

УДК 616.151.5:612.115.3:616.155.294

Коррекция формирования кровяного сгустка с помощью концентрата фибриногена и активированного концентрата протромбинового комплекса в модели тяжелой тромбоцитопении

Будник И.А.¹, Морозова О.Л.¹, Цымбал А.А.¹, Шенкман Б.², Эйнав Ю.³

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Национальный центр гемофилии, Медицинский центр имени Хаима Шибы, Израиль, 52621, Рамат-Ган, ул. Эмек-ха-Эла, д. 1

³ Холонский технологический институт, Израиль, 5810201, Холон, ул. Голумб, д. 52

Тяжелая тромбоцитопения ассоциирована с риском спонтанных кровотечений, интенсивность которых варьирует от единичных петехий до угрожающих жизни кровопотерь. В то же время возможности экстренной коррекции гемостатического потенциала крови в условиях данной патологии весьма ограничены. **Цель исследования:** изучить влияние концентрата фибриногена и активированного концентрата протромбинового комплекса (АКПК) на формирование кровяного сгустка на модели тяжелой тромбоцитопении *in vitro*. **Методы.** Для создания модели тяжелой тромбоцитопении цитратную кровь, полученную от здоровых добровольцев, разделяли на обогащенную тромбоцитами плазму, бестромбоцитарную плазму и эритроцитарную массу, которые затем смешивали в определенном соотношении. Среднее содержание тромбоцитов в восстановленной (смешанной) крови составило $16 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$. Для создания модели тромбоцитопении, осложненной гемодилуцией и гиперфибринолизом, в восстановленную тромбоцитопеническую кровь добавляли 40% объема физиологического раствора и тканевой активатор плазминогена. Для коррекции коагулопатии применяли концентрат фибриногена и АКПК, конечные концентрации которых подбирали экспериментально. Формирование и лизис сгустка изучали методом ротационной тромбоэластометрии. **Результаты.** В условиях тяжелой тромбоцитопении добавление в кровь АКПК вызывало укорочение времени свертывания крови, а добавление фибриногена ускоряло процесс формирования кровяного сгустка и увеличивало его максимальную плотность. Одновременное применение указанных препаратов не вызывало дополнительного корректирующего эффекта. В условиях тяжелой тромбоцитопении, осложненной гемодилуцией и гиперфибринолизом, как АКПК, так и концентрат фибриногена вызывали укорочение времени свертывания, увеличивали скорость формирования и максимальную плотность кровяного сгустка, а также отдаляли время начала его лизиса. Одновременное использование АКПК и фибриногена обеспечивало дополнительную коррекцию коагулопатии. **Заключение.** Полученные данные демонстрируют потенциальную возможность коррекции нарушений гемостатического потенциала крови при тяжелой тромбоцитопении с помощью концентрата фибриногена и АКПК, что может учитываться при планировании клинических исследований.

Ключевые слова: тромбоцитопения, гемодилуция, фибринолиз, гемостатики, факторы свертывания крови.

Для цитирования: Будник И.А., Морозова О.Л., Цымбал А.А., Шенкман Б., Эйнав Ю. Коррекция формирования кровяного сгустка с помощью концентрата фибриногена и активированного концентрата протромбинового комплекса в модели тяжелой тромбоцитопении. Патогенез. 2018; 16(2): 23—29.

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.02.23-29

Для корреспонденции: Будник Иван Александрович, email: budnik.ivan@gmail.com

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 16.01.2018

Improving clot formation with a combination of fibrinogen concentrate and activated prothrombin complex concentrate in a model of severe thrombocytopenia

Budnik I.A.¹, Morozova O.L.¹, Tsybmal A.A.¹, Shenkman B.², Einav Y.³

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation

² National Hemophilia Center, Sheba Medical Center, Emek-Ha-Ela Str. 1, Ramat Gan 52621, Israel

³ Holon Institute of Technology, Golomb Str. 52, Holon 5810201, Israel

Severe thrombocytopenia is associated with increased risk of bleeding. The bleeding symptoms vary from single petechiae to life-threatening hemorrhage. Methods for rapid restoration of hemostatic potential in severe thrombocytopenia are still limited. **Aim.** To investigate effects of fibrinogen concentrate and activated prothrombin complex concentrate (APCC) on clot formation in an *in vitro* model of severe thrombocytopenia. **Methods.** Citrated whole blood from adult healthy volunteers was centrifuged to obtain platelet-rich plasma,

platelet-free plasma, and packed cells. To create the model of severe thrombocytopenia, the blood components were mixed at a predefined ratio. Mean platelet count in the reconstituted blood was $16 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$. In a separate series of experiments, thrombocytopenic blood was diluted with Tris-buffered saline and treated with tissue plasminogen activator to induce hyperfibrinolysis. To correct coagulopathy, blood was spiked with fibrinogen concentrate and/or APCC. Clotting was induced by recalcification and addition of tissue factor. Clot formation and lysis were monitored using rotation thromboelastometry. **Results.** Spiking of thrombocytopenia blood with APCC shortened the clotting time while spiking with fibrinogen increased the rate of clot formation and maximal clot firmness; no additive or synergistic effect was observed when both agents were used together. In the model of severe thrombocytopenia complicated with hemodilution and hyperfibrinolysis, both fibrinogen and APCC reduced the clotting time, increased the rate of clot formation and maximal clot firmness, and delayed the onset of clot lysis; when used together, the agents produced an additive effect further improving clot formation and fibrinolytic resistance of the clot. **Conclusion.** The use of fibrinogen concentrate and APCC may potentially serve as an alternative to platelet transfusion and be beneficial for the treatment of patients with severe thrombocytopenia complicated or not with hyperfibrinolysis and hemodilution.

