

УДК 577.359

©Коллектив авторов

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СОСТОЯНИЕ ПЛАЗМЕННОГО ГЕМОСТАЗА *IN VITRO* С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ТРОМБОДИНАМИКИ

**И.А. Щербина<sup>1,3</sup>, Е.Н. Липец<sup>1</sup>, А.А. Абеева<sup>4</sup>,  
А.Н. Баландина<sup>1,4</sup>, Ф.И. Атауллаханов<sup>1,2,3,4,5\*</sup>**

<sup>1</sup>Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Министерства здравоохранения РФ, 117198 Москва, ул. Саморы Машела, д. 1; факс: +7 (495)-664-70-78; эл. почта: info@fccho-moscow.ru

<sup>2</sup>ООО “Гематологическая корпорация”, 125319 Москва, 4-я улица 8 Марта, д. 3; тел. +7(495)-258-25-38; эл. почта: mail@hemacore.com

<sup>3</sup>Гематологический научный центр Министерства здравоохранения РФ, 125167 Москва, Новый Зыковский пр., д. 4а; факс: +7(495)-612-88-70

<sup>4</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН; 119991 Москва, ул. Косыгина, д. 4; факс: +7 (495)-938-25-33; эл. почта: gla2001@mail.ru

<sup>5</sup>МГУ им. Ломоносова, Физический факультет, 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 2; факс: +7 (495)-932-88-20; эл. почта: dean@phys.msu.su

ОС помощью метода тромбодинамики – нового метода *in vitro* диагностики состояния гемостаза, имитирующего процесс роста гемостатического тромба от места повреждения в сосуде *in vivo*, исследовали процесс пространственного формирования фибринового сгустка в свободной от тромбоцитов плазме здоровых добровольцев без перемешивания при температурах от 20°C до 43°C. Были установлены температурные зависимости комплексов внешней и внутренней теназ, определяющих величину начальной и стационарной скоростей, соответственно. Понижение температуры с 37°C до 24°C удлиняет, главным образом, фазу инициации роста сгустка, в то время как стационарная скорость роста остается практически неизменной. При этом ни один из параметров тромбодинамики не указывал на драматическое изменение состояния плазменной системы свертывания при понижении температуры до 24°C (острая гипотермия). Метод тромбодинамики позволил выдвинуть дополнительные аргументы в пользу того, что само понижение температуры не приводит к существенному изменению состояния плазменной системы гемостаза.

**Ключевые слова:** тромбодинамика, гипотермия, пространственный рост сгустка, кровоточивость.

## ВВЕДЕНИЕ

Система плазменного гемостаза представляет собой сложный каскад ферментативных реакций, который выполняет важную функцию поддержания баланса между жидким и гелеобразными состояниями крови [1]. Нарушения работы этой системы приводят к развитию тромботических

или геморрагических осложнений, которые могут стать причиной смерти пациента. Сложность устройства системы гемостаза, с одной стороны, позволяет поддерживать стабильность работы этой системы в здоровом организме, подвергнутом воздействию изменяющихся условий внешней среды, а с другой, – существенно усложняет процесс предсказания поведения

\* - адресат для переписки

системы в нестандартных условиях при патологических состояниях гемостаза. Одним из параметров, способных оказывать существенное влияние на систему гемостаза, является температура.

Гипотермия, или понижение температуры тела ниже 35°C, часто спонтанно возникает у пациентов с травмами и сопряжена с повышенным риском развития геморрагических осложнений [2, 3]. У пациентов с пониженной температурой тела кровотечение может возникать даже тогда, когда результаты рутинных коагулологических тестов не показывают отклонений от нормы [4].

Понижение температуры снижает активность факторов каскада свертывания [4, 5], ухудшает агрегационные и адгезивные свойства тромбоцитов [6-8], ингибирует синтез фибриногена [8] и активирует фибринолиз [9], что может приводить к повышенной склонности к кровоточивости. Вероятно, понижение температуры замедляет процесс полимеризации молекул фибрина [8].

Данные о степени влияния гипотермии на плазменный гемостаз, полученные с помощью рутинных лабораторных анализов системы свертывания, противоречивы. Одни исследования указывают на сильное подавление активностей белков каскада свертывания, приводящее к повышению риска развития кровоточивости [4, 5], другие исследователи говорят о незначительном снижении активности системы гемостаза при понижении температуры до 33°C-35°C и считают гипотермию не определяющим, а лишь одним из многих факторов, повышающих риск развития кровотечений [8].

В настоящей работе произведена оценка степени влияния температуры на состояние плазменного гемостаза *in vitro* с помощью метода тромбодинамики. Данный метод позволяет исследовать процесс формирования фибринового сгустка от поверхности с нанесенным на неё тканевым фактором вглубь плазмы, имитируя процесс роста гемостатического тромба от места повреждения эндотелия вглубь сосуда. Исследуемый образец плазмы не перемешивается, экспериментальная система остаётся гетерогенной, что приближает условия постановки данного теста к условиям *in vivo*. Метод позволяет разделить начальную фазу активации свертывания вблизи "места повреждения" и фазу стационарного роста сгустка вдали

от активатора, что дает исследователю возможность получить новую информацию о состоянии системы свертывания, скрытую в результатах рутинных клоттинговых тестов, а также интуитивно интерпретировать результаты исследования при отклонении условий проведения анализа от стандартных. Ранее с помощью этого метода были исследованы нарушения свертывания при гемофилиях А и Б [10-12], при дефицитах факторов свертывания [13, 14]. Также с помощью метода тромбодинамики изучены прокоагулянтные изменения в плазме при добавлении тромбоцитарных микровезикул и активированного рекомбинантного фактора VII [15].

