагуляционного состояния у пациентов с гемолитическими анемиями лежит увеличение количества прокоагулянтных микровезикул.
3. Прокоагулянтные свойства микровезикул значимо не отличаются у пациентов и у здоровых доноров.
4. Предложен новый интегральный показатель для оценки риска реальных тромботических осложнений у детей с ОЛЛ, получающих терапию по протоколу ALL-MB-2015. Комбинация из показателей скорости роста сгустка совместно с концентрацией D-димера позволяет выделить группу пациентов с ОЛЛ, в которой риск тромботических осложнений в 3 раза выше, чем у пациентов с другими показателями этих тестов.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bolliger D. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice / D. Bolliger, M.D. Seeberger, K.A. Tanaka // *Transfusion Medicine Reviews*. – 2012. – Vol. 26 – № 1 – P. 1–13.
2. Salooja N. Thrombelastography / N. Salooja, D.J. Perry // *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. – 2001. – Vol. 12 – № 5 – P. 327–337.
3. Буланов А.Ю. Роль тромбэластографии в трансфузионной терапии посттравматической коагулопатии / Буланов А.Ю. // *Трансфузиология*. – 2011. – Т. 12 – № 4 – С. 47–55.
4. Hemker H.C. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system / H.C. Hemker, R. Al Dieri, E. De Smedt, S. Béguin // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2006. – Vol. 96 – № 5 – P. 553–561.
5. Ovanesov M.V. Hemophilia A and B are associated with abnormal spatial dynamics of clot growth / M.V. Ovanesov, J.V. Krasotkina, L.I. Ul'yanova, K.V. Abushinova, O.P. Plyushch, S.P. Domogatskii, A.I. Vorob'ev, F.I. Ataulakhanov // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2002. – Vol. 1572 – № 1 – P. 45–57.
6. Soshitova N.P. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics: / N.P. Soshitova, S.S. Karamzin, A.N. Balandina, O.A. Fadeeva, A.V. Kretchetova, G.M. Galstian, M.A. Pantelev, F.I. Ataulakhanov // *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. – 2012. – Vol. 23 – № 6 – P. 498–507.
7. Koltsova E.M. The laboratory control of anticoagulant thromboprophylaxis during the early postpartum period after cesarean delivery / E.M. Koltsova, A.N. Balandina, K.I. Grischuk, M.A. Shpilyuk, E.A. Seregina,

N.M. Dashkevich, A.V. Poletaev, A.V. Pyregov, G.T. Sukhih, I.I. Serebriyskiy, F.I. Ataullakhanov // *Journal of Perinatal Medicine*. – 2018. – Vol. 46 – № 3 – P. 251–260.

8. Baglin T. Using the laboratory to predict recurrent venous thrombosis: USING THE LABORATORY TO PREDICT RECURRENT VENOUS THROMBOSIS / T. Baglin // *International Journal of Laboratory Hematology*. – 2011. – Vol. 33 – № 4 – P. 333–342.

9. Essell J.H. Comparison of thromboelastography to bleeding time and standard coagulation tests in patients after cardiopulmonary bypass / J.H. Essell, T.J. Martin, J. Salinas, J.M. Thompson, V.C. Smith // *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. – 1993. – Vol. 7 – № 4 – P. 410–415.

10. Долгов В.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В.В. Долгов, П.В. Свиринов. – Тверь: Триада, 2005. – 227 с.

11. Andrew M. Development of the human coagulation system in the full-term infant / M. Andrew, B. Paes, R. Milner, M. Johnston, L. Mitchell, D.M. Tollefsen, P. Powers // *Blood*. – 1987. – Vol. 70 – № 1 – P. 165–172.

12. Andrew M. Maturation of the hemostatic system during childhood / M. Andrew, P. Vegh, M. Johnston, J. Bowker, F. Ofose, L. Mitchell // *Blood*. – 1992. – Vol. 80 – № 8 – P. 1998–2005.

13. Пантелеев М.А. Свертывание крови: биохимические основы / М.А. Пантелеев, Ф.И. Атауллаханов // *Клиническая онкогематология*. – 2008. – Т. 1 – № 1 – С. 50–62.

14. Пантелеев М.А. Пространственная динамика гемостаза и тромбоза: теория и практика / Пантелеев М.А., Баландина А.Н., Сошитова Н.П., Галстян Г.М., Емельяненко В.М., Воробьев А.И., Атауллаханов Ф.И. // *Тромбоз гемостаз и реология*. – 2010. – Т. 4 – № 40 – С. 48–60.

15. Nechipurenko D.Y. Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface / D.Y. Nechipurenko, N. Receveur,

A.O. Yakimenko, T.O. Shepelyuk, A.A. Yakusheva, R.R. Kerimov, S.I. Obydenyy, A. Eckly, C. Léon, C. Gachet, E.L. Grishchuk, F.I. Ataulakhanov, P.H. Mangin, M.A. Panteleev // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2019. – Vol. 39 – № 1 – P. 37–47.

16. Dashkevich N.M. Thrombin Activity Propagates in Space During Blood Coagulation as an Excitation Wave / N.M. Dashkevich, M.V. Ovanesov, A.N. Balandina, S.S. Karamzin, P.I. Shestakov, N.P. Soshitova, A.A. Tokarev, M.A. Panteleev, F.I. Ataulakhanov // *Biophysical Journal*. – 2012. – Vol. 103 – № 10 – P. 2233–2240.

17. Schneppenheim R. Thrombosis in infants and children / R. Schneppenheim, J. Greiner // *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. – 2006. – P. 86–96.

18. Eldor A. A chronic hypercoagulable state in patients with beta-thalassaemia major is already present in childhood / A. Eldor, R. Durst, E. Hy-Am, A. Goldfarb, S. Gillis, E.A. Rachmilewitz, A. Abramov, J. MacLouf, Y.C. Godefray, E. De Raucourt, M.C. Guillin // *British Journal of Haematology*. – 1999. – Vol. 107 – № 4 – P. 739–746.

19. Das A. Risk factors for thromboembolism and pulmonary artery hypertension following splenectomy in children with hereditary spherocytosis: Post-Splenectomy Thrombotic Risk in HS / A. Das, D. Bansal, J. Ahluwalia, R. Das, M.K. Rohit, S.V. Attri, A. Trehan, R.K. Marwaha // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2014. – Vol. 61 – № 1 – P. 29–33.

20. Ataga K.I. Hypercoagulability and thrombotic complications in hemolytic anemias / K.I. Ataga // *Haematologica*. – 2009. – Vol. 94 – № 11 – P. 1481–1484.

21. Barker J.E. Thrombosis in heritable hemolytic disorders / J.E. Barker, N.J. Wandersee // *Current Opinion in Hematology*. – 1999. – Vol. 6 – № 2 – P. 71–75.