Key words: thrombocytopenia, hemodilution, fibrinolysis, hemostatics, blood coagulation factors.

For citation: Budnik I., Morozova O.L., Tsybmal A.A., Shenkman B., Einav Y. [Improving clot formation with a combination of fibrinogen concentrate and activated prothrombin complex concentrate in a model of severe thrombocytopenia]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(2): 23-29. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.02.23-29

For correspondence: Budnik Ivan Alexandrovich, e-mail: budnik.ivan@gmail.com.

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 16.01.2018

Введение

Иммунная тромбоцитопения (ИТП) является одной из наиболее распространенных форм изолированной тромбоцитопении у детей и взрослых. ИТП характеризуется снижением содержания тромбоцитов в периферической крови ниже $100 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ и повышением риска кровотечений [1]. В основе ИТП лежит ускоренное разрушение тромбоцитов в результате взаимодействия аутоантител и аутореактивных Т-лимфоцитов с поверхностными антигенами тромбоцитов, а также нарушения мегакариопоэза [1, 2]. При снижении концентрации тромбоцитов менее $20 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ риск спонтанных кровотечений существенно возрастает. Интенсивность кровотечений при этом может варьировать от незначительных петехий на коже и слизистых до массивных кровопотерь, угрожающих жизни пациента [3]. В условиях гемодилюции и гиперфибринолиза, характерных для тяжелых травм и обширных хирургических операций, риск спонтанных кровотечений при ИТП значительно увеличивается.

Лечение при ИТП включает назначение глюкокортикоидов, внутривенного иммуноглобулина, анти-RhD-иммуноглобулина. При неэффективности этих препаратов применяют анти-CD20-антитела, агонисты рецепторов тромбопоэтина, прибегают к спленэктомии [3]. Очевидно, что для достижения терапевтического эффекта при использовании этих методов лечения может потребоваться несколько дней и даже недель, что делает их неподходящими для применения у пациентов с активным кровотечением. С целью купирования кровотечений у пациентов с ИТП в настоящее время, как правило, проводят переливание тромбоцитарного концентрата. Однако при его повторных переливаниях у некоторых пациентов формируются антитела к тромбоцитарным аллоантигенам, в результате чего последующие трансфузии тромбоцитов становятся практически неэффективными [4]. Кроме того, такой метод лечения связан с риском передачи инфекции, развития анафилаксии и других осложнений [5]. Это обстоятельство требует поиска альтернативных способов экстренной коррекции гемостатического потенциала крови в условиях тяжелой тромбоцитопении.

В последнее время интерес ученых вызывает возможность использования концентратов факторов свертывания для экстренной коррекции гемостатического потенциала крови у пациентов с ИТП. Так, известно, что введение концентрата рекомбинантного активированного фактора VII (rFVIIa) эффективно останавливало кровотечение у пациентов с тяжелой тромбоцитопенией, однако этот подход сопряжен с риском тромбоэмболических осложнений [6]. В этой работе, используя модель тяжелой тромбоцитопении *in vitro*, с помощью метода ротационной тромбоэластометрии, мы доказали возможность коррекции формирования кровяного сгустка и его фибринолитической устойчивости с помощью концентрата фибриногена и активированного концентрата протромбинового комплекса (АКПК).

Материалы и методы исследования

Соответствие исследования этическим требованиям

Настоящее исследование одобрено этическим комитетом медицинского центра имени Х.Шибы (Израиль) (протокол 9521-12-SMC от 06 декабря 2015 г.) и проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации. Перед включением в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

Взятие крови

В исследовании приняли участие 18 здоровых добровольцев, не имевших в анамнезе нарушений в системе гемостаза и не принимавших никаких лекарственных препаратов в течение 14 суток перед включением в исследование. Взятие крови осуществляли натощак пункцией срединной локтевой вены с помощью иглы-бабочки 20G при минимальном по времени наложении жгута. Кровь собирали в вакуумные пробирки, содержащие 3,2% раствор трехзамещенного цитрата натрия. Соотношение объемов антикоагулянта и крови составляло 1:9. Перед началом манипуляций образцы крови выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре.

Образцы крови центрифугировали при 134g в течение 12 мин. Полученную при этом обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) переносили в новую пробирку, а остаток центрифугировали при 1200g в течение 12 мин. Полученную при повторном центрифугировании плазму переносили в новую пробирку и центрифугировали при 10000g в течение 3 мин для получения бестромбоцитарной плазмы (БТП). Нижнюю треть осадка собирали в отдельную пробирку в качестве эритроцитарной массы (ЭМ). Для создания модели тромбоцитопении проводили восстановление крови путем смешивания ЭМ, ОТП и БТП в объемном соотношении $x : y : z$ соответственно, где x — отношение гематокрита цельной крови к гематокриту ЭМ, y — отношение необходимой концентрации тромбоцитов в восстановленной крови к концентрации тромбоцитов в ОТП, z — разность единицы и суммы значений x и y [7]. Подсчет форменных элементов в образцах восстановленной крови показал, что концентрация тромбоцитов в них составила в среднем $16 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$.

