

МЕХАНИЗМ РЕТРАКЦИИ ТРОМБА И ЕГО ОЦЕНКА В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Н.Э. ДЖУМАЕВА, Р.А. САДИКОВ, О.В. КИМ, Б.А. ИСМАИЛОВ, А.А. ВОРОНИН

Республиканский Специализированный Научно-Практический Медицинский Центр Хирургии им. акад. В.Вахидова, Республика Узбекистан, г. Ташкент

ТРОМБ РЕТРАКЦИЯ МЕХАНИЗМИ ВА УНИНГ КЛИНИК АМАЛИЁТДА БАҲОСИ

Н.Э. ДЖУМАЕВА, Р.А. САДИКОВ, О.В. КИМ, Б.А. ИСМАИЛОВ, А.А. ВОРОНИН

Акад. В.Вохидов номидаги Республика Ихтисослаштирилган Илмий-Амалий Хирургия Тиббиёт Маркази, Ўзбекистон Республикаси, Тошкент шаҳри

MECHANISM OF THROMBUS RETRACTION AND ITS EVALUATION IN CLINICAL PRACTICE

N.E. DJUMAeva, R.A. Sadykov, O.V. Kim, B.A. ISMAILOV, A.A. VORONIN

Republican Special Scientific and Practical Center for Surgery named after Academician V.Vakhidov, Republic of Uzbekistan, Tashkent

Каскад реакций в процессе свертывания крови достаточно сложный, в котором важную роль играют тромбоциты. Они инициируют его и далее регулируют посредством биохимических и механических взаимодействий. Процесс свертывания протекает в 3 этапа: адгезия тромбоцитов, агрегация, ретракция. На настоящее время достаточно хорошо исследованы свертывающая и противосвертывающая системы крови, однако о механизмах, лежащих в основе ретракции тромба (РТ) сведений пока недостаточно. Важность РТ наиболее очевидна при нарушении способности тромбоцитов к сжатию и уплотнению тромба, что имеет место при дефектах гена MYH9 [10]. В результате усиливается кровоточивость тканей, тромб становится рыхлым из-за снижения силы сжатия, хотя способность тромбоцитов к агрегации и секреции в ответ на агонисты остается в пределах нормы [17]. Множество других факторов могут влиять на процесс РТ. Дефицит фактора XIII (FXIII), ответственного за связывание фибрина, может замедлить заживление ран и привести к преждевременному лизису тромба и кровотечению. Некоторые формы дисфибриногенемии также приводят к кровоточивости, тогда как другие предрасполагают к тромбозу в результате аномальной полимеризации. Тем не менее, роль РТ в тромботической окклюзии сосудов и резистентности к эндогенному и экзогенному тромболизису исследованы сравнительно недавно [22]. РТ инициируется тромбоцитами [16], действие которых осуществляется посредством сетчатой структуры фибрина [9] и приводит к вытеснению сыворотки [6]. Процесс осуществляется путем взаимодействия актина [16] и немышечного миозина IIa тромбоцитов, в результате активации тромбином [6]. Тромбин вызывает образование фибрина из фибриногена, образуя высокоэластичную полимерную сеть [14], к которой прикрепляются тромбоциты посредством гликопротеина α IIb β 3 [2]. Механические свойства фиб-