В настоящей работе с помощью метода тромбодинамики показано, что понижение температуры в норме не приводит к существенному изменению состояния плазменной системы гемостаза.

## МЕТОДИКА

### Реагенты

В работе были использованы следующие реагенты: человеческий фактор IXa ("HTI", США), тромбин ("Haematologic Technologies", США), рекомбинантный фактор VIIa ("Novo Nordisk", Дания), ЭДТА ("Helicon", Россия), PPACK ("Calbiochem", Германия), Ха-специфический хромогенный субстрат S2765 ("Chromogenix", Италия), фактор Ха ("Enzyme Research Laboratories", США), молочная кислота, кальция хлорид ("LabChem", Россия), тромбопластин, реагенты для измерения АЧТВ, ПВ, Гепарин ("Renam", Россия), Натрия хлорид, PEG 6000, Tris ("Sigma", США). Специфический ингибитор фактора XIIa из кукурузы (corn tripsin inhibitor CTI) был приготовлен из зёрен кукурузы, как описано в работе [16] в Институте исследования белка (Россия).

Искусственные фосфолипидные везикулы готовили следующим образом: фосфолипиды Avanti ("Alabaster", США) переносили в круглодонную колбу, высушивали 30 мин под струёй азота, затем 30 мин гидратировали в буфере (HEPES (20 мМ), 140 мМ NaCl, pH=7,5) при температуре 50°C. Содержимое колбы постоянно перемешивалось. Полученный раствор замораживали, размораживали, нагревали до температуры 50°C и пропускали через мембрану экструдера (диаметр пор составлял 100 нм).

*Забор крови и подготовка образцов.*

Исследование было одобрено этическим комитетом Гематологического научного центра. В нем приняли участие 15 здоровых добровольцев (средний возраст 27 лет (23-33), 6 мужчин, 9 женщин), не страдающих острыми заболеваниями, не принимающих медикаментозной терапии и оральных контрацептивов, не имевших каких-либо коагулопатических проявлений в прошлом.

Все участники исследования подписали информированное согласие. Образцы крови были собраны в пластиковые пробирки с 3,8% цитратом натрия (pH 5,5) в объёмном соотношении кровь : цитрат, равном 9:1. Не позднее, чем через час после забора крови, были приготовлены образцы свободной от тромбоцитов плазмы с помощью двукратного центрифугирования при комнатной температуре (цельную кровь центрифугировали при 1600 g 15 мин, затем супернатант подвергали повторному центрифугированию при 10000 g в течение 5 мин). Из полученных образцов плазм было составлено 7 пулов в случайном порядке (в каждом пуле присутствовали образцы плазм от трёх добровольцев).

*Метод тромбодинамики*

Тромбодинамика – это новый метод исследования состояния гемостаза *in vitro*, имитирующий процесс роста фибринового тромба *in vivo* от места повреждения стенки сосуда. Исследование проводили на экспериментальных приборах Thrombodynamics Analyser, предоставленных компанией ООО “ГемаКор” (Россия). Прибор имеет цифровую микрофотокамеру, термостат с регулируемой температурой, куда помещается прозрачная кювета с исследуемым образцом плазмы, и возможность подключения к компьютеру.

В ходе исследования тромбодинамики процесс свёртывания запускается при контакте исследуемого образца плазмы с тканевым фактором, иммобилизованным на торце пластиковой вставки-активатора. Фибриновый сгусток начинает формироваться вблизи активатора и постепенно распространяется вглубь объема плазмы. Схема экспериментальной установки и принцип метода приведены в работе [17].

За 10 мин до начала эксперимента в 150 мкл свободной от тромбоцитов плазмы добавляли 6 мкл СТИ (в концентрации 10 мг/мл). Раствор СТИ содержал высокую

концентрацию буфера HEPES (0,75 М, pH 7,4), что позволяло автоматически достигать в образце плазмы уровня pH 7,4-7,6 после добавления данного раствора. Активаторы были приготовлены по методике, описанной в [18]. Кальция хлорид (1 М), активатор и образец плазмы инкубировали при 37°C в течение 10 мин перед экспериментом.

Затем исследуемый образец плазмы рекальцифицировали добавлением 3 мкл хлорида кальция 1 М и помещали в тонкую прозрачную полистироловую измерительную кювету, расположенную в термостате прибора. После этого в кювету аккуратно вставляли активатор, устанавливали дополнительное давление 0,5 атмосфер для избежания формирования пузырьков на поверхности активатора и запускали фотосъемку. Рассеянный растущим сгустком свет регистрировали с помощью метода тёмного поля каждые 15 с в течение 60 мин.

В каждом опыте температуру термостата устанавливали на 24°C, 28°C, 33°C, 37°C, 39°C, 41°C или 43°C.