Гиперфибринолиз индуцировали с помощью тканевого активатора плазминогена (Actilyse; Boehringer Ingelheim, Германия), который добавляли в исследуемую кровь в конечной концентрации 150 МЕ/мл. Сразу после добавления тканевого активатора плазминогена образец крови перемешивали путем пипетирования и помещали в кюветы тромбозластометра, содержащие индукторы свертывания, и начинали регистрацию тэмограммы. О наличии фибринолиза свидетельствовало снижение максимальной амплитуды тэмограммы на 15% и более от MCF [8].

Гемодилюцию моделировали путем 40% разведения восстановленной тромбоцитопенической крови добавлением Трис-солевого буфера (25 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, pH 7,4).

Для исследования возможностей коррекции формирования кровяного сгустка в образцы крови также добавляли концентрат фибриногена (Haemoscomplexan; CSL Behring GmbH, Германия) и/или АКПК (FEIBA; Baxter AG, Австрия). В контрольные образцы крови добавляли соответствующий объем Трис-солевого буфера.

Ротационная тромбозластометрия

Формирование кровяного сгустка исследовали с помощью ротационного тромбозластометра ROTEM (Pentapharm, Германия). Для этого в кювету тромбозластометра помещали 20 мкл реагента star-tem (0,2 М CaCl₂) и 20 мкл разведенного 1:100 реагента ex-tem (содержит рекомбинантный тканевой фактор и фосфолипиды), после чего добавляли 300 мкл крови и тщательно перемешивали путем пипетирования. Формирование и лизис кровяного сгустка регистрировали при температуре 37°C в течение 60 мин в виде кривой — тэмограммы. Оценивали следующие ее параметры: время свертывания (СТ, с; время от начала регистрации тэмограммы до достижения амплитуды 2 мм), угол альфа (ALP, градусы; угол наклона касательной, проведенной к тэмограмме через точку, в которой амплитуда тэмограммы достигла 2 мм), максимальная плотность сгустка (MCF, мм; максимальная амплитуда тэмограммы) и время начала лизиса (LOT, мин; время от СТ до снижения амплитуды тэмограммы на 15% от MCF). Все эксперименты выполнены в стандартных условиях одним исследователем.

Статистический анализ выполнен с помощью программы GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, США). Результаты исследования в тексте представлены в виде медианы и квартилей (межквартильного размаха). Анализ зависимости показателей тэмограммы от дозы гемостатических препаратов выполнен с помощью критерия Фридмана и апостериорного критерия Данна. Сравнение показателей тэмограммы до и после добавления гемостатических препаратов проведено с помощью критерия Краскела — Уоллиса и апостериорного критерия Данна. Сравнение показателей тэмограммы в условиях тяжелой тромбоцитопении с ее показателями в условиях тяжелой тромбоцитопении, осложненной гиперфибринолизом и гемодилюцией, выполнено с помощью критерия Манн — Уитни. Межгрупповые различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Зависимость показателей тэмограммы от дозы концентрата фибриногена и АКПК в модели тяжелой тромбоцитопении

С целью подбора оптимальной дозы концентрата фибриногена и АКПК для устранения нарушений формирования кровяного сгустка в модели тяжелой тромбоцитопении мы исследовали зависимость показателей тэмограммы от концентрации указанных препаратов. Добавление в восстановленную тромбоцитопеническую кровь концентрата фибриногена (рис. 1, а) не отражалось на продолжительности СТ ни в одной из использованных доз. Показатель ALP существенно не изменялся при добавлении концентрата фибриногена в дозе 1,5 мг/мл, несколько увеличивался (не достигая уровня статистической значимости) при использовании концентрата в дозе 3,0 мг/мл и значительно увеличивался при его добавлении в дозе 4,5 и 6,0 мг/мл. Значение MCF прогрессивно увеличивалось во всем диапазоне использованных доз концентрата фибриногена. Для последующих экспериментов концентрат фибриногена было решено использовать в конечной дозе 3,0 мг/мл, поскольку, с одной стороны, эта доза вызывает заметное увеличение ALP и MCF, а с другой, оставляет потенциальную возможность для их дополнительной коррекции при использовании концентрата фибриногена одновременно с АКПК.

Добавление в восстановленную тромбоцитопеническую кровь АКПК (рис. 1, б) в дозе 0,25 Ед/мл не вызывало изменений СТ и ALP, но в диапазоне доз от 0,50 до 2,00 Ед/мл приводило к прогрессирующему сокращению СТ и увеличению ALP. В отличие от концентрата фибриногена, АКПК не оказывал влияния на величину MCF ни в одной из исследованных доз. В последующих экспериментах АКПК использовали в конечной концентрации 1,00 Ед/мл.

Влияние концентрата фибриногена и АКПК на формирование кровяного сгустка в модели тяжелой тромбоцитопении

Время свертывания (СТ) в восстановленной тромбоцитопенической крови (в контроле) составило 327 (264; 378) с. Добавление 3 мг/мл фибриногена не оказывало влияния на этот показатель, а добавление 1 Ед/мл АКПК — сокращало до 174 (141; 208) с ($p = 0,014$). При одновременном добавлении фибриногена и АКПК продолжительность СТ существенно не отличалась от таковой при добавлении только АКПК (рис. 2).