22. Ziakas P.D. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sites, risks, outcome. An overview / P.D. Ziakas, L.S. Poulou, G.I. Rokas, D. Bartzoudis, M. Voulgarelis // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2007. – Vol. 5 – № 3 – P. 642–645.
23. Naik R.P. Venous thromboembolism incidence in the Cooperative Study of Sickle Cell Disease / R.P. Naik, M.B. Streiff, C. Haywood, J.B. Segal, S. Lanzkron // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* – 2014. – Vol. 12 – № 12 – P. 2010–2016.
24. Cappellini M.D. Coagulation in the Pathophysiology of Hemolytic Anemias / M.D. Cappellini // *Hematology.* – 2007. – Vol. 2007 – № 1 – P. 74–78.
25. Crosby W.H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; the mechanism of hemolysis and its relation to the coagulation mechanism / W.H. Crosby, W. Dameshek // *Blood.* – 1950. – Vol. 5 – № 9 – P. 822–842.
26. Rother R.P. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease / R.P. Rother, L. Bell, P. Hillmen, M.T. Gladwin // *JAMA.* – 2005. – Vol. 293 – № 13 – P. 1653–1662.
27. Hugel B. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia / B. Hugel, G. Socié, T. Vu, F. Toti, E. Gluckman, J.M. Freyssinet, M.L. Scrobohaci // *Blood.* – 1999. – Vol. 93 – № 10 – P. 3451–3456.
28. Francis R.B. Platelets, coagulation, and fibrinolysis in sickle cell disease: their possible role in vascular occlusion / R.B. Francis // *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis.* – 1991. – Vol. 2 – № 2 – P. 341–353.
29. McGrew W. Hereditary spherocytosis and portal vein thrombosis / W. McGrew, G.R. Avant // *Journal of Clinical Gastroenterology.* – 1984. – Vol. 6 – № 4 – P. 381–382.

30. Ataga K.I. Beta-thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability / K.I. Ataga, M.D. Cappellini, E.A. Rachmilewitz // *British Journal of Haematology*. – 2007. – Vol. 139 – № 1 – P. 3–13.

31. Fahmey S.S. Vascular endothelial growth factor in children with thalassemia major [Электронный ресурс] / S.S. Fahmey, H.F. Naguib, S.S. Abdelshafy, R.E. Alashry // *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 5 – № 1 – e2013044.

32. Wagner G.M. Red cell vesiculation--a common membrane physiologic event / G.M. Wagner, D.T. Chiu, M.C. Yee, B.H. Lubin // *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1986. – Vol. 108 – № 4 – P. 315–324.

33. van Bijnen S.T.A. van Alterations in markers of coagulation and fibrinolysis in patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria before and during treatment with eculizumab / S.T.A. van Bijnen, B. Østerud, W. Barteling, K. Verbeek-Knobbe, M. Willemsen, W.L. van Heerde, P. Muus // *Thrombosis Research*. – 2015. – Vol. 136 – № 2 – P. 274–281.

34. Gilbert G.E. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII / G.E. Gilbert, P.J. Sims, T. Wiedmer, B. Furie, B.C. Furie, S.J. Shattil // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – Vol. 266 – № 26 – P. 17261–17268.

35. Falanga A. Circulating microparticles in children with sickle cell anemia: a heterogeneous procoagulant storm directed by hemolysis and fetal hemoglobin / A. Falanga, A. Trincherò // *Haematologica*. – 2013. – Vol. 98 – № 7 – P. 995–997.

36. Yee D.L. Thromboelastographic and hemostatic characteristics in pediatric patients with sickle cell disease / D.L. Yee, R.M. Edwards, B.U. Mueller, J. Teruya // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2005. – Vol. 129 – № 6 – P. 760–765.

37. Gupta S. Thromboelastographic characterization of the activated clotting system in children with sickle cell trait or sickle cell disease / S. Gupta, R. Carmona, J. Malvar, G. Young // *Thrombosis Research*. – 2017. – Vol. 151 – P. 44–50.
38. Noubouossie D.F. Thrombin generation reveals high procoagulant potential in the plasma of sickle cell disease children / D.F. Noubouossie, P.Q. Lê, F. Corazza, F. Debaugnies, L. Rozen, A. Ferster, A. Demulder // *American Journal of Hematology*. – 2012. – Vol. 87 – № 2 – P. 145–149.
39. Whelihan M.F. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease / M.F. Whelihan, M.Y. Lim, M.J. Mooberry, M.G. Piegore, A. Ilich, A. Wogu, J. Cai, D.M. Monroe, K.I. Ataga, K.G. Mann, N.S. Key // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2016. – Vol. 14 – № 10 – P. 1941–1952.
40. Ovanesov M.V. Effect of factor VIII on tissue factor-initiated spatial clot growth / M.V. Ovanesov, E.G. Lopatina, E.L. Saenko, N.M. Ananyeva, L.I. Ul'yanova, O.P. Plyushch, A.A. Butilin, F.I. Ataulakhanov // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2003. – Vol. 89 – № 2 – P. 235–242.
41. Gracheva M.A. Thromboelastography, thrombin generation test and thrombodynamics reveal hypercoagulability in patients with multiple myeloma / M.A. Gracheva, E.S. Urnova, E.I. Sinauridze, I.D. Tarandovskiy, E.B. Orel, A.V. Poletaev, L.P. Mendeleeva, F.I. Ataulakhanov, A.N. Balandina // *Leukemia & Lymphoma*. – 2015. – Vol. 56 – № 12 – P. 3418–3425.
42. Payne J.H. Thrombosis and acute lymphoblastic leukaemia / J.H. Payne, A.J. Vora // *British Journal of Haematology*. – 2007. – Vol. 138 – № 4 – P. 430–445.
43. Kuhle S. Prevalence of post-thrombotic syndrome following asymptomatic thrombosis in survivors of acute lymphoblastic leukemia / S. Kuhle, M. Spavor, P. Massicotte, J. Halton, I. Cherrick, D. Dix, D. Mahoney, M.

Bauman, S. Desai, L.G. Mitchell // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2008. – Vol. 6 – № 4 – P. 589–594.

44. Покровский В.М. Физиология человека: Учебная литература для студентов медицинских вузов / В.М. Покровский, Г.Ф. Коротько. – М.: Медицина, 2007. – 656 с.

45. Colman R.W. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice / ed. by R.W. Colman. – 5. ed – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. – 1827 p.

46. Пантелеев М.А. Практическая коагулология / М.А. Пантелеев, С.А. Васильев, Е.И. Синауридзе, А.И. Воробьев, Ф.И. Атауллаханов. – М.: Практическая Медицина, 2011. – 192 с.