*Обработка изображений и анализ данных*

Полученные снимки обрабатывали с помощью специального программного обеспечения. Для каждого снимка серии вычитали интенсивность первого фонового кадра. Затем для серии снимков выбирали прямоугольную область, содержащую поверхность активатора, фибриновый сгусток и свободную от сгустка плазму. Внутри этой области производили послойный расчёт интенсивности светорассеяния в зависимости от расстояния до поверхности активатора, после чего строили профили сгустков [17]. Размер сгустка в каждый момент времени определялся как координата, в которой интенсивность светорассеяния была равна половине максимальной, что соответствует превращению половины фибриногена в фибрин [13]. Далее, пользуясь кривой зависимости размера сгустка от времени, были вычислены следующие параметры: начальная скорость роста сгустка ( $V_i$ ) – угол наклона прямой, аппроксимирующей кривую зависимости размера сгустка от времени в первые 10 мин после начала формирования сгустка; стационарная скорость роста сгустка ( $V_{st}$ ) – угол наклона прямой, аппроксимирующей кривую зависимости размера сгустка от времени в последующие 30 мин; размер сгустка на 30-й мин.

## Статистический анализ

Статистическую обработку производили в программе OriginPro 8.0 ("OriginLab Corporation", США).

## Измерение pH зависимостей

Для исследования зависимости интенсивности процесса роста сгустка от уровня pH плазмы метод тромбодинамики был проведён на образцах плазмы, уровень pH в которых был выставлен на значениях с 6,0 до 9,0 с помощью добавления 10% молочной кислоты или раствора карбоната калия до достижения требуемого уровня pH. Уровень pH образца определялся с помощью pH-метра ("Аквилон", Россия).

## Измерение активности внешней и внутренней теназы

Для исследования зависимостей активностей внутренней теназы от температуры комплекс факторов VIIa и IXa был собран на фосфолипидной поверхности путем смешивания 40 мкл фосфолипидов (5000 нМ) с  $\text{CaCl}_2$  (5 мМ) и 40 мкл смеси, содержащей фактор VIIa (40 нМ), фактор IXa (0,2 нМ), фактор X (800 нМ), PPACK (2000 нМ). Фактор VIIa был подготовлен непосредственно до эксперимента с помощью инкубации 40 нМ фактора VIII с 1 нМ тромбином в течение 1 мин, после чего добавляли 2 мМ PPACK для инактивации тромбина. Активацию фактора X осуществляли в течение 4 мин при температурах 20°C, 28°C, 37°C, 43°C, после чего процесс останавливали с помощью добавления 80 мкл ЭДТА (10 мМ). Затем добавляли Ха – специфичный хромогенный субстрат S2765 (140 мкл, конечная концентрация 0,4 мМ). Скорость расщепления хромогенного субстрата, зависящую в данном опыте от активности комплекса внутренней теназы, определяли при 405 нм с помощью прибора Thermomax microplate reader ("Molecular Devices", США) в кинетическом режиме.

Для определения зависимости активности внешней теназы от температуры были проведены следующие эксперименты. В 0,02 мл раствора фактора VIIa (0,3 мМ), содержащего хлорид кальция (15 мМ) в буфере А (1 М буфер Tris, 150 мМ NaCl, 0,1% PEG 6000, pH 8,7) был добавлен раствор тканевого фактора (10 пМ). Затем был добавлен 0,02 мл раствора фактора X

(1,5 мМ) в буфере А. После 15 мин инкубации при температурах 20°C, 28°C, 37°C, 43°C добавляли 0,04 мл раствора, содержащего ЭДТА (25 мМ) и Ха – специфичный хромогенный субстрат S2765 (3,76 мМ). Скорость расщепления хромогенного субстрата, зависящую в данном опыте от активности комплекса тканевого фактора и фактора VIIa, определяли при длине волны 405 нм с помощью прибора Thermomax microplate reader ("Molecular Devices") в кинетическом режиме.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

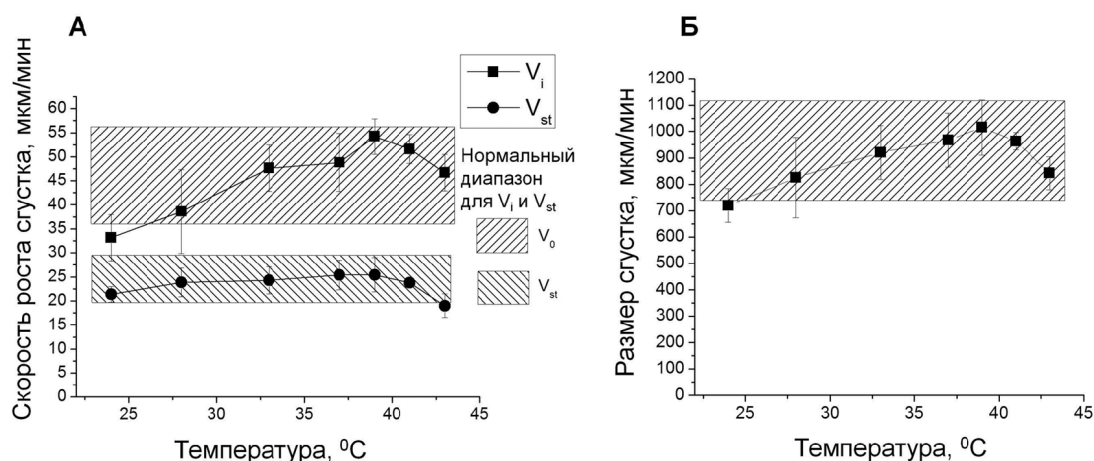
### Зависимость параметров тромбодинамики от температуры в плазме здоровых добровольцев.