Угол альфа (ALP) в контроле составил 43,5 (38,0; 50,5). Добавление концентрата фибриногена увеличивало ALP до 63,0 (59,0; 63,3) ($p = 0,047$), тогда как добавление АКПК не вызывало существенного изменения данного показателя. При одновременном применении препаратов величина ALP не отличалась от таковой при добавлении только концентрата фибриногена.

Максимальная плотность сгустка (MCF) в контроле была равна 31,0 (30,0; 32,0) мм. Добавление концентрата фибриногена увеличивало ее до 42,5 (38,0; 44,0) мм ($p = 0,003$). Применение АКПК не вызывало изменений

MCF. Эффект от одновременного добавления этих препаратов не отличался от эффекта при использовании концентрата фибриногена отдельно.

Влияние концентрата фибриногена и АКПК на формирование и лизис кровяного сгустка в модели тяжелой тромбоцитопении, осложненной гемодилюцией и гиперфибринолизом

В условиях тяжелой тромбоцитопении, осложненной гемодилюцией и гиперфибринолизом, СТ составляло 408 (233; 471) с ($p = 0,279$, сравнение с контролем для предыду-

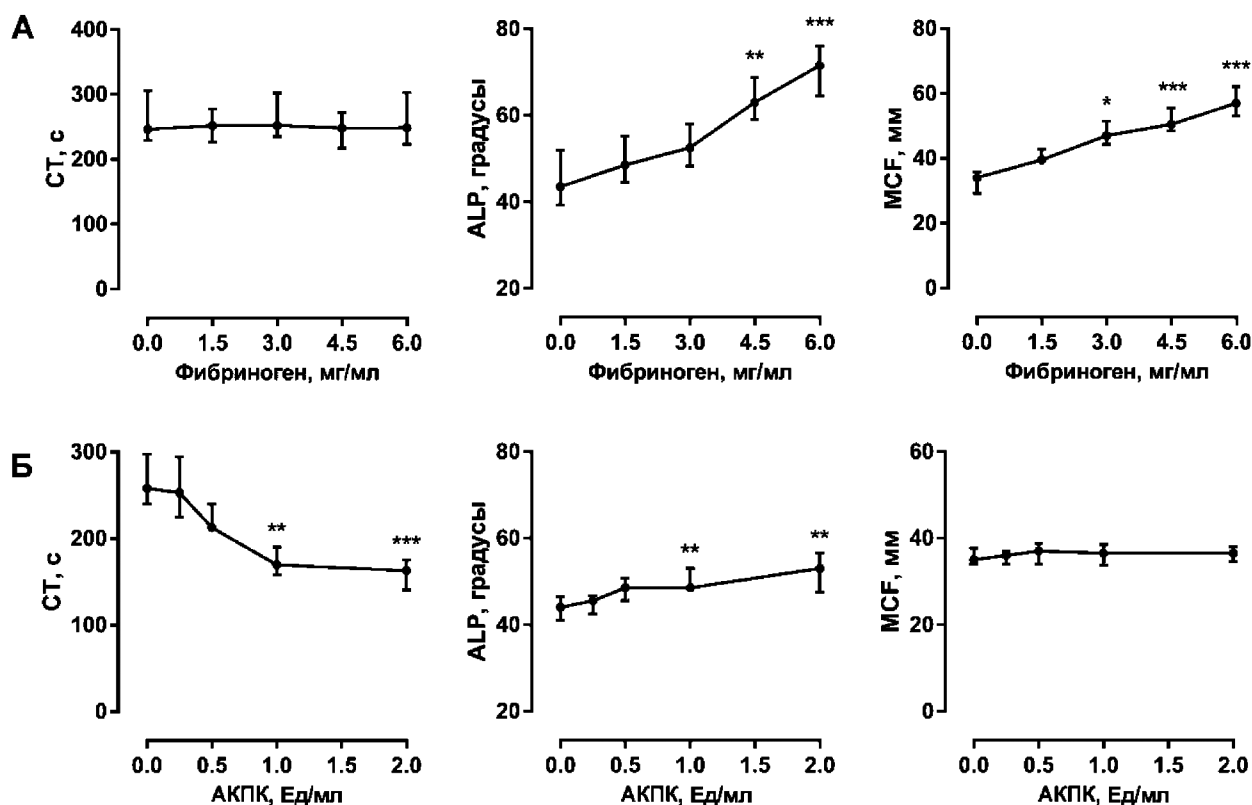


Рис. 1. Зависимость показателей тэмограммы от концентрации фибриногена (А) и АКПК (Б) в модели тяжелой тромбоцитопении. Оцениваемые показатели: время свертывания (СТ, с), угол альфа (ALP, градусы), максимальная плотность сгустка (MCF, мм). Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха ($n = 8$). Обозначения статистической значимости: *— $p < 0,05$, **— $p < 0,01$, ***— $p < 0,001$ по сравнению с контролем (по критерию Фридмана и апостериорному критерию Данна).