рина зависят от сшивания FXIIIa [17]. FXIIIa способствует сокращению тромба [13] путем прикрепления фибрина к сфингмиелину совместно с миозином и α IIb β 3. [12]. Поперечная сшивка FXIII важна для сохранения эритроцитов в сгустках крови [4]. В свою очередь эритроциты составляют значительную часть массы тромба, особенно в венозной крови [20]. При серповидно-клеточной анемии повышенный риск тромбоза связан с повышенной ригидностью мембраны эритроцитов [1]. Однако значимость эритроцитов в ретракции тромба только сейчас становится предметом исследований. Сила контракции, осуществляемая фибриновой сеткой и тромбоцитами, плотно упаковывает и сжимает эритроциты, что приводит к изменению формы от двухосновных до многогранных полиэритроцитов [8]. Подобная деформация эритроцитов наблюдалась как в исследованиях *in vitro*, так и в тромбах у пациентов с инфарктом миокарда [8]. Сжатие эритроцитов может способствовать уплотнению тромба, что также ухудшает проницаемость для активаторов плазминогена и придает устойчивость к фибринолизу. Установлено, что кинетика сокращения сгустка является трехфазной, и, изменяя клеточный состав, факторы коагуляции и структуру фибрина, можно наблюдать влияние состава крови на каждую из фаз РТ. Детальная кинетическая и механическая характеристика процесса сжатия сгустка дает возможность лучше идентифицировать ее роль при тромботической окклюзии сосудов и разработать новые и целенаправленные подходы к усилению гемостаза и предотвращению тромбоза.

РС представляет собой динамический процесс из 3 кинетических фаз: период инициации, линейное сокращение, стабилизация сгустка. В фазе 1 участвуют тромбоциты и фибриноген; в фазе 2 вовлекаются эритроциты; в фазе 3 происходит процесс сшивания фибрина с помощью FXIIIa.

Длительность 1 фазы РТ зависит от концентрации тромбоцитарных сократительных белков и взаимодействия тромбоцитов с фибрином [12]. Установлено, что увеличение количества тромбоцитов приводит к возрастанию скорости ретракции. Повышение концентрации фибриногена приводит к нарушению РТ. С увеличением показателя гематокрита степень РТ снижается. Известно, что эритроциты являются протромботическими [23], а тромбоэмболия является основной причиной смерти у некоторых пациентов с повышенным гематокритом и измененной ригидностью эритроцитов [15]. Эритроциты преимущественно участвуют во 2 фазе РТ. Присутствие эритроцитов в сгустке приводит к снижению степени сжатия, что более выражено с увеличением гематокрита и повышенной ригидностью эритроцитов. Продолжение процесса сжатия тромба в 3 фазу связано с ростом сократительной силы тромбоцитов в экспоненциальной зависимости. Увеличение количества тромбоцитов приводит к существенному увеличению скорости и степени сокращения тромба в 3 фазу. Стабилизация сгустка крови наиболее сильно зависит от сшивки фибрина FXIIIa [12], который увеличивает жесткость сгустка [10]. Стабилизация сгустка может быть нарушена увеличением числа эритроцитов вследствие конкурентной связи с фибрином [7] или ограничения сократительной силы тромбоцитов. Частично это может объяснить снижение скорости и степени сокращения в 3 фазе при увеличении гематокрита. РТ является динамическим многоступенчатым и многофакторным процессом. Отслеживая кинетику сокращения сгустка, мы можем получить подробную информацию о том, как отдельные компоненты крови влияют на процесс образования тромба.

В клинической практике нашли применение более простые косвенные способы оценки РТ. Они заключаются в измерении времени, необходимого для образования сгустка крови, что указывает на общую функцию тромбоцитов. Время ретракции нормального тромба составляет 0 – 2 часа. Если в качестве конечной меры используется вес сгустка или процент отделяемой сыворотки, результат зависит от объема образца крови и может иметь различные показатели в разных лабораториях [1]. Нормальные показатели ретракции означают, что внешний путь свертывания крови, который осуществляется с участием интегрин α IIbB3 протекает нормально. Это позволяет прийти к заключению о том, что общая функция тромбоцитов нормальная, хотя каждый фактор не оценивается. Внешний путь относится к каскаду реакций, которые запускаются путем связывания интегрин-лиганда. Удлинение времени ретракции сгустка означает патологию и предполагает аномалию в коагуляционном каскаде после того, как