47. van Hinsbergh V.W. van The endothelium: vascular control of haemostasis / V.W. van Hinsbergh // *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. – 2001. – Vol. 95 – № 2 – P. 198–201.

48. Heemskerk J.W.M. Platelet activation and blood coagulation / J.W.M. Heemskerk, E.M. Bevers, T. Lindhout // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2002. – Vol. 88 – № 2 – P. 186–193.

49. Yun S.-H. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers Plus [Электронный ресурс] / S.-H. Yun, E.-H. Sim, R.-Y. Goh, J.-I. Park, J.-Y. Han // *BioMed Research International*. – 2016. – Vol. 2016 – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4925965/>.

50. Butenas S. Blood coagulation / S. Butenas, K.G. Mann // *Biochemistry. Biokhimiia*. – 2002. – Vol. 67 – № 1 – P. 3–12.

51. Струкова С.М. Основы физиологии гемостаза / С.М. Струкова. – 2ое изд. переработанное и дополненное. – Москва: издательство МГУ, 2013. – 186 с.

52. Mann K.G. Biochemistry and physiology of blood coagulation / K.G. Mann // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1999. – Vol. 82 – № 2 – P. 165–174.

53. Bryant J.W. Human plasma kallikrein-kinin system: physiological and biochemical parameters / J.W. Bryant, Z. Shariat-Madar // *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 7 – № 3 – P. 234–250.
54. Воробьев П.А. Актуальный гемостаз / Воробьев П.А. – М.: Ньюдиамед, 2004. – 140 с.
55. Nesheim M.E. Thrombin-catalyzed activation of single chain bovine factor V / M.E. Nesheim, K.G. Mann // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1979. – Vol. 254 – № 4 – P. 1326–1334.
56. Monkovic D.D. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin / D.D. Monkovic, P.B. Tracy // *Biochemistry*. – 1990. – Vol. 29 – № 5 – P. 1118–1128.
57. Brummel K.E. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation / K.E. Brummel, S.G. Paradis, S. Butenas, K.G. Mann // *Blood*. – 2002. – Vol. 100 – № 1 – P. 148–152.
58. Seegers W.H. An antithrombin reaction to prothrombin activation / W.H. Seegers, J.F. Johnson, C. Fell // *The American Journal of Physiology*. – 1954. – Vol. 176 – № 1 – P. 97–103.
59. Conard J. Molar antithrombin concentration in normal human plasma / J. Conard, F. Brosstad, M. Lie Larsen, M. Samama, U. Abildgaard // *Haemostasis*. – 1983. – Vol. 13 – № 6 – P. 363–368.
60. Mammen E.F. Antithrombin: its physiological importance and role in DIC / E.F. Mammen // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 1998. – Vol. 24 – № 1 – P. 19–25.
61. Esmon C.T. The protein C pathway / C.T. Esmon // *Chest*. – 2003. – Vol. 124 – № 3 Suppl – P. 26S–32S.
62. Dahlbäck B. The anticoagulant protein C pathway / B. Dahlbäck, B.O. Villoutreix // *FEBS letters*. – 2005. – Vol. 579 – № 15 – P. 3310–3316.

63. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция. / Н.Н. Петрищев. – СПб.: Издательство СпбГМУ им. акад. И. П. Павлова, 2003. – 184 с.

64. Aird W.C. Spatial and temporal dynamics of the endothelium / W.C. Aird // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2005. – Vol. 3 – № 7 – P. 1392–1406.

65. Каде А.Х. Физиологические функции сосудистого эндотелия / А.Х. Каде, С.А. Занин, Е.А. Губарева, А.Ю. Туровая, Ю.А. Богданова, С.О. Апсалямова, С.Н. Мерзлякова // *Фундаментальные исследования. Series: Медицинские науки.* – 2011. – Т. 11 – № 3 – С. 611–617.

66. Щёктова А.П. Маркеры поражения эндотелия и агрегация тромбоцитов при хроническом гепатите и циррозе печени / А.П. Щёктова // *Клиницист.* – 2012. – № 1 – С. 31–35.

67. Кудряшева О.В. Эндотелиальный гемостаз: система тромбомодулина и её роль в развитии атеросклероза и его осложнений / О.В. Кудряшева, Д.А. Затейщиков, Сидоренко Б.А. // *Кардиология.* – 2000. – Т. 40 – № 8 – P. 65–70.

68. Morel O. Cellular Mechanisms Underlying the Formation of Circulating Microparticles / O. Morel, L. Jesel, J.-M. Freyssinet, F. Toti // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2011. – Vol. 31 – № 1 – P. 15–26.

69. Perez-Pujol S. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: Studies using a new digital flow cytometer / S. Perez-Pujol, P.H. Marker, N.S. Key // *Cytometry Part A.* – 2007. – Vol. 71A – № 1 – P. 38–45.

70. Zwaal R.F.A. Lipid–protein interactions in blood coagulation / R.F.A. Zwaal, P. Comfurius, E.M. Bevers // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes.* – 1998. – Vol. 1376 – № 3 – P. 433–453.

71. Morrissey J.H. Protein-Phospholipid interactions in blood clotting / J.H. Morrissey, R.L. Davis-Harrison, N. Tavoosi, K. Ke, V. Pureza, J.M. Boettcher, M.C. Clay, C.M. Rienstra, Y.Z. Ohkubo, T.V. Pogorelov, E. Tajkhorshid // *Thrombosis Research*. – 2010. – Vol. 125 – P. S23–S25.
72. Owens A.P. Microparticles in Hemostasis and Thrombosis / A.P. Owens, N. Mackman // *Circulation Research* / ed. by C. Weber, S. Mause. – 2011. – Vol. 108 – № 10 – P. 1284–1297.
73. Shah M.D. Flow cytometric measurement of microparticles: Pitfalls and protocol modifications / M.D. Shah, A.L. Bergeron, J.-F. Dong, J.A. López // *Platelets*. – 2008. – Vol. 19 – № 5 – P. 365–372.
74. Willekens F.L.A. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? / F.L.A. Willekens, J.M. Werre, Y.A.M. Groenen-Döpp, B. Roerdinkholder-Stoelwinder, B. de Pauw, G.J.C.G.M. Bosman // *British Journal of Haematology*. – 2008. – Vol. 141 – № 4 – P. 549–556.
75. van Beers E.J. van Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease / E.J. van Beers, M.C.L. Schaap, R.J. Berckmans, R. Nieuwland, A. Sturk, F.F. van Doormaal, J.C.M. Meijers, B.J. Biemond, on behalf of the CURAMA study group* // *Haematologica*. – 2009. – Vol. 94 – № 11 – P. 1513–1519.
76. Westerman M. Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy / M. Westerman, A. Pizzey, J. Hirschman, M. Cerino, Y. Weil-Weiner, P. Ramotar, A. Eze, A. Lawrie, G. Purdy, I. Mackie, J. Porter // *British Journal of Haematology*. – 2008. – Vol. 142 – № 1 – P. 126–135.
77. Алексеев Н.А. Гематология и иммунология детского возраста / Н.А. Алексеев. – СПб.: Гиппократ, 2009. – 1040 с.

