

*На правах рукописи*

Серёгина Елена Александровна

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ СВЕРТЫВАНИЯ  
ПРИ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ АНЕМИЯХ И ОСТРОМ  
ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ**

03.01.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской  
академии наук

**Научный руководитель**

**Атауллаханов Фазил Иноятович**,  
член-корреспондент РАН, доктор  
биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты**

**Миндукшев Игорь Викторович**, доктор  
биологических наук, главный научный  
сотрудник лаборатории сравнительной  
физиологии дыхания ФГБУН «Институт  
эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова» Российской академии  
наук

**Осидак Егор Олегович**, кандидат  
биологических наук, научный сотрудник  
ФГБУН «Национальный  
исследовательский центр эпидемиологии  
и микробиологии имени академика Н.Ф.  
Гамалеи» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации

**Ведущая организация**

Институт биофизики клетки Российской  
академии наук – обособленной  
подразделение ФГБУН «Федеральный  
Исследовательский Центр «Пущинский  
Научный Центр Биологических  
Исследований Российской Академии  
Наук»

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 года в \_\_\_\_ часов \_\_\_\_ минут на  
заседании Диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном  
бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля  
Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической  
физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва,  
Ленинский проспект, д. 38, и на сайте [https://biochemphysics.ru/assets/upload/documents  
/dissertaczii/Dissertaciya\\_Seregina.pdf](https://biochemphysics.ru/assets/upload/documents/dissertaczii/Dissertaciya_Seregina.pdf)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
Д 002.039.01, кандидат химических наук

Л.И. Мазалецкая

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Свертывание крови – это многоэтапный процесс, который начинается в зоне поврежденного эндотелия, где протекают одни биохимические процессы, связанные с тканевым фактором, что запускает второй, автоволновой этап роста сгустка, где работают, в основном, реакции внутреннего пути свертывания, и, наконец, процесс роста прекращается в результате формирования на поврежденной поверхности тромба из фибрина и предельно активированных тромбоцитов [1]. 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 свертывания крови – X, IX и II, с их кофакторами, и антикоагулянтного комплекса – протеина С с тромбомодулином, останавливающим распространением свертывания вне зоны повреждения [2]. Для сборки всех этих комплексов необходимы фосфолипидные поверхности со специальным набором зарядов. На сегодня известны все биохимические реакции системы свертывания крови и активность практически всех этих факторов может измеряться стандартными тестами, но все эти гомогенные тесты далеки от биофизических особенностей системы. Взвешенную и чувствительную оценку всех стадий процесса дают только интегральные тесты гемостаза, в которых процесс свертывания *in vitro* практически имитирует все стадии процесса тромбообразования *in vivo*. Поэтому глобальные тесты гемостаза, такие как тромбоэластография (ТЭГ), тест генерации тромбина (ТГТ) и тромбодинамика (ТД), все чаще используются в клинической практике. Наиболее близко имитирует ситуацию *in vivo* ТД [3].

Существует группа патологий, объединенных единым симптомом - гемолизом эритроцитов. Эти заболевания получили общее название - гемолитические анемии. Со стороны системы гемостаза гемолитические анемии характеризуются состоянием гиперкоагуляции. Клиника этих заболеваний разнообразна у детей и взрослых, но их объединяет наличие

высокого (около 30%) тромботического риска [4]. Еще одним заболеванием, сопровождающимся состоянием гиперкоагуляции является острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ). Известно, что пациенты детского возраста с ОЛЛ имеют риск развития тромбоза до 73% [5,6]. Однако до сих пор точные механизмы и молекулярные причины повышенного тромботического риска у этих пациентов остаются недостаточно изученными, не найдено коагулологических тестов, которые могли бы адекватно оценить состояния системы гемостаза при этих патологиях. Возможно, именно образование патологического количества микровезикул при гемолизе является одним из механизмов усиления свертывания крови при гемолитических анемиях.

**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 [7], 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. Следующей 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 значительно 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), 31<sup>st</sup> 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.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **введении** описана актуальность исследуемой темы, сформулированы цели и задачи исследования и дана общая характеристика работы.

**Глава 1** посвящена обзору литературы и постановке задачи настоящего исследования. Приведены основные сведения о системе свертывании крови. Рассмотрены биофизические механизмы процессов, определяющих основные стадии образования тромба – активация процесса в зоне повреждения стенки

сосуда, рост тромба вглубь кровотока по автоволновому механизму, остановка роста при достижении определенных размеров. Описаны ранее известные факты о рисках тромботических осложнений при гемолитических анемиях и остром лимфобластном лейкозе.