интегрин α IIbB3 взаимодействует с фибрином. Это прогнозирует удлинение времени кровотечения и замедление формирования тромбоцитарного тромба. К примеру, это может иметь место при приобретенных или наследственных нарушениях тромбоцитов. Дисфункция рецептора интегрин α IIbB3 специфически связана с тромбастенией Гланцмана. Низкое содержание тромбоцитов или фибриногена, а также высокие концентрации эритроцитов увеличивают время ретракции сгустка. Назначение противосвертывающих препаратов также может привести к удлинению времени ретракции сгустка. Уменьшение количества отделяемой сыворотки или укороченное время ретракции сгустка может указывать на тенденцию к тромбозу и другим коагуляционным осложнениям. Эти показатели могут также зависеть от допущенных отклонений в методике проведения исследовательского теста.

Тест на ретракцию сгустка может быть проведен в любых условиях. Кровь забирается из венозного сосуда и помещается в пробирку. Антикоагулянты не используются, поскольку это приводит к ложным результатам. Образцы должны быть помещены в пробирки и наблюдаться с помощью камеры. Фотографии процесса должны проводиться в динамике каждые 30 минут с момента забора крови. Этот процесс также может осуществляться в процессе визуального наблюдения. Каждый образец должен быть нормализован до стандартного количества тромбоцитов, путем смешивания богатой тромбоцитами плазмы с плазмой пациентов с низким содержанием тромбоцитов [1]. Альтернативный метод заключается в помещении плазмы, богатой тромбоцитами, в ампулу с металлическим стержнем и средством для иницирования образования сгустка. После формирования сгустка стержень и тромб удаляются и измеряют количество выделенной сыворотки. Образец собирается в пробирку. Температура в лаборатории должна быть стандартизована, поскольку это может повлиять на результат. Образец следует оставить в покое, чтобы не мешать процессу свертывания крови. Существуют различные тесты для оценки функции тромбоцитов, включая перемешивание, гипотонический шок-тест, агрегатометр, тесты на адгезию, проточную цитометрию и тромбоэластографию [10]. При повреждении эндотелия кровеносного сосуда коллаген вызывает переход фибриногена в фибрин, улавливает тромбоциты и образуется тромб. Интегрин α IIbB3, связанный с фибрином способствует сжатию цитоскелета актин-миозина тромбоцитов, сжимая сгусток и выдавливая избыток жидкости. Точный механизм протекающей реакции остается до конца не изученным, но уже имеются предварительные сообщения [10]. В условиях организма ретракция сгустка сближает

поврежденные края сосуда, образуется более стабильный сгусток. В исследованиях *in vitro* этот процесс можно измерить и провести исследование ретракции тромба. Дисфункция тромбоцитов проявляется чрезмерным кровоизлиянием на участках слизистых, а также появлением синяков и петехий. Однако это может быть связано как с количественными, так и качественными аномалиями. При нормальном содержании тромбоцитов исключается количественная проблема, и длительное время кровотечения указывает на проблему с функцией тромбоцитов. Различные анализы могут диагностировать нарушения, которые носят приобретенную либо наследственную дисфункцию тромбоцитов [5]. Этот тест считается многими как устаревшим, так и неспецифическим; в большинстве лабораторий он был заменен более сложными методами.

Литература:

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Современные аспекты патогенеза, диагностики и терапии ДВС-синдрома // Вестн. гематол. 2005. Т. 1, № 2. 5-14 с.
2. Bennett J S. Platelet-fibrinogen interactions. // *Ann N Y Acad Sci*, 2001; 936. 340-354 с.
3. Brown AEX, Litvinov RI, Discher DE, Purohit PK, Weisel J W. Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. // *Science*, 2009; 325(5941). 741-744с.
4. Byrnes JR, Duval C, Wang Y, et al. Factor XIIIa-dependent retention of red blood cells in clots is mediated by fibrin α -chain crosslinking. // *Blood*, 2015; 126(16). 1940-1948 с.
5. Carr ME Jr. Development of platelet contractile force as a research and clinical measure of platelet function. // *Cell Biochem Biophys*, 2003; 38(1). 55-78 с.
6. Carr ME Jr, Martin EJ, Carr SL. Delayed, reduced or inhibited thrombin production reduces platelet contractile force and results in weaker clot formation.// *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2002;13(3). 193-197 с.
7. Carvalho FA, Connell S, Miltenberger-Miltenyi G, et al. Atomic force microscopy-based molecular recognition of a fibrinogen receptor on human erythrocytes. // *ACS Nano*, 2010; 4(8). 4609-4620 с.
8. Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C, et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin.// *Blood*, 2014; 123(10). 1596-1603 с.
9. Ehrlicher A, Hartwig JH. Cell mechanics: contracting to stiffness. // *Nat Mater*, 2011; 10(1). 12-13с.
10. Hartert H. Blutgerinnungsstudien mit der thromboelastographischen, einen neuen untersuchungsverfahren // *Klin Wochenschr*, 1948. Vol. 26. P. 577-583 с.
11. Ilesanmi OO. Pathological basis of symptoms and crises in sickle cell disorder: implications for counseling and psychotherapy.// *Hematol Rep*, 2010; 2(1). 2 с.
12. Kasahara K, Souri M, Miki T, Yamamoto N, Ichinose A. Impaired clot retraction in factor XIII A subunit-deficient mice. // *Blood*, 2010; 115(6). 1277-1279 с.
13. Kasahara K, Kaneda M, Miki T, et al. Clot retraction is mediated by factor XIII-dependent fibrin- α IIb β 3-myosin axis in platelet sphingomyelin-rich membrane rafts. // *Blood*, 2013; 122(19). 3340-3348 с.
14. Kim OV, Litvinov RI, Weisel JW, Alber MS. Structural basis for the nonlinear mechanics of fibrin networks under compression. // *Biomaterials*, 2014; 35(25). 6739-6749 с.
15. Kroll MH, Michaelis LC, Verstovsek S. Mechanisms of thrombogenesis in polycythemia vera. // *Blood Rev*, 2015; 29(4). 215-221 с.
16. Lam WA, Chaudhuri O, Crow A, et al. Mechanics and contraction dynamics of single platelets and implications for clot stiffening.// *Nat Mater*, 2011;10(1):61-66 с.
17. Léon C, Eckly A, Hechler B, et al. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. // *Blood*, 2007; 110(9). 3183-3191с.
18. Litvinov RI, Gorkun OV, Owen SF, Shuman H, Weisel JW. Polymerization of fibrin: specificity, strength, and stability of knob-hole interactions studied at the single-molecule level. // *Blood*, 2005; 106(9). 2944-2951 с.
19. Maciaszek JL, Andemariam B, Lykotrafitis G. Microelasticity of red blood cells in sickle cell disease. // *J Strain Anal Eng Des*, 2011; 46(5). 368-379 с.
20. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. // *Nature*, 2008; 451(7181). 914-918 с.
21. Ono A, Westein E, Hsiao S, et al. Identification of a fibrin-independent platelet contractile mechanism regulating primary hemostasis and thrombus growth. // *Blood*, 2008; 112(1). 90-99 с.
22. Sutton JT, Ivancevich NM, Perrin SR Jr, Vela DC, Holland CK. Clot retraction affects the extent of ultrasound-enhanced thrombolysis in an *ex vivo* porcine thrombosis model. // *Ultrasound Med Biol*, 2013; 39(5). 813-824 с.
23. Whelihan MF, Mann KG. The role of the red cell membrane in thrombin generation. // *Thromb Res*, 2013; 131(5). 377-382 с.
24. Ząbczyk M, Sadowski M, Zalewski J, Undas A. Polyhedrocytes in intracoronary thrombi from patients with ST-elevation myocardial infarction.// *Int J Cardiol*, 2015;179. 186-187 с.