78. Румянцев А.Г. Гемоглобинопатии и талассемические синдромы. / А.Г. Румянцев, Ю.Н. Токарева, Н.С. Сметанина – М.: Практическая Медицина, 2015. – 448 с.

79. Ezov N. A chemically induced rat model of hemolysis with disseminated thrombosis / N. Ezov, T. Levin-Harrus, M. Mittelman, M. Redlich, S. Shabat, S.M. Ward, S. Peddada, M. Nyska, S. Yedgar, A. Nyska // *Cardiovascular Toxicology*. – 2002. – Vol. 2 – № 3 – P. 181–194.

80. Goldman L. Autoimmune and intravascular haemolytic anemias. Chap 163 In: *Goldman's Cecil Medicine 24th Edition*. / L. Goldman, A. Schafer, R. Schwartz. – 24 ed. – Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011. – 2704 p.

81. Crary S.E. Traditional laboratory measures of cardiovascular risk in hereditary spherocytosis / S.E. Crary, S. Troendle, N. Ahmad, G.R. Buchanan // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2010. – Vol. 55 – № 4 – P. 684–689.

82. Cao A. Beta-thalassemia / A. Cao, R. Galanello // *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. – 2010. – Vol. 12 – № 2 – P. 61–76.

83. Taher A. Prevalence of thromboembolic events among 8,860 patients with thalassaemia major and intermedia in the Mediterranean area and Iran / A. Taher, H. Isma'eel, G. Mehio, D. Bignamini, A. Kattamis, E.A. Rachmilewitz, M.D. Cappellini // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2006. – Vol. 96 – № 4 – P. 488–491.

84. Cappellini M.D. Hypercoagulability in β -thalassemia: a status quo / M.D. Cappellini, E. Poggiali, A.T. Taher, K.M. Musallam // *Expert Review of Hematology*. – 2012. – Vol. 5 – № 5 – P. 505–511.

85. Borenstain-Ben Yashar V. Phosphatidylserine in the outer leaflet of red blood cells from beta-thalassemia patients may explain the chronic hypercoagulable state and thrombotic episodes / V. Borenstain-Ben Yashar, Y.

Barenholz, E. Hy-Am, E.A. Rachmilewitz, A. Eldor // *American Journal of Hematology*. – 1993. – Vol. 44 – № 1 – P. 63–65.

86. Panigrahi I. Thromboembolic complications in beta-thalassemia: Beyond the horizon / I. Panigrahi, S. Agarwal // *Thrombosis Research*. – 2007. – Vol. 120 – № 6 – P. 783–789.

87. Habib A. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with beta-thalassemia intermedia / A. Habib, C. Kunzelmann, W. Shamseddeen, F. Zobairi, J.-M. Freyssinet, A. Taher // *Haematologica*. – 2008. – Vol. 93 – № 6 – P. 941–942.

88. Parker C.J. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / C.J. Parker // *Experimental Hematology*. – 2007. – Vol. 35 – № 4 – P. 523–533.

89. Brodsky R.A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / R.A. Brodsky // *Blood*. – 2014. – Vol. 124 – № 18 – P. 2804–2811.

90. Fong P.C. Percutaneous transluminal coronary angioplasty in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / P.C. Fong, Y.T. Tai, C.P. Lau, J. Li, F.H. Yap, R. Liang, A.K. Lie // *Catheterization and Cardiovascular Diagnosis*. – 1992. – Vol. 25 – № 2 – P. 144–147.

91. de Latour R.P. de Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories / R.P. de Latour, J.Y. Mary, C. Salanoubat, L. Terriou, G. Etienne, M. Mohty, S. Roth, S. de Guibert, S. Maury, J.Y. Cahn, G. Socié, French Society of Hematology, French Association of Young Hematologists // *Blood*. – 2008. – Vol. 112 – № 8 – P. 3099–3106.

92. Khametova R.N. [Hypercoagulation syndrome in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria] / R.N. Khametova, N.V. Demidova // *Gematologiya I Transfuziologiya*. – 1985. – Vol. 30 – № 1 – P. 29–32.

93. Ploug M. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leukocytes in patients with paroxysmal nocturnal

hemoglobinuria / M. Ploug, T. Plesner, E. Rønne, V. Ellis, G. Høyer-Hansen, N.E. Hansen, K. Danø // *Blood*. – 1992. – Vol. 79 – № 6 – P. 1447–1455.

94. Plesner T. Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR / T. Plesner, N. Behrendt, M. Ploug // *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. – 1997. – Vol. 15 – № 6 – P. 398–408.

95. Schäfer A. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide / A. Schäfer, F. Wiesmann, S. Neubauer, M. Eigenthaler, J. Bauersachs, K.M. Channon // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109 – № 15 – P. 1819–1822.

96. Socié G. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology / G. Socié, J.Y. Mary, A. de Gramont, B. Rio, M. Leporrier, C. Rose, P. Heudier, H. Rochant, J.Y. Cahn, E. Gluckman // *Lancet (London, England)*. – 1996. – Vol. 348 – № 9027 – P. 573–577.

97. Jang J.H. Predictive Factors of Mortality in Population of Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH): Results from a Korean PNH Registry / J.H. Jang, J.S. Kim, S.-S. Yoon, J.-H. Lee, Y.-K. Kim, D.-Y. Jo, J. Chung, S.K. Sohn, J.W. Lee // *Journal of Korean Medical Science*. – 2016. – Vol. 31 – № 2 – P. 214–221.

98. Lee J.W. Clinical signs and symptoms associated with increased risk for thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria from a Korean Registry / J.W. Lee, J.H. Jang, J.S. Kim, S.-S. Yoon, J.-H. Lee, Y.-K. Kim, D.-Y. Jo, J. Chung, S.K. Sohn // *International Journal of Hematology*. – 2013. – Vol. 97 – № 6 – P. 749–757.

99. Perrotta S. Hereditary spherocytosis / S. Perrotta, P.G. Gallagher, N. Mohandas // *Lancet (London, England)*. – 2008. – Vol. 372 – № 9647 – P. 1411–1426.