**Глава 2** описывает материалы и методы, в работе проведено всестороннее биофизическое исследование гемостаза пациентов с гемолитическими анемиями и ОЛЛ. Исследование одобрено независимым этическим комитетом НМИЦ Гематологии и независимым этическим комитетом НМИЦ ДГОИ имени Д. Рогачева. Все участники исследования и их законные представители подписали информированное согласие участвовать в данном исследовании. Плазменное звено гемостаза охарактеризовано с помощью стандартных тестов коагулограммы (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновый индекс по Квику (ПИ по Квику), концентрация фибриногена, и антитромбина III (АТIII)) и глобальных тестов (ТЭГ, ТГТ, ТД). С помощью ТЭГ оцениваются эластоупругие свойства крови, включающие функцию как плазменного, так и тромбоцитарного гемостаза. Автоматически рассчитывались параметры время реакции (R), альфа угол ( $\alpha$ ) и максимальная амплитуда (МА). 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 эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП, площадь под кривой). Концентрация D-димеров использована для оценки интенсивности образования и деградации фибрина. Инструментальное обследование проходимости сосудов проведено методами ультразвуковой диагностики (УЗИ). ТД регистрирует биофизические характеристики роста фибринового сгустка в пространстве при локальной активации свертывания в плазме крови иммобилизованным на поверхности кюветы тканевым фактором. Регистрация роста сгустка осуществляется с помощью видеокамеры по методу темного поля. В результате строится зависимость размера сгустка от времени. По этой зависимости определяется

время начала формирования сгустка  $Tlag$ , его начальная скорость  $V_i$  (вблизи активатора), скорость его автоволнового распространения (стационарная скорость)  $V_s$  и наличие спонтанных сгустков вдали от области активации свертывания. Спонтанные сгустки характеризуют снижение порогов возбуждения системы свертывания, которое может приводить к случайным тромбозам в любом отделе сосудистой системы.

С помощью метода проточной цитометрии измеряли концентрацию фосфатидилсерин-положительных (прокоагулянтных, аннексин-положительных) микровезикул (MP) и эритроцитарных микровезикул (CD235a+), пометив их специфическими антителами. MP получали из плазмы пациентов и здоровых добровольцев путем центрифугирования и трехкратного отмывания в буфере А в режиме 30мин×16000g. PPP – плазма, бедная тромбоцитами (режим центрифугирования 15 мин 1600g). PFP – плазма, свободная от тромбоцитов, получена из PPP (режим центрифугирования 5 мин 10000g). MPP – плазма, бедная микровезикулами получена из PPP (режим центрифугирования 30 мин 16000g). После выделения MP проводили измерение ТД в пулированной MPP плазме здоровых доноров с добавлением различных концентраций MP для оценки их прокоагулянтных свойств.

**Глава 3** посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению.

*Исследование биофизических механизмов гиперкоагуляции при анемиях различной природы: роль микровезикул, циркулирующих в крови пациентов*

Для оценки роли MP в гиперкоагуляционном состоянии пациентов с наследственным сфероцитозом и  $\beta$ -талассемией проведено исследование эффектов количества и происхождения микровезикул у этих пациентов. Как следует из анализа литературы [8], одним из главных параметров микровезикул, определяющих их эффекты в увеличении вероятности возникновения тромбозов, является наличие фосфатидилсерина на внешней поверхности мембран (фосфатидил-положительные микровезикулы (PS+)). Огромную роль в прокоагулянтных свойствах микровезикул играет также их происхождение, поскольку от этого сильно зависит их состав и физико-

химические свойства.

*Количественный вклад микровезикул в гиперкоагуляцию у пациентов с гемолитической анемией*

В исследование включено 3 пациента с диагнозом наследственный сфероцитоз (мальчики 4, 5 и 12 лет). У двоих тяжелое, кризовое течение заболевания, у одного пациента легкое течение без трансфузионной зависимости. А также 5 пациентов с диагнозом большая форма  $\beta$ -талассемии (2 девочки 8 и 17 лет, 3 мальчика 2, 14 и 15 лет). Четверо пациентов с тяжелым течением заболевания и один с легким. У всех пациентов присутствовал гемолиз эритроцитов.

В таблице 1 приведены показатели гемоглобина (Hb), общего и прямого билирубина, активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которые свидетельствуют о наличии гемолиза у пациентов. Также указаны D-димер и количество микровезикул, оцененное с помощью проточной цитометрии: фосфатидилсеринположительные микровезикулы мечены с помощью аннексина-V (MP PS+), эритроцитарные микровезикулы мечены с помощью гликофорина CD235a (MP CD235a+). Референсные значения для содержания микровезикул оценены на 5 здоровых взрослых добровольцах (2 мужчин, возраст от 18 до 40 лет). Интересно, что маркер лизиса патологических сгустков, D-димер, повышен у пациента с самым большим количеством микровезикул (таблица 1, пациент ША). Показатели стандартной коагулограммы оставались неинформативны для пациентов с гемолитической анемией, находясь в области нормальных значений кроме пациента с наследственной коагулопатией, у которого ПИ по Квику составило 16% при норме 70-120%.