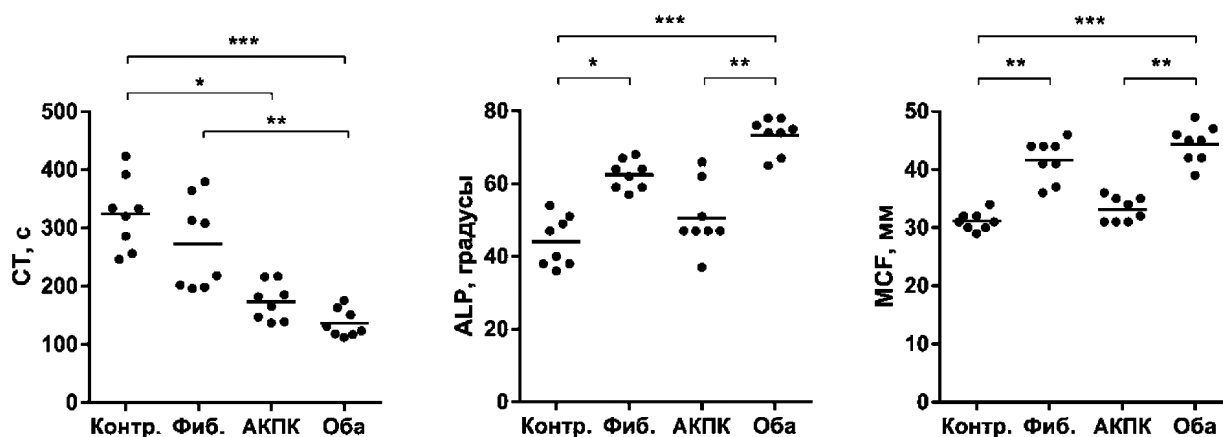


Рис. 2. Влияние концентрата фибриногена, АКПК и комбинации обоих препаратов на формирование кровяного сгустка в модели тяжелой тромбоцитопении. Оцениваемые показатели: время свертывания (СТ, с), угол альфа (ALP, градусы), максимальная плотность сгустка (MCF, мм). Каждая точка соответствует одному измерению, горизонтальная черта соответствует медиане. Анализ выполнен с помощью критерия Краскела — Уоллиса и апостериорного критерия Данна. Обозначения статистической значимости: *— $p < 0,05$, **— $p < 0,01$, ***— $p < 0,001$ (по критерию Краскела — Уоллиса и апостериорному критерию Данна).

шей модели). При добавлении концентрата фибриногена и АКПК по отдельности СТ сокращалось до 325 (225; 363) с и 213 (149; 223) с соответственно, однако при сравнении с контролем указанные изменения не достигали уровня статистической значимости. Одновременное добавление препаратов приводило к дополнительному сокращению СТ, продолжительность которого составила 153 (125; 199) с ($p = 0,004$, сравнение с контролем) (рис. 3).

В этой же модели ALP снижался до 22,0 (20,3; 25,0)° ($p = 0,001$, сравнение с контролем для предыдущей модели). Раздельное добавление концентрата фибриногена и АКПК приводило к увеличению ALP до 43,0 (40,3; 50,3)° ($p = 0,082$) и 43,5 (38,3; 49,8)° ($p = 0,060$) соответственно. При одновременном применении препаратов ALP еще больше возрастал и составлял 73,0 (70,0; 74,8)° ($p < 0,001$).

При сочетании тромбоцитопении с гиперфибринолизом и гемодилюцией MCF составила 7,5 (6,0; 13,3) мм ($p < 0,001$, сравнение с контролем для предыдущей модели). Добавление в кровь концентрата фибриногена в этих условиях не оказывало заметного изменения MCF. Напротив, использование АКПК приводило к увеличению указанного показателя до 22,5 (19,3; 25,8) мм ($p = 0,013$). При одновременном добавлении концентрата фибриногена и АКПК MCF достигал 31,5 (24,8; 34,5) мм ($p < 0,001$).

Индукция фибринолиза в разведенной тромбоцитопенической крови вызывала лизис кровяного сгустка, время начала которого (LOT) составило 10,6 (7,9; 16,7) мин. При

добавлении концентрата фибриногена или АКПК по отдельности продолжительность LOT составила 18,3 (14,3; 20,9) мин и 17,5 (17,0; 29,5) мин соответственно, однако различия с контролем не достигали уровня статистической значимости. При одновременном введении препаратов в кровь отмечалось увеличение LOT до 27,5 (20,3; 33,3) мин ($p = 0,002$).

Обсуждение

Настоящее исследование имело целью поиск новых подходов к фармакологической коррекции нарушений гемостатического потенциала крови в условиях тяжелой тромбоцитопении. Для этого изучены эффекты концентрата фибриногена и АКПК в модели указанной формы патологии. Фибриноген является одним из важнейших факторов свертывания, определяющих архитектуру и свойства кровяного сгустка. Увеличение концентрации фибриногена сопровождается уменьшением диаметра нитей фибрина, увеличением плотности и разветвленности фибриновой сети [9]. Показано, что введение концентрата фибриногена пациентам с политравмой, а также во время операций с применением аппарата искусственного кровообращения уменьшает объем периперационной кровопотери [10]. АКПК содержит фактор VII преимущественно в активированном состоянии, а также факторы II, IX и X преимущественно в неактивированном состоянии. АКПК относится к группе препаратов с шунтирующим механизмом действия и применяется для профилак-