100. Barcellini W. Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects / W. Barcellini, P. Bianchi, E. Al // *Blood Transfusion*. – 2011. – P. 274–277.
101. Trompeter S. Hereditary spherocytosis / S. Trompeter, M.-J. King // *Paediatrics and Child Health*. – 2015. – Vol. 25 – № 8 – P. 381–386.
102. Da Costa L. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders / L. Da Costa, J. Galimand, O. Fenneteau, N. Mohandas // *Blood Reviews*. – 2013. – Vol. 27 – № 4 – P. 167–178.
103. Gelas T. Portal vein thrombosis after laparoscopic splenectomy during childhood / T. Gelas, A. Scalabre, F. Hameury, R. Dubois, C. Grosos, P.D. Mouriquand, P.-Y. Mure // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2014. – Vol. 38 – № 2 – P. 218–222.
104. Rescorla F.J. Laparoscopic splenic procedures in children: experience in 231 children / F.J. Rescorla, K.W. West, S.A. Engum, J.L. Grosfeld // *Annals of Surgery*. – 2007. – Vol. 246 – № 4 – P. 683–688.
105. Troendle S.B. Laboratory markers of thrombosis risk in children with hereditary spherocytosis / S.B. Troendle, L. Adix, S.E. Crary, G.R. Buchanan // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2007. – Vol. 49 – № 6 – P. 781–785.
106. Riel-Romero R.M.S. Childhood and teenage stroke / R.M.S. Riel-Romero, A.A. Kalra, E. Gonzalez-Toledo // *Neurological Research*. – 2009. – Vol. 31 – № 8 – P. 775–784.
107. Ataga K.I. Hypercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem / K.I. Ataga, N.S. Key // *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. – 2007. – P. 91–96.
108. Curran K.J. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric patients / K.J. Curran, N.A. Kernan, S.E. Prockop, A. Scaradavou, T.N. Small, R. Kobos, H. Castro-Malaspina, D. Araten, D. DiMichele, R.J. O'Reilly, F. Boulad // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2012. – Vol. 59 – № 3 – P. 525–529.

109. Hassan M.N. Correlation of splenectomy with portal vein thrombosis in beta-thalassemia major / M.N. Hassan, G.M. Tahereb, T. Ahmad, D.A. Asghar, E.D.M. Reza, B. Ali, M.N. Mohsen // JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association. – 2011. – Vol. 61 – № 8 – P. 760–762.

110. Leverger C. Autoimmune hemolytic anemia in children. Apropos of 14 cases / C. Leverger, A. Fischer, Y. Revillon, C. Griscelli // Archives Francaises De Pediatrie. – 1984. – Vol. 41 – № 10 – P. 665–671.

111. Brink J.S. Portal vein thrombosis after laparoscopy-assisted splenectomy and cholecystectomy / J.S. Brink, A.K. Brown, B.A. Palmer, C. Moir, D.R. Rodeberg // Journal of Pediatric Surgery. – 2003. – Vol. 38 – № 4 – P. 644–647.

112. Machado R.F. Pulmonary Hypertension Associated with Chronic Hemolytic Anemia and Other Blood Disorders / R.F. Machado, H.W. Farber // Clinics in Chest Medicine. – 2013. – Vol. 34 – № 4 – P. 739–752.

113. Hyder O. Surgical Procedures and Outcomes Among Children with Sickle Cell Disease: / O. Hyder, M. Yaster, B.T. Bateman, P.G. Firth // Anesthesia & Analgesia. – 2013. – Vol. 117 – № 5 – P. 1192–1196.

114. Barbosa J.A. Orthodontic treatment of a child with hereditary spherocytosis / J.A. Barbosa, P.R.F. Lopes, E.M.B. Lopes // Journal of clinical orthodontics: JCO. – 2005. – Vol. 39 – № 1 – P. 39–43.

115. Esposito C. Results and complications of laparoscopic cholecystectomy in childhood / C. Esposito, M.A. Gonzalez Sabin, F. Corcione, R. Sacco, G. Esposito, A. Settini // Surgical Endoscopy. – 2001. – Vol. 15 – № 8 – P. 890–892.

116. Roveda A. Recurrent deep vein thrombosis after the insertion of two vascular accesses in a 13-year-old thalassemic girl waiting for a haploidentical marrow transplant / A. Roveda, P. Sodani, K. Paciaroni, C. Gallucci, G. Lucarelli, G. Tenze // The Journal of Vascular Access. – 2009. – Vol. 10 – № 1 – P. 64–65.

117. Shah N. Complications of implantable venous access devices in patients with sickle cell disease / N. Shah, D. Landi, R. Shah, J. Rothman, L.M. De Castro, C.D. Thornburg // *American Journal of Hematology*. – 2012. – Vol. 87 – № 2 – P. 224–226.

118. Frappaz D. [Multiple vascular thromboses in severe acute autoimmune hemolytic anemia with *Mycoplasma pneumoniae* serology treated by plasma exchange and immunosuppressive agents] / D. Frappaz, D. Rigal, J.S. Valla, D. Louis, F. Alfonsi, G. Souillet // *Pediatric*. – 1983. – Vol. 38 – № 6 – P. 411–419.

119. Saleh Elalfy M. D-Dimer and Portal Vein Status in Splenectomized Egyptian β -Thalassemia Major Patients: A Prospective Single-Thalassemia Center Experience / M. Saleh Elalfy, N.G. Andrawes, A.M. Sadek, O. Hussein, A. Abdou // *Pediatric Hematology and Oncology*. – 2012. – Vol. 29 – № 3 – P. 247–253.

120. Halaby R. D-Dimer elevation and adverse outcomes / R. Halaby, C.J. Popma, A. Cohen, G. Chi, M.R. Zacarkim, G. Romero, S.Z. Goldhaber, R. Hull, A. Hernandez, R. Mentz, R. Harrington, G. Lip, F. Peacock, J. Welker, I. Martin-Loeches, Y. Daaboul, S. Korjian, C.M. Gibson // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2015. – Vol. 39 – № 1 – P. 55–59.

121. Caruso V. Thrombotic complications in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis of 17 prospective studies comprising 1752 pediatric patients / V. Caruso, L. Iacoviello, A. Di Castelnuovo, S. Storti, G. Mariani, G. de Gaetano, M.B. Donati // *Blood*. – 2006. – Vol. 108 – № 7 – P. 2216–2222.

122. Nowak-Göttl U. Thrombosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia: epidemiology, aetiology, diagnosis, prevention and treatment / U. Nowak-Göttl, G. Kenet, L.G. Mitchell // *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. – 2009. – Vol. 22 – № 1 – P. 103–114.

123. Truelove E. The coagulopathy and thrombotic risk associated with L-asparaginase treatment in adults with acute lymphoblastic leukaemia / E. Truelove, A.K. Fielding, B.J. Hunt // *Leukemia*. – 2013. – Vol. 27 – № 3 – P. 553–559.