**Таблица 1.** Показатели пациентов с гемолитической анемией.

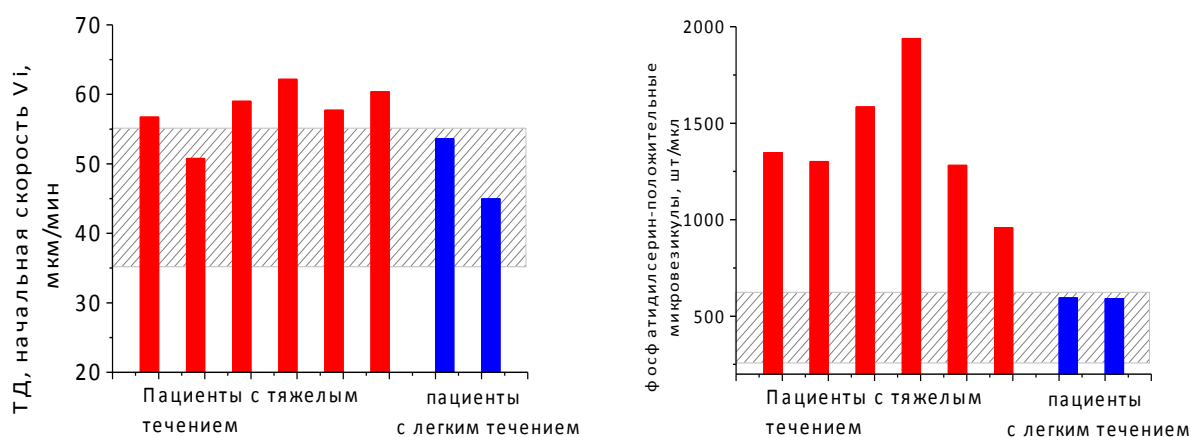
	Нб (115-138) г/л	Билирубин Общий (0-17) мкмоль/л	Билирубин прямой (0-3,4) мкмоль/л	ЛДГ (0-314) Ед/л	D-димер (0-243) нг/мл	MP PS+ (306-606) шт/мкл	MP CD235a+ (12-61) шт/мкл
ИД	<b>75</b>	<b>43,8</b>	<b>15,6</b>	223	154	<b>1348</b>	43
ГД	<b>104</b>	<b>24,3</b>	<b>7,9</b>	<b>326</b>	109	<b>1302</b>	<b>81</b>

ГМ	<b>78</b>	<b>64,8</b>	<b>7,8</b>	<b>445</b>	41	591	24
АА	<b>89</b>	<b>64,7</b>	<b>13,6</b>	260	82	<b>1585</b>	<b>78</b>
ША	<b>94</b>	<b>51,9</b>	<b>17,4</b>	<b>489</b>	<b>506</b>	<b>1939</b>	<b>205</b>
ПВ	<b>107</b>	<b>60,5</b>	<b>10,6</b>	270	16	<b>1282</b>	61
ПМ	146	<b>24,3</b>	<b>7,9</b>	202	67	595	19
СИ	136	10,6	<b>4,7</b>	248	-	<b>959</b>	<b>205</b>

\***жирным шрифтом** выделены изменения в показателях

\*\*\* окрашиванием выделены пациенты с тяжелым течением заболевания

На рисунке 1 мы видим самое большое количество фосфатидилсеринположительных везикул у тех пациентов, у которых

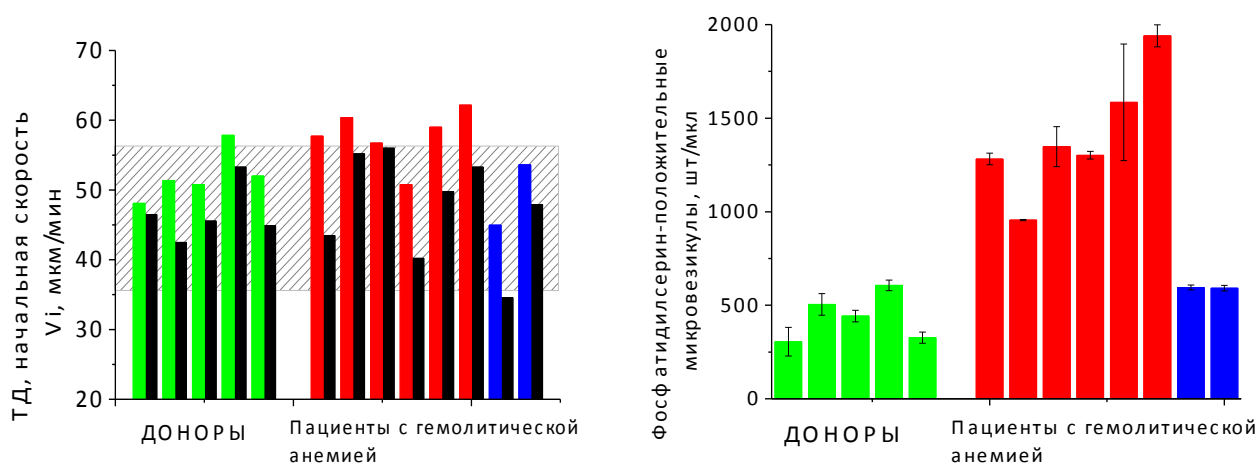


**Рисунок 1.** Параметр тромбодинамики (начальная скорость роста сгустка ( $V_i$ )) и концентрация фосфатидилсерин-положительных микровезикул у пациентов с тяжелым течением (красные столбцы) и легким течением (синие столбцы) гемолитической анемии.

наблюдалась гиперкоагуляция по скорости роста сгустка в ТД. Отсутствие гиперкоагуляции у одного пациента с тяжелым течением связано с сопутствующей коагулопатией (снижение концентрации фактора FVII до 1,5%).

При сравнении исходной плазмы и плазмы, очищенной от везикул, мы видим снижение скоростей роста сгустка, как для доноров, так и для пациентов с гемолитическими анемиями (рисунок 2).

Пациенты с наличием гиперкоагуляции в среднем имеют повышенные концентрации как фосфатидилсерин-положительных, так и эритроцитарных везикул по сравнению со здоровыми добровольцами (рисунок 2, таблица 1).