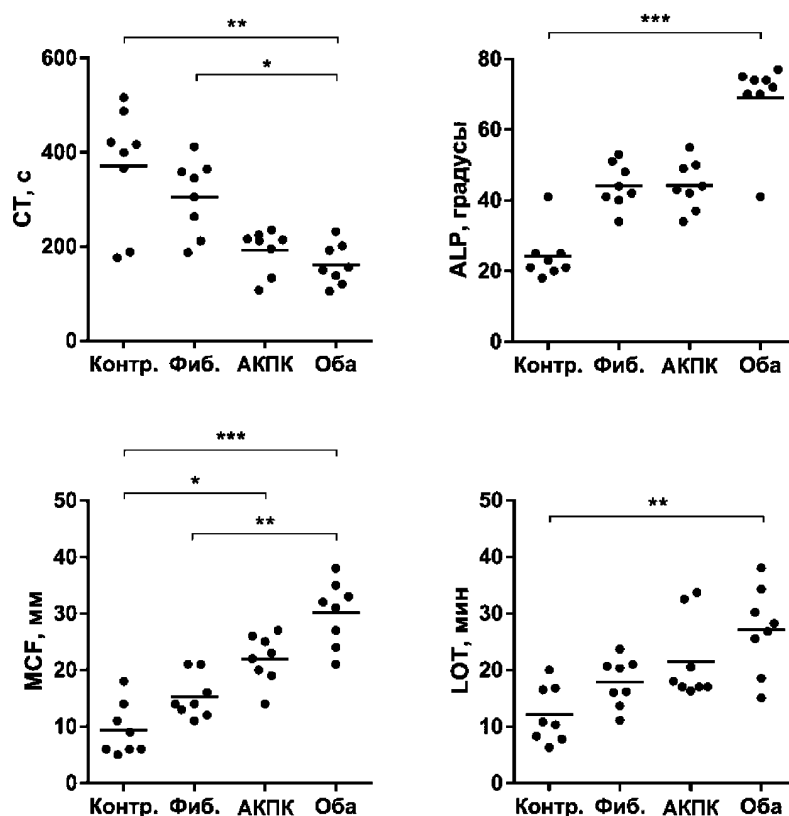


Рис. 3. Влияние концентрата фибриногена и АКПК на формирование и лизис кровяного сгустка в модели тяжелой тромбоцитопении, осложненной гемодилюцией и гиперфибринолизом. Оцениваемые показатели: время свертывания (СТ, с), угол альфа (ALP, градусы), максимальная плотность сгустка (MCF, мм) и время начала лизиса (LOT, мин). Каждая точка соответствует одному измерению, горизонтальная черта соответствует медиане. Обозначения статистической значимости: *— $p < 0,05$, **— $p < 0,01$, ***— $p < 0,001$ по сравнению (по критерию Краскела — Уоллиса и апостериорному критерию Данна).

тики и купирования кровотечений у пациентов с ингибиторной формой гемофилии [11], а также off-label при некоторых других геморрагических состояниях [12]. Одновременное применение концентрата фибриногена и концентрата протромбинового комплекса снижало объем кровопотери у пациентов с политравмой [13]. Применение комбинации этих препаратов в условиях тяжелой тромбоцитопении до настоящего времени остается недостаточно изученным.

Для достижения поставленной цели мы использовали оригинальную авторскую модель тяжелой тромбоцитопении. Эта модель позволила добиться значительного снижения содержания тромбоцитов в цельной крови без изменения гематокрита и тем самым воспроизвести изменения в периферической крови, подобные таковым у пациентов с первичной ИТП и другими формами патологии с изолированной тромбоцитопенией. Для оценки возможностей коррекции нарушений гемостатического потенциала крови с помощью концентрата фибриногена и АКПК использован метод ротационной тромбоэластометрии (ROTEM). В отличие от скрининговых коагулологических тестов, этот метод учитывает вклад не только плазменных, но и всех клеточных компонентов системы гемостаза в их взаимосвязи и позволяет дать глобальную оценку гемостатического потенциала крови обследуемого [14].

В настоящей работе показано, что в условиях тяжелой тромбоцитопении применение АКПК достоверно сокращает СТ. Это указывает на увеличение скорости генерации тромбина, а применение концентрата фибриногена увеличивает ALP и MCF, что свидетельствует об увеличении скорости формирования и максимальной плотности кровяного сгустка. При одновременном использовании эти препараты дополняли эффекты друг друга, не оказывая синергетического эффекта. Иными словами, в условиях тяжелой тромбоцитопении и АКПК и концентрат фибриногена, действуя независимо друг от друга на разные фазы формирования кровяного сгустка, при сочетании применении позволяют добиться максимального увеличения гемостатического потенциала крови.

Тяжелая тромбоцитопения связана с риском больших кровотечений. Потеря значительного объема крови приводит к гипоперфузии тканей и, как следствие, к активации эндотелия и высвобождению им тканевого активатора плазминогена [15]. Избыток последнего обуславливает чрезмерную генерацию плазмينا и развитие гиперфибринолиза. Кроме того, потеря большого количества крови требует введения объемзамещающих кристаллоидных растворов с целью поддержания системного артериального давления. Возникающая при этом гемодилюция также является фактором, повышающим фибринолитическую активность плазмы [16]. Учитывая эти обстоятельства, мы исследовали влияние АКПК и концентрата фибриногена в модели тяжелой тромбоцитопении, осложненной гиперфибринолизом, индуцированным тканевым активатором плазминогена, и 40% гемодилюцией, возникающей в случае потери человеком около 2 л крови и последующей коррекции ее объема кристаллоидными растворами. Исследования показали, что индукция фибринолиза и гемодилюция в условиях тяжелой тромбоцитопении приводят к увеличению СТ, снижению ALP и MCF и раннему началу лизиса кровяного сгустка (LOT). В этих условиях добавление концентрата фибриногена и АКПК по отдельности вызывает небольшое сокращение СТ, увеличение

ALP и MCF и отдаление LOT, а при их одновременном применении отмечался выраженный синергетический эффект.