124. Aderka D. Bleeding due to thrombocytopenia in acute leukemias and reevaluation of the prophylactic platelet transfusion policy / D. Aderka, G. Praff, M. Santo, A. Weinberger, J. Pinkhas // *The American Journal of the Medical Sciences*. – 1986. – Vol. 291 – № 3 – P. 147–151.

125. Gaydos L.A. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia / L.A. Gaydos, E.J. Freireich, N. Mantel // *The New England Journal of Medicine*. – 1962. – Vol. 266 – P. 905–909.

126. Slats A.M. Causes of death--other than progressive leukemia--in childhood acute lymphoblastic (ALL) and myeloid leukemia (AML): the Dutch Childhood Oncology Group experience / A.M. Slats, R.M. Egeler, A. van der Does-van den Berg, C. Korbijn, K. Hählen, W.A. Kamps, A.J.P. Veerman, C.M. Zwaan // *Leukemia*. – 2005. – Vol. 19 – № 4 – P. 537–544.

127. Kuhle S. Systemic thromboembolism in children. Data from the 1-800-NO-CLOTS Consultation Service / S. Kuhle, P. Massicotte, A. Chan, M. Adams, M. Abdolell, G. de Veber, L. Mitchell // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2004. – Vol. 92 – № 4 – P. 722–728.

128. Bushman J.E. Insight into the mechanism of asparaginase-induced depletion of antithrombin III in treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia / J.E. Bushman, D. Palmieri, H.C. Whinna, F.C. Church // *Leukemia Research*. – 2000. – Vol. 24 – № 7 – P. 559–565.

129. Sehgal S. Coagulation profile during induction chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia / S. Sehgal, S. Sharma, J. Chandra, A.

Nangia // *Indian Journal of Pathology & Microbiology*. – 2017. – Vol. 60 – № 1 – P. 50–56.

130. Mitchell L.G. Effect of disease and chemotherapy on hemostasis in children with acute lymphoid leukemia / L.G. Mitchell, J.M. Halton, P.A. Vegh, R.D. Barr, T. Venneri, K.M. Pai, M.E. Andrew // *The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. – 1994. – Vol. 16 – № 2 – P. 120–126.

131. Andrew M. Venous thromboembolic complications (VTE) in children: first analyses of the Canadian Registry of VTE / M. Andrew, M. David, M. Adams, K. Ali, R. Anderson, D. Barnard, M. Bernstein, L. Brisson, B. Cairney, D. DeSai // *Blood*. – 1994. – Vol. 83 – № 5 – P. 1251–1257.

132. Nowak-Göttl U. Thromboembolic events in children with acute lymphoblastic leukemia (BFM protocols): prednisone versus dexamethasone administration / U. Nowak-Göttl, E. Ahlke, G. Fleischhack, D. Schwabe, R. Schobess, C. Schumann, R. Junker // *Blood*. – 2003. – Vol. 101 – № 7 – P. 2529–2533.

133. Appel I.M. L-Asparaginase and the effect of age on coagulation and fibrinolysis in childhood acute lymphoblastic leukemia / I.M. Appel, W.C.J. Hop, C. van Kessel-Bakvis, R. Stigter, R. Pieters // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2008. – Vol. 100 – № 2 – P. 330–337.

134. Athale U.H. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part II. Pathogenesis of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: effects of the disease and therapy / U.H. Athale, A.K.C. Chan // *Thrombosis Research*. – 2003. – Vol. 111 – № 4–5 – P. 199–212.

135. Mall V. Effect of glucocorticoids, E. coli- and Erwinia L-asparaginase on hemostatic proteins in children with acute lymphoblastic leukemia / V. Mall, K.B. Thomas, S. Sauter, C.M. Niemeyer, A.H. Sutor // *Klinische Padiatrie*. – 1999. – Vol. 211 – № 4 – P. 205–210.

136. Mitchell L. Increased endogenous thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia: risk of thrombotic complications in L'Asparaginase-induced antithrombin III deficiency / L. Mitchell, H. Hoogendoorn, A.R. Giles, P. Vegh, M. Andrew // *Blood*. – 1994. – Vol. 83 – № 2 – P. 386–391.

137. Uszyński M. Children with acute lymphoblastic leukemia: is there any subgroup of children without elevated thrombin generation? A preliminary study utilizing measurements of thrombin-antithrombin III complexes / M. Uszyński, M. Osińska, E. Zekanowska, E. Ziółkowska // *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. – 2000. – Vol. 6 – № 1 – P. 108–111.

138. Giordano P. Thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia: effect of leukemia immunophenotypic subgroups / P. Giordano, G.C. Del Vecchio, N. Santoro, G. Arcamone, B. Coppola, M. Altomare, F. Schettini, A. Iolascon, D. De Mattia // *Pediatric Hematology and Oncology*. – 2000. – Vol. 17 – № 8 – P. 667–672.

139. Rozen L. Different profile of thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with native or pegylated asparaginase: A cohort study / L. Rozen, D. Noubouossie, L. Dedeken, S. Huybrechts, P.Q. Lê, A. Ferster, A. Demulder // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2017. – Vol. 64 – № 2 – P. 294–301.

140. Gheldof D. Procoagulant activity of extracellular vesicles as a potential biomarker for risk of thrombosis and DIC in patients with acute leukaemia / D. Gheldof, H. Haguët, J.-M. Dogné, C. Bouvy, C. Graux, F. George, A. Sonet, C. Chatelain, B. Chatelain, F. Mullier // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2017. – Vol. 43 – № 2 – P. 224–232.

141. Lipets E.N. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk / E.N. Lipets, F.I. Ataulakhanov // *Thrombosis Journal*. – 2015. – Vol. 13 – № 1 – P. 4.

142. Panteleev M.A. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion / M.A. Panteleev, N.M. Dashkevich, F.I. Ataulakhanov // *Thrombosis Research*. – 2015. – Vol. 136 – № 4 – P. 699–711.

143. Tullius B.P. For the Subcommittee on Hemostasis and Malignancy and the Subcommittee on Pediatric/Neonatal Thrombosis and Hemostasis. Recommendations and guidelines. The identification of at-risk patients and prevention of venous thromboembolism in pediatric cancer: guidance from the SSC of the ISTH. / B.P. Tullius, U. Athale, C.H. Ommen, A.K.C. Chan, J.S. Palumbo, J.M.S. Balagtas // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – № 15 – P. 1–6.

144. Wiegering V. Thrombosis as a complication of central venous access in pediatric patients with malignancies: a 5-year single-center experience / V. Wiegering, S. Schmid, O. Andres, C. Wirth, A. Wiegering, T. Meyer, B. Winkler, P.G. Schlegel, M. Eyrich // *BMC hematology*. – 2014. – Vol. 14 – № 1 – P. 18.