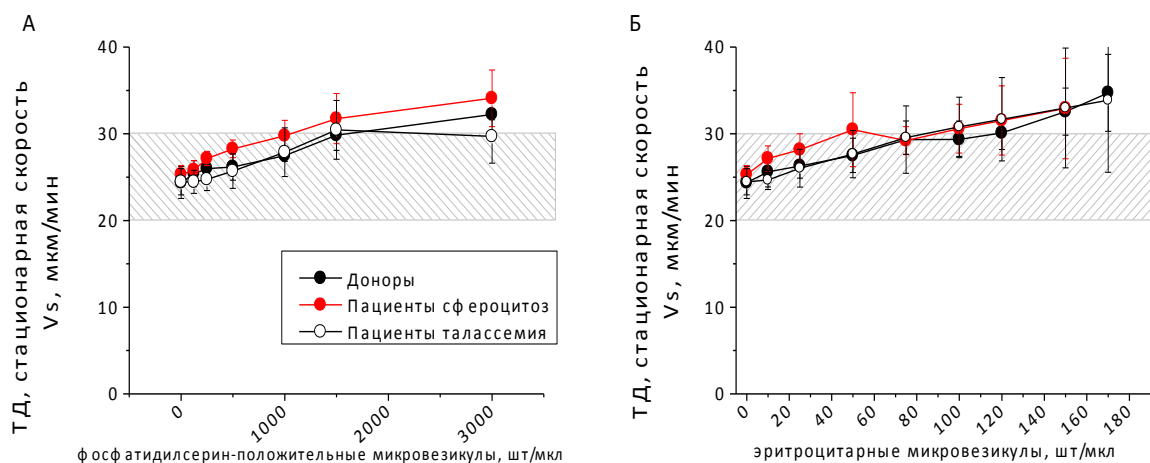
**Рисунок 2.** Сравнение начальной скорости роста сгустка между плазмой с везикулами PFP (цветные столбцы) и плазмой, очищенной от везикул MPP (черные столбцы) для доноров (зеленые столбцы), пациентов с тяжелым (красные столбцы) и легким течением (синие столбцы) гемолитической анемии.

При этом концентрация микровезикул коррелирует с тяжестью состояния пациентов и степенью гемолиза, а также с повышением скорости роста сгустка.

*Качественные характеристики микровезикул у пациентов с гемолитической анемией и у здоровых добровольцев*

Для оценки прокоагулянтной активности микровезикул, микровезикулы пациентов и здоровых доноров были сконцентрированы в 5-6 раз по сравнению с исходной концентрацией путем центрифугирования. Далее была проведена титровка на пуле нормальной MPP плазмы с добавлением от самой высокой концентрации до 0 (добавление буфера А), примерно с шагом 2.

Мы видим, что с ростом концентрации фосфатидилсерин-положительных микровезикул скорость роста фибринового сгустка быстро возрастает (рисунок 3). Уже при концентрации везикул около 2000 штук на мкл, скорость превышает верхнюю границу нормы. И это при том, что тромбоцитов – главных клеток, предоставляющих свою поверхность для сборки главных комплексов активации свертывания, в нормальной крови содержится в 100 раз больше – 200 тыс/мкл. Интересно то, что мы не нашли заметной разницы между микровезикулами, циркулирующими в крови пациентов и здоровых людей. Основной эффект гиперкоагуляции у пациентов обусловлен резким



**Рисунок 3.** Параметр ТД (стационарная скорость роста сгустка ( $V_s$ )) в зависимости от концентрации фосфатидилсерин-положительных микровезикул - А и от концентрации эритроцитарных микровезикул - Б для здоровых доноров, пациентов с наследственным сфероцитозом и пациентов с  $\beta$ -талассемией (результаты представлены в виде усредненных кривых, в качестве ошибки указано среднеквадратичное отклонение).

возрастанием концентрации везикул.

#### *Состояние системы гемостаза у пациентов с $\beta$ -талассемией*

$\beta$ -талассемия – заболевание, при котором вследствие дисбаланса  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых цепей происходит преждевременное разрушение эритроцита. Для талассемии характерен хронический гемолиз. Известно, что тяжесть клинического состояния, а вместе с ним степень гемолиза и риск тромботических нарушений, пропорционален дисбалансу глобиновых цепей. Наиболее тяжёлой формой заболевания является большая форма талассемии с мутацией в обоих аллелях гена  $\beta$ -глобина и полным отсутствием его синтеза. Чуть легче протекает промежуточная форма при наличии серьезного снижения синтеза  $\beta$ -глобина. Малая форма  $\beta$ -талассемия с мутацией в 1 аллеле как правило клинически протекает малосимптомно, наблюдается легкое снижение синтеза нормального  $\beta$ -глобина, а в анализах крови анемия 1 степени.

#### *Тромбоз у взрослого пациента с большой формой $\beta$ -талассемии.*

Пациент (мужчина, 45 лет) поступил в остром состоянии по основному заболеванию, все тесты коагулограммы пациента и ТЭГ находились в диапазоне нормальных значений, лишь АЧТВ указывало на гипокоагуляцию

(таблица 3, 1 и 2 точки). ТД при поступлении демонстрировала увеличение по начальной  $V_i$  и стационарной (автоволновой  $V_s$ ) скоростям роста сгустка, тем самым подтверждая литературные данные о склонности к повышенному свертыванию крови у пациентов с  $\beta$ -талассемией (таблица 2).