Настоящее исследование имеет некоторые ограничения. В частности, использованная в работе модель тяжелой тромбоцитопении *in vitro* создана с использованием крови здоровых доноров и поэтому не учитывает влияние патогенетических факторов, вызывающих снижение концентрации тромбоцитов у пациентов с ИТП. Кроме того, модель тромбоцитопении не позволяет оценить влияние эндотелия сосудистой стенки и гемодинамики на формирование и лизис кровяного сгустка. Это обстоятельство требует осторожности при экстраполяции полученных результатов на клиническую ситуацию и указывает на необходимость верификации *in vivo* эффектов концентрата фибриногена и АКПК, установленных в данной работе.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что в условиях тяжелой тромбоцитопении концентрат фибриногена и АКПК оказывают различное влияние на процесс формирования кровяного сгустка. АКПК, стимулируя процесс генерации тромбина, ускоряет начало формирования кровяного сгустка, а концентрат фибриногена способствует увеличению его плотности. При сочетании тромбоцитопении с гиперфибринолизом и гемодилюцией указанные препараты оказывают синергетическое действие. В целом, полученные данные демонстрируют потенциальную возможность коррекции нарушений гемостатического потенциала крови при тяжелой ИТП и других формах изолированной тромбоцитопении с помощью концентрата фибриногена и АКПК и могут учитываться при планировании клинических исследований.

Список литературы

1. Lo E., Deane S. Diagnosis and classification of immune-mediated thrombocytopenia. *Autoimmun. Rev.* 2014; 13(4-5): 577-83. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.01.026
2. Audia S., Mahevas M., Samson M., Godeau B., Bonnotte B. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmun. Rev.* 2017; 16(6): 620-632. DOI: 10.1016/j.autrev.2017.04.012
3. Lambert M.P., Gernsheimer T.B. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia. *Blood.* 2017; 129(21): 2829-2835. DOI: 10.1182/blood-2017-03-754119
4. Forest S.K., Hod E.A. Management of the platelet refractory patient. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2016; 30(3): 665-677. DOI: 10.1016/j.hoc.2016.01.008
5. Kaufman R.M., Djulbegovic B., Gernsheimer T., Kleinman S., Tinmouth A.T., Capocelli K.E., Cipolle M.D., Cohn C.S., Fung M.K., Grossman B.J., Mintz P.D., O'Malley B.A., Sesok-Pizini D.A., Shander A., Stack G.E., Webert K.E., Weinstein R., Welch B.G., Whitman G.J., Wong E.C., Tobian A.A.; AABB. Platelet transfusion: A clinical practice guideline from the AABB. *Ann. Intern. Med.* 2015; 162(3): 205-213. DOI: 10.7326/M14-1589
6. Gurion R., Siu A., Weiss A.R., Masterson M. Use of recombinant factor VIIa in a pediatric patient with initial presentation of refractory acute immune thrombocytopenic purpura and severe bleeding. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 2012; 17(3): 274-280. DOI: 10.5863/1551-6776-17.3.274
7. Misgav M., Shenkman B., Budnik I., Einav Y., Martinowitz U. Differential roles of fibrinogen and von Willebrand factor on clot formation and platelet adhesion in reconstituted and immune thrombocytopenia. *Anesth. Analg.* 2011; 112(5): 1034-1040. DOI: 10.1213/ANE.0b013e318212fffc
8. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell. Biochem.* 2017; 82: 405-456. DOI: 10.1007/978-3-319-49674-0_13

9. Ryan E.A., Mockros L.F., Weisel J.W., Lorand L. Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys. J.* 1999; 77(5): 2813-2826. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77113-4

10. Yamamoto K., Usui A., Takamatsu J. Fibrinogen concentrate administration attributes to significant reductions of blood loss and transfusion requirements in thoracic aneurysm repair. *J. Cardiothorac. Surg.* 2014; 9(1): 90. DOI: 10.1186/1749-8090-9-90

11. Chai-Adisaksopha C., Nevitt S.J., Simpson M.L., Janbain M., Konkle B.A. Bypassing agent prophylaxis in people with hemophilia A or B with inhibitors. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 9: CD011441. DOI: 10.1002/14651858.CD011441.pub2

12. Yin E.B., Tan B., Nguyen T., Salazar M., Putney K., Gupta P., Suarez J.I., Bershad E.M. Safety and effectiveness of factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIBA) and fresh frozen plasma in oral anticoagulant-associated intracranial hemorrhage: A retrospective analysis. *Neurocrit. Care.* 2017; 27(1): 51-59. DOI: 10.1007/s12028-017-0383-x

13. Hannon M., Quail J., Johnson M., Pugliese C., Chen K., Shorter H., Riffenburgh R., Jackson R. Fibrinogen and prothrombin complex concentrate in trauma coagulopathy. *J. Surg. Res.* 2015; 196(2): 368-372. DOI: 10.1016/j.jss.2015.03.013

14. Lance M.D. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thromb. J.* 2015; 13(1): 1. DOI: 10.1186/1477-9560-13-1

15. Moore H.B., Moore E.E., Morton A.P., Gonzalez E., Frago-so M., Chapman M.P., Dzieciatkowska M., Hansen K.C., Banerjee A., Sauaia A., Silliman C.C. Shock-induced systemic hyperfibrinolysis is attenuated by plasma-first resuscitation. *J. Trauma Acute Care Surg.* 2015; 79(6): 897-904. DOI: 10.1097/TA.0000000000000792