Для изучения степени влияния температуры на плазменный гемостаз метод тромбодинамики был проведён на пулах плазм здоровых добровольцев при температурах 24°C (острая гипотермия), 28°C, 33°C (температура тела, сопряжённая с повышенным риском развития кровотечений по сравнению с 37°C) (n=7), 37°C (n=10), 39°C, 41°C и 43°C (n=3). На рисунке 1 представлены зависимости параметров тромбодинамики от внешней температуры. С ростом температуры  $V_i$  увеличивалась от  $(33 \pm 5)$  мкм/мин при 24°C до  $(49 \pm 6)$  мкм/мин при 37°C (рис. 1А). Размер сгустка увеличился с  $(719 \pm 64)$  мкм при 24°C до  $(967 \pm 102)$  мкм при 37°C (рис. 1Б). В то же время  $V_{st}$  лишь незначительно увеличилась с  $(21 \pm 2)$  мкм/мин при 24°C до  $(25 \pm 3)$  мкм/мин при 37°C (рис. 1А). Уменьшение температуры с 37°C до 24°C приводит к удлинению фазы инициации свертывания, однако фаза стационарного роста сгустка не претерпевает существенных изменений. При температурах выше 41°C наблюдается уменьшение активности свертывающей системы.

Заштрихованные области на рисунке 1 показывают диапазон нормальных значений для каждого параметра при 37°C (среднее  $\pm 2sd$ ). Данные по референсным значениям параметров тромбодинамики получены при предварительном обследовании 45 здоровых добровольцев.

С понижением температуры наблюдается замедление начальной и стационарной фаз формирования сгустка, однако даже при понижении температуры до 24°C отклонения параметров тромбодинамики от нормальных значений незначительны. Кроме того,





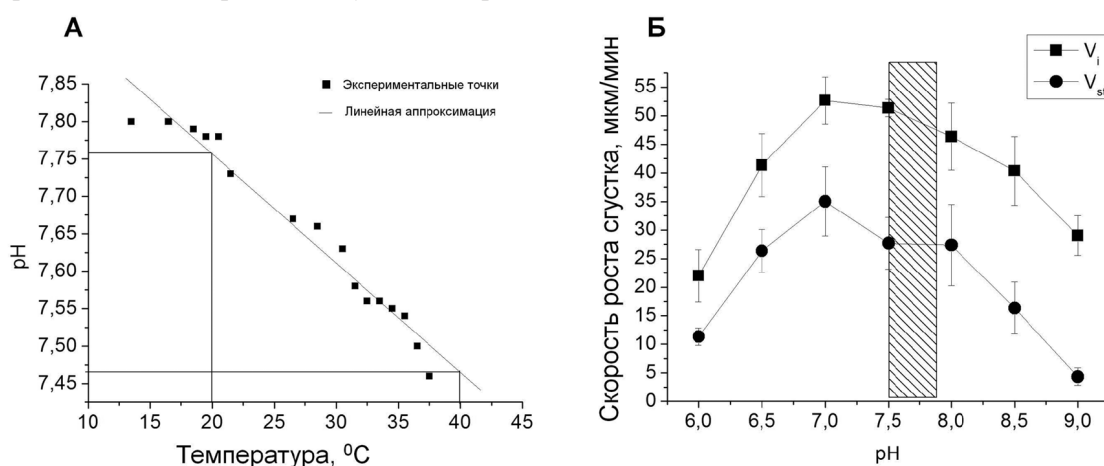
**Рисунок 1.** Зависимости значений параметров тромбодинамики от температуры в пулированной плазме здоровых добровольцев. **А.** Зависимость начальной (квадратные точки) и стационарной (круглые точки) скоростей роста сгустка от температуры. **Б.** Зависимость размера сгустка от температуры. На графиках приведены значения средних и стандартные отклонения.  $N(t^{\circ}<37^{\circ}\text{C}) = 7$ ;  $N(t^{\circ}=37^{\circ}\text{C}) = 10$ ;  $N(t^{\circ}>37^{\circ}\text{C}) = 3$ . Заштрихованные области указывают на диапазон нормальных значений, полученных при обследовании 45 здоровых добровольцев.

различия значений скоростей роста сгустка в температурном диапазоне  $28^{\circ}\text{C}$ - $37^{\circ}\text{C}$  статистически недостоверны ( $p>0,05$ , попарный критерий Стьюдента). Согласно полученным данным, понижение температуры до  $33^{\circ}\text{C}$ - $28^{\circ}\text{C}$  не должно приводить к геморрагическим нарушениям гемостаза здорового донора.