**Таблица 2.** Точки коагулологического мониторинга взрослого пациента с  $\beta$ -Талассемией

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
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, $V_i$ , мкм/мин	36-56	59	57	59	64	65	61	66
ТД, $V_s$ , мкм/мин	20-29	32	32	34	38	36	31	35
ТЭГ, $\alpha$ , град	22-58	37,2	23,8	40,5	72,3	59,8	63,3	63,9
ТЭГ, МА, мм	44-64	53,5	50	52,8	71,1	68,5	76,8	76,3

Пациенту была назначена спленэктомия (удаление селезенки). На первые сутки после операции (3-я точка коагулологического мониторинга) пациент начал жаловаться на абдоминальные боли. Однако, простые клоттинговые тесты (АЧТВ) указывали на гипокоагуляцию. По показаниям ТД гиперкоагуляция сохранялась, а параметры ТЭГ также вышли в зону гиперкоагуляции. После операции так же существенно возросли концентрации фибриногена и D-димеров (таблица 2).

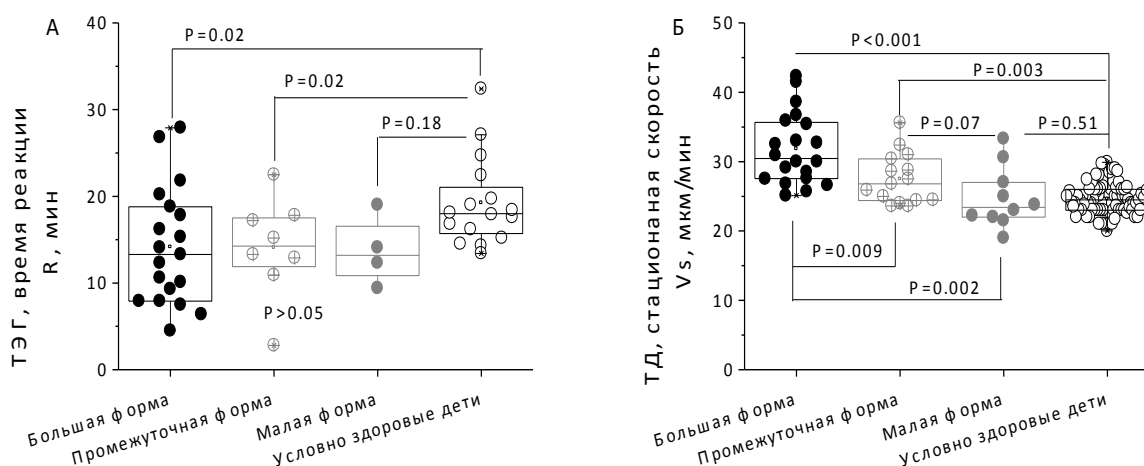
На контрольной доплерографии органов брюшной полости после 7 точки мониторинга был обнаружен тромбоз в просвете портальной и селезеночной вен и назначена соответствующая терапия. Чувствительность ТД именно к пространственному распространению волны фибрина, ускорение которой скорее всего связано со большим количеством микровезикул, которые патологически образуются при  $\beta$ -талассемии, позволили оценить высокий риск тромбоза еще до оперативного вмешательства.

*Состояние системы гемостаза у пациентов детского возраста с  $\beta$ -талассемией*



В исследование было включено 49 пациентов детского возраста с диагнозом  $\beta$ -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). В качестве контрольной группы использовалась группа 102 условно здоровых детей (62 мальчика, 40 девочек, медиана возраста 8 лет).

Известно, что риск тромбоза у детей с  $\beta$ -талассемией составляет около 5%, что на несколько порядков выше, чем в общей популяции (0,0007%).



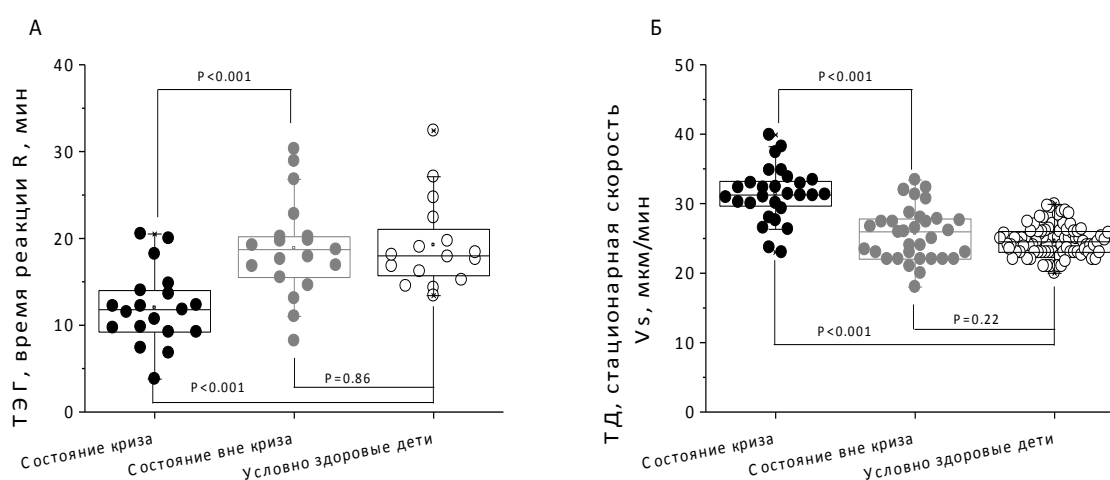
**Рисунок 4.** Параметр ТЭГ время реакции R(A) и параметр ТД стационарная скорость роста сгустка Vs(B) у детей с  $\beta$ -талассемией.