16. Bolliger D., Szlam F., Levy J.H., Molinaro R.J., Tanaka K.A. Haemodilution-induced profibrinolytic state is mitigated by fresh-frozen plasma: Implications for early haemostatic intervention in massive haemorrhage. *Br. J. Anaesth.* 2010; 104(3): 318-325. DOI: 10.1093/bja/aeq001

References

1. Lo E., Deane S. Diagnosis and classification of immune-mediated thrombocytopenia. *Autoimmun. Rev.* 2014; 13(4-5): 577-83. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.01.026

2. Audia S., Mahevas M., Samson M., Godeau B., Bonnotte B. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmun. Rev.* 2017; 16(6): 620-632. DOI: 10.1016/j.autrev.2017.04.012

3. Lambert M.P., Gernsheimer T.B. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia. *Blood.* 2017; 129(21): 2829-2835. DOI: 10.1182/blood-2017-03-754119

4. Forest S.K., Hod E.A. Management of the platelet refractory patient. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2016; 30(3): 665-677. DOI: 10.1016/j.hoc.2016.01.008

5. Kaufman R.M., Djulbegovic B., Gernsheimer T., Kleinman S., Timmouth A.T., Capocelli K.E., Cipolle M.D., Cohn C.S.,

Fung M.K., Grossman B.J., Mintz P.D., O'Malley B.A., Sesok-Pizzini D.A., Shander A., Stack G.E., Webert K.E., Weinstein R., Welch B.G., Whitman G.J., Wong E.C., Tobian A.A.; AABB. Platelet transfusion: A clinical practice guideline from the AABB. *Ann. Intern. Med.* 2015; 162(3): 205-213. DOI: 10.7326/M14-1589

6. Gurion R., Siu A., Weiss A.R., Masterson M. Use of recombinant factor VIIa in a pediatric patient with initial presentation of refractory acute immune thrombocytopenic purpura and severe bleeding. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 2012; 17(3): 274-280. DOI: 10.5863/1551-6776-17.3.274

7. Misgav M., Shenkman B., Budnik I., Einav Y., Martinowitz U. Differential roles of fibrinogen and von Willebrand factor on clot formation and platelet adhesion in reconstituted and immune thrombocytopenia. *Anesth. Analg.* 2011; 112(5): 1034-1040. DOI: 10.1213/ANE.0b013e318212fffc

8. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell. Biochem.* 2017; 82: 405-456. DOI: 10.1007/978-3-319-49674-0_13

9. Ryan E.A., Mockros L.F., Weisel J.W., Lorand L. Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys. J.* 1999; 77(5): 2813-2826. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77113-4

10. Yamamoto K., Usui A., Takamatsu J. Fibrinogen concentrate administration attributes to significant reductions of blood loss and transfusion requirements in thoracic aneurysm repair. *J. Cardiothorac. Surg.* 2014; 9(1): 90. DOI: 10.1186/1749-8090-9-90

11. Chai-Adisaksopha C., Nevitt S.J., Simpson M.L., Janbain M., Konkle B.A. Bypassing agent prophylaxis in people with hemophilia A or B with inhibitors. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 9: CD011441. DOI: 10.1002/14651858.CD011441.pub2

12. Yin E.B., Tan B., Nguyen T., Salazar M., Putney K., Gupta P., Suarez J.I., Bershad E.M. Safety and effectiveness of factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIBA) and fresh frozen plasma in oral anticoagulant-associated intracranial hemorrhage: A retrospective analysis. *Neurocrit. Care.* 2017; 27(1): 51-59. DOI: 10.1007/s12028-017-0383-x

13. Hannon M., Quail J., Johnson M., Pugliese C., Chen K., Shorter H., Riffenburgh R., Jackson R. Fibrinogen and prothrombin complex concentrate in trauma coagulopathy. *J. Surg. Res.* 2015; 196(2): 368-372. DOI: 10.1016/j.jss.2015.03.013

14. Lance M.D. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thromb. J.* 2015; 13(1): 1. DOI: 10.1186/1477-9560-13-1

15. Moore H.B., Moore E.E., Morton A.P., Gonzalez E., Frago-so M., Chapman M.P., Dzieciatkowska M., Hansen K.C., Banerjee A., Sauaia A., Silliman C.C. Shock-induced systemic hyperfibrinolysis is attenuated by plasma-first resuscitation. *J. Trauma Acute Care Surg.* 2015; 79(6): 897-904. DOI: 10.1097/TA.0000000000000792

16. Bolliger D., Szlam F., Levy J.H., Molinaro R.J., Tanaka K.A. Haemodilution-induced profibrinolytic state is mitigated by fresh-frozen plasma: Implications for early haemostatic intervention in massive haemorrhage. *Br. J. Anaesth.* 2010; 104(3): 318-325. DOI: 10.1093/bja/aeq001

Сведения об авторах

Будник Иван Александрович — кандидат медицинских наук, PhD, доцент, доцент кафедры патофизиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Морозова Ольга Леонидовна — доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры патофизиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Цымбал Александр Александрович — доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры патофизиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Шенкман Борис Залманович — доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник Национального центра гемофилии Медицинского центра имени Хаима Шибы, Израиль

Эйнав Юлия — PhD, старший лектор инженерного факультета Холонского технологического института, Израиль