#### Зависимость скорости роста фибринового сгустка от уровня pH плазмы

Скорости биохимических реакций сильно зависят от pH среды. В методе тромбодинамики pH исследуемого образца

плазмы стабилизируется с помощью высокой концентрации буфера HEPES. Однако, чтобы исключить предположение о том, что наблюдаемые в настоящем исследовании температурные зависимости параметров тромбодинамики объясняются нефизиологическим изменением pH буфер содержащего образца при понижении температуры, были измерены температурные зависимости pH образцов после добавления опытных концентраций буфера, а также сняты зависимости скоростей роста сгустка от pH исследуемого образца при  $37^{\circ}\text{C}$ . Результаты представлены на рисунке 2(А, Б).



**Рисунок 2.** Влияние pH на состояние плазменного гемостаза. **А.** Температурная зависимость pH образца плазмы, содержащей буфер HEPES (0,75 М). **Б.** Зависимость начальной (квадратные точки) и стационарной (круглые точки) скоростей роста сгустка от pH образца плазмы при  $37^{\circ}\text{C}$ . На графиках приведены значения средних и стандартные отклонения.  $N=3$ . Заштрихованная область показывает диапазон pH, в котором изменяется уровень pH исследуемого образца при понижении температуры с  $40^{\circ}\text{C}$  до  $20^{\circ}\text{C}$ .

Заштрихованная область на рисунке 2Б. показывает диапазон рН, в котором изменяется уровень рН исследуемого образца при понижении температуры с 40°C до 20°C. Скорости роста сгустка сильно зависят от рН, однако внутри заштрихованной области эти изменения незначительны и не объясняют механизм наблюдаемых зависимостей параметров тромбодинамики от температуры.

Вне границ заштрихованной области наблюдается сильная зависимость скоростей роста сгустка от уровня рН плазмы. Существенные вариации естественного уровня рН плазмы без его стабилизации могут быть причиной отклонений состояния гемостаза от нормального у пациентов при гипотермии.

*Зависимость параметров  
тромбодинамики от температуры  
в гипер- и гипокоагуляционных плазмах*

Как было показано, состояние плазменного гемостаза здоровых добровольцев существенно не изменяется с понижением температуры с 37°C до 24°C. Однако гемостаз пациента, находящегося в состоянии гипотермии, исходно, при нормотермии, может существенно отличаться от нормального. Для изучения влияния гипотермии на плазму, находящуюся в состоянии гипокоагуляции или гиперкоагуляции, исследование тромбодинамики проводили при температурах 20°C, 28°C, 37°C, 43°C на модельных образцах плазмы, приготовленных по следующему протоколу.

В образцы плазм здоровых добровольцев были добавлены: фактор IXa (концентрация в плазме 75 рМ) для получения искусственной гиперкоагуляционной плазмы и гепарин (в конечной концентрации 0,2 МЕ/мл) для получения искусственной гипокоагуляционной плазмы.

Такая модель гиперкоагуляции была выбрана из-за сходства получаемых при 37°C снимков сгустка со снимками, получаемыми при исследовании естественных гиперкоагуляционных состояний (множественная миелома) (рис. 3А,Б).

Гипокоагуляционная модель была выбрана так, чтобы состояние искусственно приготовленной плазмы соответствовало состоянию гемостаза пациента, находящегося на антикоагулянтной терапии (гепарин в дозе 2000 МЕ/ч), (рис. 3В, Г).