Стандартные клоттинговые тесты (АЧТВ и ПИ по Квику) значительно не отличались у пациентов от контрольной группы и остаются неинформативны ( $p>0.05$ ). Глобальный тест ТЭГ показывает статистически значимую разницу у пациентов с контрольной группой, в то время как разница между группами пациентов статистически не достоверна (рисунок 4, приведен только параметр время реакции R).

Скорость роста сгустка показывает статистически значимую разницу между группами пациентов, а также между пациентами и группой условно здоровых детей, что также соотносится с клиникой заболевания (рисунок 4). Также впервые определены параметры ТД для популяции здоровых детей.

### Состояние системы гемостаза у пациентов с наследственным сфероцитозом

В исследование включено 62 пациента с диагнозом наследственный сфероцитоз. Пациенты с гемолитической анемией 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 и острым усилением гемолиза с ухудшением клинического состояния.



**Рисунок 5.** Параметр ТЭГ время реакции R (А) и параметр тромбодинамики (стационарная скорость роста сгустка Vs) (Б) у детей с наследственным сфероцитозом.

Стандартные клоттинговые тесты (АЧТВ и ПИ по Квику) не отличались значительно от контрольной группы у пациентов в обеих группах ( $p < 0,05$ ). В качестве контрольной группы использовалась группа условно здоровых детей, описанная выше.

Все параметры ТЭГ пациентов находились в области гиперкоагуляции по сравнению с контрольной группой (рисунок 5, представлен параметр R).

Скорость роста сгустка также показывает статистически значимую склонность к повышенному свертыванию в группе пациентов во время криза по сравнению с группой пациентов вне гемолитического криза, подтверждая механизм связи между разрушением эритроцитов и увеличением скорости

движения волны генерации фибрина в пространственной динамике процесса (рисунок 5, представлен только параметр  $V_s$ ).

*Состояние системы гемостаза у пациентов с острым лимфобластным лейкозом*

В исследование включено 73 ребенка в возрасте от 1 года до 17 лет (45 мальчиков, 28 девочек, медиана возраст 5 лет), получающих специфическую терапию по протоколу ALL-MB-2015. Забор крови осуществлялся на трех курсах консолидации, каждый из которых занимает 6 недель. В соответствии с протоколом ALL-MB-2015 L-аспарагиназа вводилась еженедельно. Хорошо известно, что L-аспарагиназа ведет к снижению синтеза как про-, так и антикоагулянтных факторов свертывания. Всего предусмотрено 10 точек в течение 1, 2 и 3 консолидации: в начале каждого блока до лечения, в середине и конце блока после введения L-аспарагиназы.

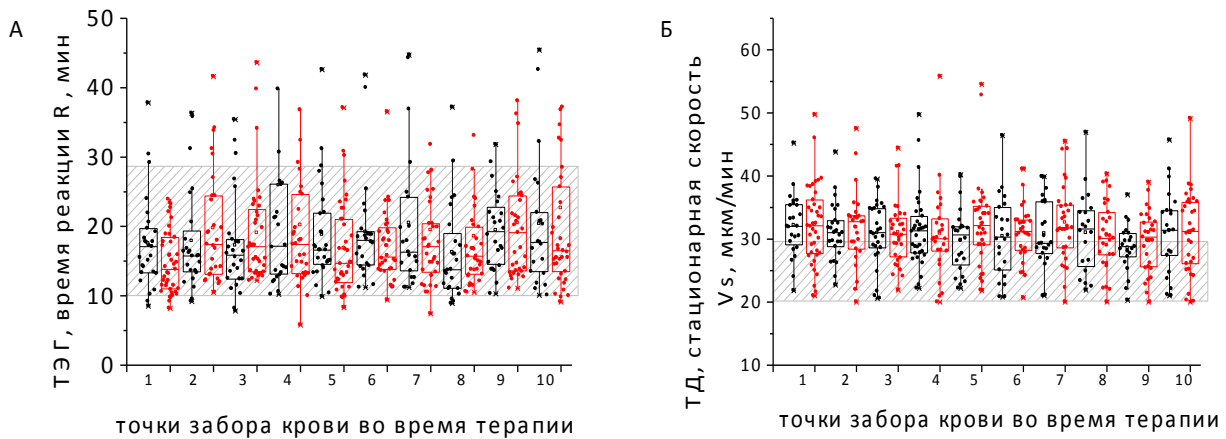
Тромботические осложнения на УЗИ зарегистрированы у 40 пациентов (55%): 5 тромбозов симптоматические (9% от всех тромбозов), остальные асимптоматические катетер-ассоциированные тромбозы, обнаруженные при контрольном исследовании УЗИ.