145. Prasca S. Obesity and risk for venous thromboembolism from contemporary therapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia / S. Prasca, R. Carmona, L. Ji, R.H. Ko, D. Bhojwani, Y.A. Rawlins, S.D. Mittelman, G. Young, E. Orgel // *Thrombosis Research*. – 2018. – Vol. 165 – P. 44–50.

146. Lejhancova-Tousovska K. Profile of thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia treated by Berlin–Frankfurt–Münster (BFM) protocols: / K. Lejhancova-Tousovska, O. Zapletal, S. Vytiskova, P. Strbackova, J. Sterba // *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. – 2012. – Vol. 23 – № 2 – P. 144–154.

147. Antovic J.P. *Essential Guide to Blood Coagulation* / J.P. Antovic, M. Blombäck. – 2nd Revised edition – Wiley-Blackwell, 2013. – 216 p.

148. Баркаган З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – 3-е изд., перераб.и доп. – М.: Ньюдиамед, 2008. – 292 с.

149. Hemker H.C. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential / H.C. Hemker, S. Wielders, H. Kessels, S. Béguin // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1993. – Vol. 70 – № 4 – P. 617–624.

150. Hemker H.C. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability / H.C. Hemker, P. Giesen, R. AlDieri, V. Regnault, E. de Smed, R. Wagenvoord, T. Lecompte, S. Béguin // *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. – 2002. – Vol. 32 – № 5–6 – P. 249–253.

151. Hemker H.C. The generation of thrombin in whole plasma. Biochemical possibilities and physiological realities / H.C. Hemker, S. Béguin // *Verhandelingen - Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van Belgie*. – 1985. – Vol. 47 – № 5 – P. 321–339.

152. Ataulakhanov F.I. Spatiotemporal dynamics of clotting and pattern formation in human blood / F.I. Ataulakhanov, G.T. Guria, V.I. Sarbash, R.I. Volkova // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 1998. – Vol. 1425 – № 3 – P. 453–468.

153. Sinauridze E.I. Dynamics of clot growth induced by thrombin diffusing into nonstirred citrate human plasma / E.I. Sinauridze, R.I. Volkova, Y.V. Krasotkina, V.I. Sarbash, F.I. Ataulakhanov // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 1998. – Vol. 1425 – № 3 – P. 607–616.

154. Panteleev M.A. Spatial propagation and localization of blood coagulation are regulated by intrinsic and protein C pathways, respectively / M.A. Panteleev, M.V. Ovanesov, D.A. Kireev, A.M. Shibeko, E.I. Sinauridze, N.M.

Ananyeva, A.A. Butylin, E.L. Saenko, F.I. Ataulakhanov // *Biophysical Journal*. – 2006. – Vol. 90 – № 5 – P. 1489–1500.

155. Davey H.M. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses / H.M. Davey, D.B. Kell // *Microbiological Reviews*. – 1996. – Vol. 60 – № 4 – P. 641–696.

156. Hotz M.A. Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes / M.A. Hotz, J. Gong, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz // *Cytometry*. – 1994. – Vol. 15 – № 3 – P. 237–244.

157. Егоров А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – Москва: Высшая школа, 1991. – 288 с.

158. Lequin R.M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) / R.M. Lequin // *Clinical Chemistry*. – 2005. – Vol. 51 – № 12 – P. 2415–2418.

159. Arslan F.D. Determination of Age-Dependent Reference Ranges for Coagulation Tests Performed Using Destiny Plus [Электронный ресурс] / F.D. Arslan, M. Serdar, E. Merve Ari, M. Onur Oztan, S. Hikmet Kozcu, H. Tarhan, O. Cakmak, M. Zeytinli, H. Yasar Ellidag // *Iranian Journal of Pediatrics*. – 2016. – Vol. 26 – № In 3 – e6177.

160. Kim J.Y. Reference Intervals of Thromboelastometric Evaluation of Coagulation in Pediatric Patients with Congenital Heart Diseases: A Retrospective Investigation / J.Y. Kim, Y.R. Shin, H.K. Kil, M.R. Park, J.W. Lee // *Medical Science Monitor*. – 2016. – Vol. 22 – P. 3576–3587.

161. Miller B.E. Functional Maturity of the Coagulation System in Children: An Evaluation Using Thrombelastography / B.E. Miller, J.M. Bailey, T.J. Mancuso, M.S. Weinstein, G.W. Holbrook, E.M. Silvey, S.R. Tosone, J.H. Levy // *Anesthesia & Analgesia*. – 1997. – Vol. 84 – № 4 – P. 745–748.

162. Haidl H. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT) / H. Haidl, C. Cimenti, B. Leschnik, D. Zach, W. Muntean // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2006. – Vol. 95 – № 5 – P. 772–775.

163. Favaloro E.J. Pre-analytical Variables in Coagulation Testing Associated With Diagnostic Errors in Hemostasis / E.J. Favaloro, D.M. (Adcock) Funk, G. Lippi // *Laboratory Medicine*. – 2012. – Vol. 43 – № 2 – P. 1.2-10.

164. Weitz I.C. Eculizumab therapy results in rapid and sustained decreases in markers of thrombin generation and inflammation in patients with PNH independent of its effects on hemolysis and microparticle formation / I.C. Weitz, P. Razavi, L. Rochanda, J. Zwicker, B. Furie, D. Manly, N. Mackman, R. Green, H.A. Liebman // *Thrombosis Research*. – 2012. – Vol. 130 – № 3 – P. 361–368.

165. Hillmen P. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / P. Hillmen, P. Muus, U. Duhrsen, A.M. Risitano, J. Schubert, L. Luzzatto, H. Schrezenmeier, J. Szer, R.A. Brodsky, A. Hill, G. Socie, M. Bessler, S.A. Rollins, L. Bell, R.P. Rother, N.S. Young // *Blood*. – 2007. – Vol. 110 – № 12 – P. 4123–4128.

166. Hillmen P. Effect of Eculizumab on Hemolysis and Transfusion Requirements in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria / P. Hillmen, C. Hall, J.C.W. Marsh, M. Elebute, M.P. Bombara, B.E. Petro, M.J. Cullen, S.J. Richards, S.A. Rollins, C.F. Mojcik, R.P. Rother // *New England Journal of Medicine*. – 2004. – Vol. 350 – № 6 – P. 552–559.

167. Hillmen P. The Complement Inhibitor Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria / P. Hillmen, N.S. Young, J. Schubert, R.A. Brodsky, G. Socié, P. Muus, A. Röth, J. Szer, M.O. Elebute, R. Nakamura, P. Browne, A.M. Risitano, A. Hill, H. Schrezenmeier, C.-L. Fu, J. Maciejewski, S.A. Rollins,

C.F. Mojcik, R.P. Rother, L. Luzzatto // *New England Journal of Medicine*. – 2006. – Vol. 355 – № 12 – P. 1233–1243.