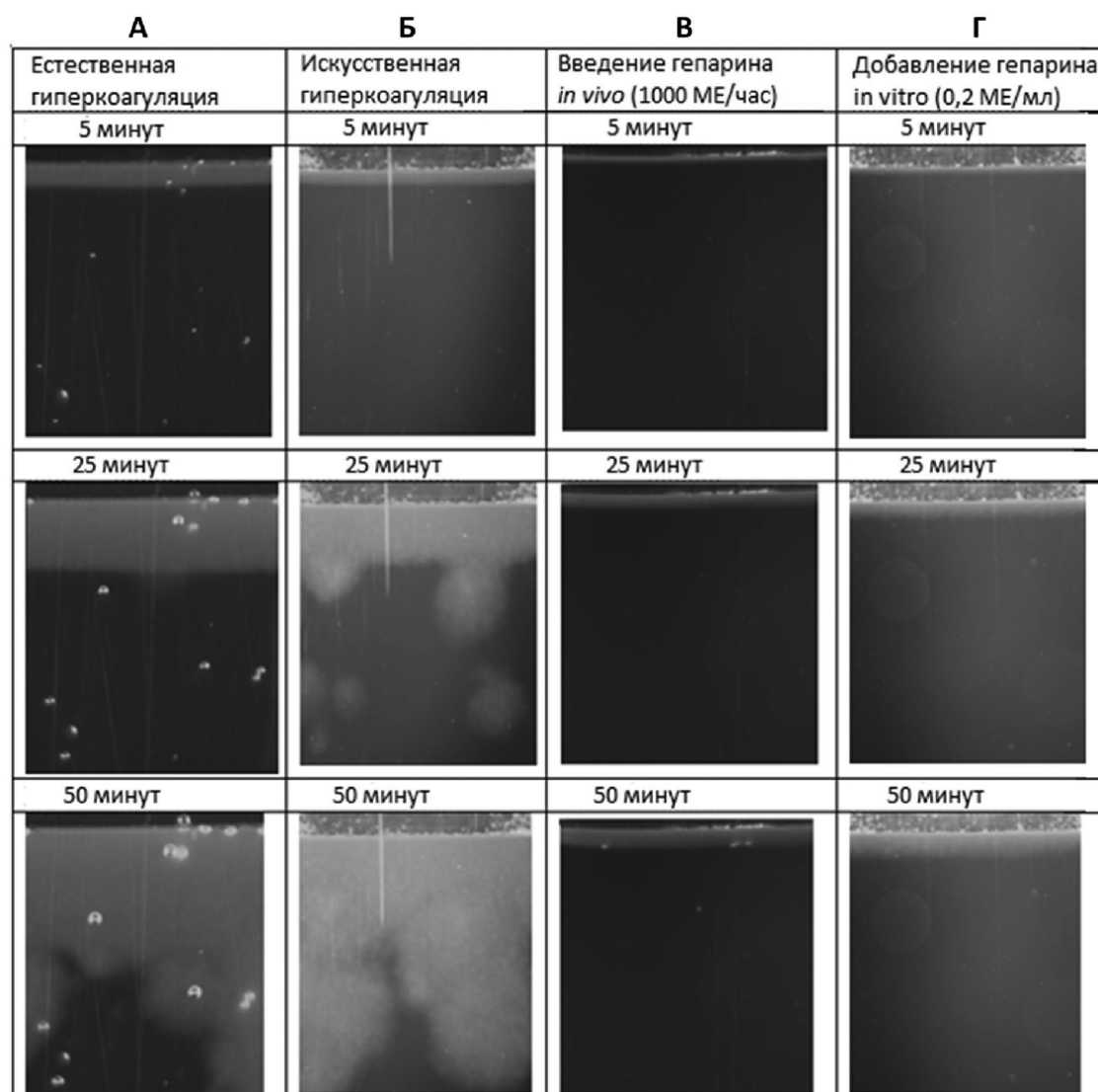
На рисунке 4 показаны зависимости параметров тромбодинамики от температуры в нормальной и искусственных гипер- и гипокоагуляционных плазмах. В гипокоагуляционной плазме, содержащей гепарин, наблюдается незначительное снижение значений параметров тромбодинамики, однако эти значения достоверно не различаются при температурах 37°C и 28°C ( $p > 0,05$ , парный критерий Стьюдента).

В гиперкоагуляционной плазме, содержащей активированный фактор IX, наблюдалась сильная зависимость параметров тромбодинамики от температуры. Значения скоростей роста сгустка достоверно понижались при уменьшении температуры с 37°C до 28°C ( $p < 0,05$ , парный критерий Стьюдента). При этом стационарная скорость роста сгустка в плазме, содержащей фактор IXa, зависела от температуры так же сильно, как и начальная (обе скорости падали в 1,2 раза при понижении температуры с 37°C до 28°C), что может объясняться зависимостью активности фактора IXa от температуры. Однако ни в одном из опытов не наблюдалось драматического снижения функций плазменного гемостаза при понижении температуры до 20°C по сравнению с состоянием свертывающей системы при 37°C.

*Зависимость активностей внутренней  
и внешней теназ от температуры*

Как было показано ранее [19, 20], начальная скорость роста сгустка определяется активностью комплекса внешней теназы, а стационарная скорость роста сгустка – активностью комплекса внутренней теназы, поэтому было принято решение измерить зависимости активностей комплексов внешней и внутренней теназ от температуры.

На рисунке 5 показаны нормированные на единицу зависимости активностей внешней и внутренней теназ от температуры ( $n=3$  в каждом эксперименте). Форма кривой температурной зависимости активности внешней теназы повторяет форму кривой зависимости начальной скорости роста сгустка от температуры: с повышением температуры активность комплекса внешней теназы возрастает, достигает своего максимума при температуре около 37°C и начинает понижаться при дальнейшем росте температуры.



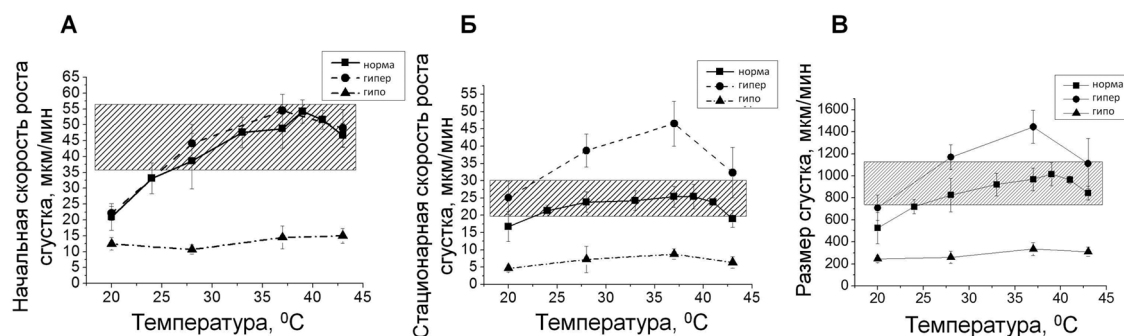
**Рисунок 3.** Образцы снимков, получаемых на 5-й, 25-й и 50-й минутах при исследовании плазм пациентов с различными патологиями, а также искусственных гипер-и гипокоагуляционных плазм. Состояние: **А)** множественная миелома; **Б)** *in vitro* добавление фактора IXa; **В)** *in vivo* добавление гепарина; **Г)** *in vitro* добавление гепарина. На снимках активирующая поверхность расположена сверху. Сгусток формируется сверху вниз параллельно активирующей поверхности.