В 51% точек всех пациентов наблюдается удлинение АЧТВ, в 41% снижение концентрации АТIII и в 72% снижение концентрации фибриногена, что хорошо соотносится с известными фактами о снижении факторов свертывания и естественных антикоагулянтов на фоне терапии L-аспарагиназой. АЧТВ и другие стандартные тесты не чувствительны к снижению естественных антикоагулянтов и к состоянию гиперкоагуляции, не отражая глобальную автоволновую картину процесса свертывания крови. D-димер, как маркер лизиса сгустка, повышен в 15% точек, в других же остается в пределах нормы.

ТЭГ измеряет эластоупругие свойства крови и очень чувствителен дополнительно к количеству клеток крови (эритроцитов и тромбоцитов), а также к концентрации фибриногена, которые снижаются у пациентов с ОЛЛ на терапии, поэтому примерно 34% всех точек находилось в области гипокоагуляции как пациентов с тромбозами, так и без (рисунок 6, представлен

параметр время реакции R). Общая картина по ТЭГ оставалась малоинформативной на фоне развития тромбозов у этой категории пациентов.

В то же время ТД – единственный параметр, оценивающий волновую составляющую пространственного распространения сгустка, указывает на повышенный риск тромбозов периодически у всех пациентов. Это проявляется в увеличении скоростей пространственного роста фибрина, указывая на гиперкоагуляцию в 80% точек по начальной скорости и 64% точек по



**Рисунок 6.** Параметр ТЭГ (время реакции R) (А) и параметр ТД (стационарная скорость роста сгустка Vs) (Б) у детей с ОЛЛ в процессе терапии. Красные боксы – группа пациентов с тромбозами, черные боксы – группа пациентов без тромбозов.

стационарной скорости (рисунок 6, представлен параметр Vs). Сравнение групп пациентов с тромбозом (красные точки) и без (черные точки) в динамике не показало статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ). Сейчас единственным параметром, который используется для оценки роста гиперкоагуляции, является концентрация АТШ. Были выделены 2 группы с нормальной и со снижением концентрации АТШ (таблица 3).

**Таблица 3.** Совокупность показателей скорость роста сгустка в ТД, 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%

\*окрашенным обозначены группы с высоким риском тромбоза

Совместное рассмотрение исследуемых параметров (таблица 3) позволило выделить 2 подгруппы, в которых наблюдалось 53% и 45% тромботических осложнений, независимо от снижения или нормального значения концентрации естественного антикоагулянта АТIII, однако при гиперкоагуляции по ТД. При сохранении функции лизиса – повышении маркера лизиса D-димера – у пациентов с гиперкоагуляцией наблюдался меньший процент тромбозов. Поэтому возможность оценить пространственную динамику образования фибрина, которая зависит не только напрямую от концентрации про- и антикоагулянтных факторов свертывания крови, но учитывает и биофизические механизмы распространения фибринового сгустка в пространстве, позволяет увидеть значительные гиперкоагуляционные тенденции у пациентов с ОЛЛ и выделить группы риска.

### **Заключение**

В настоящей работе исследованы механизмы развития гиперкоагуляции у пациентов различного профиля с помощью биофизических методов оценки состояния системы свертывания крови. Было показано, что существенный вклад в этот процесс вносит рост концентрации прокоагулянтных микровезикул.

Исследование свойств выделенных из плазмы пациентов с гемолизом и из плазмы здоровых добровольцев микровезикул показало, что основной причиной повышения свертывания и риска развития тромбоза является именно повышение количества микровещикул, а их прокоагулянтные свойства у пациентов и здоровых людей значимо не различаются.

Впервые показано, что скорость распространения фибринового сгустка в пространстве является чувствительным биофизическим маркером для оценки повышения свертывания при гемолитических анемиях и остром лимфобластном лейкозе. А совокупность из параметров, скорость роста

сгустка, концентрация АТ III и D-димера совместно могут служить интегральным показателем для оценки риска развития жизнеугрожающих тромботических осложнений у детей с острым лимфобластным лейкозом.

### **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. Пантелеев М.А. Свертывание крови: биохимические основы / М.А. Пантелеев, Ф.И. Атауллаханов // Клиническая онкогематология. – 2008. – Т. 1 - № 1 – С. 50-62.
2. Пантелеев М.А. Пространственная динамика гемостаза и тромбоза: теория и практика / М.А. Пантелеев, А.Н. Баландина, Н.П. Сошитова, Г.М. Галстян, В.М. Емельяненко, А.И. Воробьев, Ф.И. Атауллаханов // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2010. – Т. 4 - № 44 – С. 48-60.
3. 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 // Biophysics Journal. – 2012. – Vol. 103 - № 10 – P. 2233-2240.
4. Ataga K.I. Hypercoagulability and thrombotic complications in hemolytic anemias / K.I. Ataga // Haematologica. – 2009. – Vol. 94 – № 11 – P. 1481–1484.