168. Helley D. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab / D. Helley, R.P. de Latour, R. Porcher, C.A. Rodrigues, I. Galy-Fauroux, J. Matheron, A. Duval, J.F. Schved, A.M. Fischer, G. Socie, on behalf of the French Society of Hematology // *Haematologica*. – 2010. – Vol. 95 – № 4 – P. 574–581.

169. Risitano A.M. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab / A.M. Risitano, R. Notaro, L. Marando, B. Serio, D. Ranaldi, E. Seneca, P. Ricci, F. Alfinito, A. Camera, G. Gianfaldoni, A. Amendola, C. Boschetti, E. Di Bona, G. Fratellanza, F. Barbano, F. Rodeghiero, A. Zanella, A.P. Iori, C. Selleri, L. Luzzatto, B. Rotoli // *Blood*. – 2009. – Vol. 113 – № 17 – P. 4094–4100.

170. Nishimura J. Genetic Variants in C5 and Poor Response to Eculizumab / J. Nishimura, M. Yamamoto, S. Hayashi, K. Ohyashiki, K. Ando, A.L. Brodsky, H. Noji, K. Kitamura, T. Eto, T. Takahashi, M. Masuko, T. Matsumoto, Y. Wano, T. Shichishima, H. Shibayama, M. Hase, L. Li, K. Johnson, A. Lazarowski, P. Tamburini, J. Inazawa, T. Kinoshita, Y. Kanakura // *New England Journal of Medicine*. – 2014. – Vol. 370 – № 7 – P. 632–639.

171. Hill A. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization / A. Hill, R.P. Rother, L. Arnold, R. Kelly, M.J. Cullen, S.J. Richards, P. Hillmen // *Haematologica*. – 2010. – Vol. 95 – № 4 – P. 567–573.

172. Tomita A. Extravascular hemolytic attack after eculizumab therapy for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / A. Tomita, Y. Shirasugi, T. Ito, H.

Tsurumi, T. Naoe // *Annals of Hematology*. – 2012. – Vol. 91 – № 7 – P. 1139–1141.

Список сокращений и обозначений

АДФ	-	Аденозиндифосфат
АИГА	-	Аутоиммунная гемолитическая анемия
АЧТВ	-	Активированное частичное тромбопластиновое время
ВМК	-	Высокомолекулярный кининоген
ГКС	-	Глюкокортикостероиды
ДВС	-	Диссеминированное внутрисосудистое свертывания
ИФА	-	Иммуноферментный анализ
ЛДГ	-	Лактатдегидрогеназа
МНО	-	Международное нормализованное отношение
НМГ	-	Низкомолекулярный гепарин
НМК	-	Низкомолекулярный кининоген
ОЛЛ	-	Острый лимфобластный лейкоз
ПВ	-	Протромбиновое время
ПИ	-	Протромбиновый индекс
ПК	-	Прекалликреин
ПНГ	-	Пароксизмальная ночная гемоглобинурия
ТАТ-комплекс	-	Тромбин-антитромбиновый комплекс
ТВ	-	Тромбиновое время
ТГВ	-	Тромбоз глубоких вен
ТГТ	-	Тест генерации тромбина
ТД	-	Тромбодинамика
ТФ	-	Тканевый фактор
ТЭГ	-	Тромбоэластография
УЗИ	-	Ультразвуковое исследование
ЦВК	-	Центральный венозный катетер
ЭТП	-	Эндогенный тромбиновый потенциал

APC	-	Активированный Протеин С
ATIII	-	Антитромбин III
α	-	угол α в ТЭГ
CD235a+	-	Гликофорин-положительный (эритроцитарный)
coli-asp	-	L-аспарагиназа
CS ₃₀	-	Размер сгустка в ТД
D	-	Плотность сгустка в ТД
Hb	-	Гемоглобин
IL	-	Интерлейкин
k	-	Кинетика в ТЭГ
MA	-	Максимальная амплитуда в ТЭГ
MP	-	Микровезикулы
MPP	-	Бедная микровезикулами плазма
NO	-	Оксид азота
PAI	-	Ингибитор активатора плазмингена
PAR	-	Рецепторы, активируемые протеиназами
PC	-	Протеин С
PFP	-	Свободная от тромбоцитов плазма
PPP	-	Бедная тромбоцитами плазма
PS	-	Протеин S
PS+	-	Фосфатидилсерин-положительный
R	-	Время реакции в ТЭГ
Tlag	-	Время задержки роста сгустка в ТД
tPA	-	Тканевый активатор плазминоген
Vi	-	Начальная скорость роста сгустка в ТД
Vs	-	Стационарная скорость роста сгустка в ТД
vWF	-	Фактор Виллебранда

Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.б.н. профессору Атауллаханову Ф.И. за помощь в подготовке диссертации, обсуждение результатов и подготовке публикаций. Автор благодарит д.б.н. Синауридзе Е.И., к.б.н. Баландину А.Н. и к.б.н. Липец Е.Н. за помощь в постановке задач, проведении экспериментов и работе над текстом диссертации. Автор благодарен д.м.н. Сметаниной Н.С. за обсуждение работы и помощь в подготовке результатов, а также помощь в публикациях и предоставление данных пациентов. Автор выражает благодарность врачу-гематологу ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрий Рогачева Жариковой Л.И. за помощь, оказанную при работе над диссертацией; начальнику группы клинического гемостаза ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева Полетаеву А.В. за помощь в организации измерений лабораторных показателей гемостаза пациентов. Автор благодарен к.б.н. Грибковой И.В. за помощь в постановке теста ТГТ. Автор благодарит директора Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева к.м.н. Масчана М.А., заведующего отделением дневного стационара ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева Пшонкина А.В. и весь коллектив врачей, ученых и медицинских сестер ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрий Рогачева за помощь в организации работы и предоставление данных о пациентах. Автор благодарен заведующей отделением орфанных болезней ФГБУ НМИЦ Гематологии Цветаевой Н.В. и всем врачам отделения за помощь и предоставление клинических данных о пациентах, принявших участие в исследовании системы гемостаза. Автор хотел бы выразить отдельную благодарность директору управления высшего профессионального образования, ординатуры, аспирантуры ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева д.м.н. профессору Шестопалову А.В., заведующему отделом высшего профессионального образования к.м.н. Анастасевич Л.А. и помощнику директора ВШМЭМ, методиста отдела высшего профессионального образования, преподавателя педагогики Николаеву Н.Ф. за обсуждение результатов и полезные замечания.