Форма температурной зависимости активности комплекса внутренней теназы от температуры имеет максимум при температуре около 28°C. При повышении температуры выше 28°C активность белкового комплекса существенно снижается.

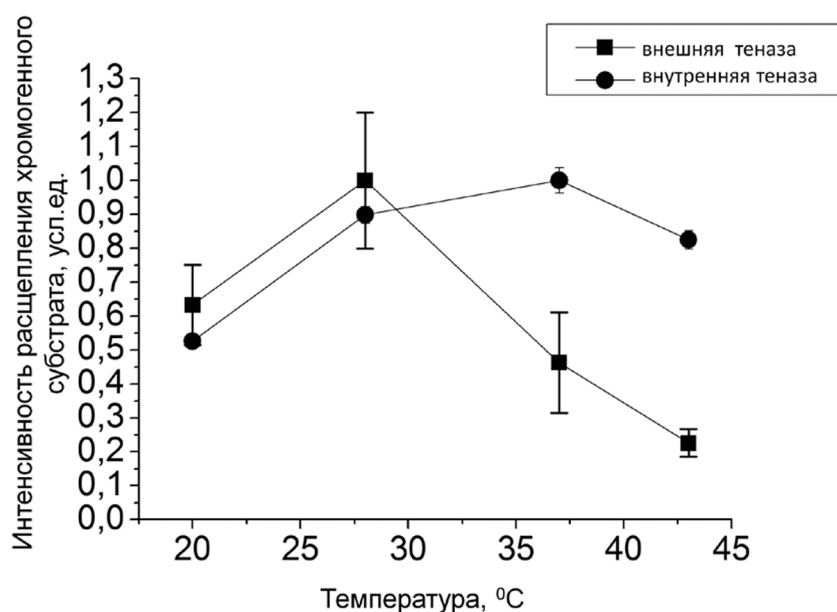
## ОБСУЖДЕНИЕ

Метод тромбодинамики позволяет исследовать процесс пространственного формирования фибринового сгустка и получать информацию о состоянии плазменного гемостаза, которая скрыта в результатах рутинных клоттинговых тестов.

В настоящей работе была произведена оценка степени влияния температуры на состояние плазменного гемостаза здоровых добровольцев *in vitro* с помощью метода тромбодинамики. Было установлено, что фаза инициации роста сгустка зависит от температуры сильнее, чем фаза стационарного роста сгустка вдали от активатора. При этом ни один из параметров тромбодинамики не показал статистически достоверного различия при температурах 37°C и 33°C ( $p < 0,05$ , непарный критерий Стьюдента). Стационарная скорость роста сгустка достоверно не изменилась и при понижении температуры с 37°C до 28°C ( $p < 0,05$  непарный критерий Стьюдента).



**Рисунок 4.** Зависимости значений параметров тромбодинамики от температуры в искусственной гипер- и гипокоагуляционной плазме. **А.** Зависимость начальных скоростей роста сгустка от температуры. **Б.** Зависимость стационарных скоростей роста сгустка от температуры. **В.** Зависимости размеров сгустка от температуры. На графиках приведены значения средних и стандартные отклонения. N=4. Значения параметров тромбодинамики, полученные на гиперкоагуляционной плазме, обозначены круглыми точками, гипокоагуляционной – треугольными точками, нормальной – квадратными точками. Заштрихованные области указывают на диапазон нормальных значений, полученных при обследовании 45 здоровых добровольцев.



**Рисунок 5.** Зависимость активностей комплексов внешней и внутренней теназы от температуры. Значения активности комплекса внешней теназы обозначены квадратными точками. Значения активности комплекса внутренней теназы обозначены круглыми точками. На графиках приведены значения средних и стандартные отклонения. N=3.

Как было показано ранее [19, 20], начальная скорость роста сгустка определяется, главным образом, активностью внешней теназы. В настоящей работе мы исследовали температурную зависимость активности внешней теназы (рис. 5).

Форма кривой этой зависимости качественно совпадает с формой кривой температурной зависимости начальной скорости роста сгустка (рис. 1А).

Мы полагаем, что данное сходство подтверждает вывод, сделанный в работах [19, 20], и указывает на то, что в диапазоне температур от 20°C до 43°C величина начальной скорости роста сгустка определяется активностью комплекса тканевого фактора и фактора VIIa.

Стационарная скорость роста сгустка, характеризующая процесс образования фибрина вдали от активатора свертывания,



практически не зависит от температуры в диапазоне 28°C-37°C. В работе [19, 20] было показано, что на стационарную скорость роста сгустка оказывает существенное влияние активности комплекса внутренней теназы.