5. 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.
6. 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.
7. Byrnes J.R. Red blood cells in thrombosis / J.R. Byrnes, A.S. Wolberg // *Blood*. – 2017. – Vol. 130 - № 16 – P. 1795–1799.
8. Campello E. Microparticles as biomarkers of venous thromboembolic events / E. Campello, L. Spiezia, C.M. Radu, P. Simiomi // *Biomark Med*. – 2016. – Vol. 10 - № 7 – P. 743-755.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### *Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:*

1. Seregina E.A. Laboratory tests for coagulation system monitoring in a patient with beta-thalassemia / E.A. Seregina, O.F. Nikulina, N.V. Tsvetaeva, M.N. Rodionova, I.V. Gribkova, E.B. Orel, A.P. Zapariy, A.V. Erasov, A.N. Balandina, N.M. Ananyeva, F.I. Ataulakhanov // **International Journal of Hematology**. – 2014. - №99(5). - P.588-596.
2. Seregina E.A. Eculizumab effect on the hemostatic state in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / E.A. Seregina, N.V. Tsvetaeva, O.F. Nikulina, A.P. Zapariy, A.V. Erasov, I.V. Gribkova, E.B. Orel, F.I. Ataulakhanov, A.N. Balandina // **Blood Cells Molecules and Diseases**. – 2015. - 54(2). - P.144-150.
3. Кумскова М.А. Диагностика тромбастении Гланцмана с помощью исследования показателей плазмного и тромбоцитарного звена гемостаза / М.А. Кумскова, И.А. Дёмина, А.Н. Баландина, Е.А. Серёгина, Е.В. Бондар, А.В. Полетаев, Н.И. Коняшина, М.А. Пантелеев // **Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии**. – 2015. – Том 14. - №4. - С. 17-24.
4. Жарков П.А. Применение метода «Тромбориск» для оценки гемостаза у детей с тромбозом глубоких вен / П.А. Жарков, А.В. Полетаев, М.А. Грачева, Е.А. Серёгина, А.В. Пшонкин // **Доктор.ру**. – 2016. - №5(122). - С. 48-51.
5. Sinauridze E.I. Moderate plasma dilution using artificial plasma expanders shifts the haemostatic balance to hypercoagulation / E.I. Sinauridze, A.S. Gorbatenko, E.A. Seregina, E.N. Lipets, F.I. Ataulakhanov // **Scientific Reports**. - 2017. - 7(1): 843. - С.1-12.
6. Фёдорова Д.В. Диагностика врожденных нарушений функций тромбоцитов: современное состояние вопроса / Д.В. Фёдорова, П.А. Жарков, С.А. Плясунова, Е.А. Серёгина, А.А. Игнатова // **Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии**. - 2017. – Том 16. - №1. - С. 83-95.
7. Кольцова Е.М. Современные аспекты патогенеза, диагностики и терапий нарушений гемостаза у детей с острыми лейкозами. / Е.М. Кольцова, А.Н. Баландина, Е.А. Серёгина, А.В. Полетаев, Т.А. Вуймо, М.А. Пантелеев, Ф.И. Атауллахнов // **Российский журнал детской гематологии и онкологии**. - 2018. – Том 5. - № 4. - С. 74-85.

8. 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. - 46(3). – P.251-260.
9. Федорова Д.В. Диагностика тромбоцитопатий у детей: корреляция исследования функциональной активности тромбоцитов с клинической картиной и результатами агрегометрии. / Д.В. Федорова, П.А. Жарков, А.А. Игнатова, А.Ю. Федотов, Д.М. Полохов, А.В. Полетаев, Е.А. Серегина, А.В. Пшонкин // **Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.** - 2018. – Том 17. - № 1. - С. 16-22.
10. Кольцова Е.М. Аспекты методологии лабораторных исследований гемостаза в детской гематологии-онкологии и общие подходы в патологии гемостаза при лейкозах / Е.М. Кольцова, А.Н. Баландина, Е.А. Серёгина, А.В. Полетаев, Т.А. Вуймо, М.А. Пантелеев, Ф.И. Атауллаханов // **Российский журнал детской гематологии и онкологии.** - 2018. – Том 5. - №3. - С.74-88.
11. Seregina E.A., Poletaev AV, Bondar EV, Vuimo TA, Ataullakhanov FI, Smetanina NS. The hemostasis system in children with hereditary spherocytosis / E.A. Seregina, A.V. Poletaev, E.V. Bondar, T.A. Vuimo, F.I. Ataullakhanov // **Thrombosis Research.** – 2019. – 176. – P.11-17.
12. Polokhov D.M. Platelet function and blood coagulation system in childhood essential thrombocythemia. / D.M. Polokhov, N.M. Ershov, A.A. Ignatova, E.A. Ponomarenko, M.V. Gaskova, D.V. Fedorova, A.V. Poletaev, E.A. Seregina, G.A. Novichkova, N.S. Smetanina, M.A. Panteleev // **Plateletes.** – 2019. – 19. – P.1-11.

#### Список использованных сокращений

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время,  
 АТIII – антитромбин III,  
 ПИ по Квику – протромбиновый индекс по Квику,  
 ТД – тромбодинамика,  
 ТГТ – тест генерации тромбина,  
 ТЭГ – тромбоэластография,  
 Vs – стационарная скорость роста сгустка,  
 R - время реакция,  
 МА – максимальная амплитуда,  
 ЛДГ – лактатдегидрогеназа,  
 МР – микровезикулы,  
 МРР – свободная от микровезикул плазма,  
 РРР – свободная от тромбоцитов плазма,  
 РРР – плазма, бедная тромбоцитами,  
 ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз,  
 УЗИ – ультразвуковое исследование.