Однако в настоящей работе был сделан вывод о том, что при изменении температуры активность внутренней теназы (рис. 5) ведёт себя качественно иначе, чем величина стационарной скорости (рис. 1А). Активность внутренней теназы падает при повышении температуры с 28°C до 37°C в 2 раза при практически неизменной стационарной скорости роста сгустка. Вероятно, при росте температуры с 28°C до 37°C на стационарную скорость влияет не только активность внутренней теназы, но и повышающаяся активность отдельных факторов.

При повышенных температурах (более 39°C) наблюдается снижение значений всех параметров тромбодинамики, а также активностей внешней и внутренней теназ, что, видимо, связано с денатурацией активных факторов.

В модельных гипер- и гипо-коагуляционных плазмах при понижении температуры с 37°C до 20°C также не возникает никаких драматических изменений в состоянии системы гемостаза по сравнению с состоянием при нормотермии.

Вероятно, механизмы развития коагулопатий у пациентов со спонтанной гипотермией находятся вне системы плазменного гемостаза. Подобные предположения неоднократно высказывались в более ранних исследованиях [9].

Метод тромбодинамики позволил выдвинуть дополнительные аргументы в пользу того, что само понижение температуры не приводит к существенному изменению общего состояния плазменной системы гемостаза, и что, наиболее вероятно, основные причины возникновения кровотечения у пациентов с травмами в состоянии гипотермии лежат за пределами плазменного каскада свертывания.

Исследование было поддержано грантами от ООО "ГемаКор", а также частично поддержано грантами РФФИ 10-01-91055, 11-04-00303, 11-04-12080, 12-04-00652, 12-04-00438, 12-04-31788, 12-04-32246 и грантами Президиума РАН "Фундаментальные науки — медицине", "Интегративная физиология", "Молекулярные механизмы физиологических функций".

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. (2008) Клиникогематологии, **1**(1), 50-62.
2. Luna G.K., Maier R.V., Pavlin E.G. et al. (1987) J. Trauma, **27**(9), 1014-1018.
3. Thorsen K., Ringdal K.G., Strand K., Soreide E., Hagemo J., Soreide K. (2011) Br. J. Surg., **98**, 894-907.
4. Rohrer M.J., Natale A.M. (1992) Crit. Care Med, **20**(10), 1402-1405.
5. Kheirbek T., Kochanek A.R., Alam H.B. (2009) Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med., **17**, 65.
6. Martini W.Z. (2009) Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med., **17**, 2.
7. Frith D., Cohen M.J., Brohi K. (2011) Thromb. Res., **129**(5), 551-556.
8. Wolberg A.S., Meng Z.H., Monroe III D.M., Hoffman M. (2002) J. Trauma, **56**(6), 1221-1228.
9. Kirkpatrick A.W., Chun R., Brown R., Simons R.K. (1999) Can. J. Surg., **42**, 333-343.
10. Ovanesov M.V., Krasotkina J.V., Ul'yanova L.I., Abushinova K.V., Plyushch O.P., Domogatskii S.P. et al (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1572**(1), 45-57.
11. Ovanesov M.V., Lopatina E.G., Saenko E.L., Ananyeva N.M., Ul'yanova L.I., Plyushch O.P. et al. (2003) J. Thromb. Haemost., **89**, 235-242.
12. Negrier C., Dargaud Y., Bordet J.C. (2006) Haemophilia, **12** Suppl. 6, 48-52; discussion 52-53.
13. Ovanesov M.V., Ananyeva N.M., Pantelev M.A., Ataullakhanov F.I., Saenko E.L. (2005) J. Thromb. Haemost., **3**, 321-331.
14. Pantelev M.A., Ovanesov M.V., Kireev D.A., Shibeko A.M., Sinauridze E.I., Ananyeva N.M. et al. (2006) Biophys. J., **90**, 1489-1500.
15. Ovanesov M.V., Pantelev M.A., Sinauridze E.I., Kireev D.A., Plyushch O.P., Kopylov K.G. et al. (2008) Blood Coagul. Fibrinolysis, **19**, 743-755.
16. Hojima Y., Pierce J.V., Pisano J.J. (1980) Thromb. Res., **20**, 149-162.
17. Soshitova N.P., Karamzin S.S., Balandina A.N., Fadeeva O.A., Kretchetova A.V., Galstian G.M., Pantelev M.A., Ataullakhanov F.I. (2012) Blood Coagul. Fibrinolysis, **23**(6), 498-507.
18. Fadeeva O.A., Pantelev M.A., Karamzin S.S., Balandina A.N., Smirnov I.V., Ataullakhanov F.I. (2010) Biochemistry (Moscow), **75**, 734-743.
19. Balandina A.N., Shibeko A.M., Kireev D.A., Novikova A.A., Shmirev I.I., Pantelev M.A., Ataullakhanov F.I. (2011) Biophys. J., **101**(8), 1816-1824.
20. Parunov L.A., Fadeeva O.A., Balandina A.N., Soshitova N.P., Kopylov K.G., Kumskova M.A., Gilbert J.C., Schaub R.G., McGinness K.E., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A. (2011) J. Thromb. Haemost., **9**(9), 1825-1834.

Поступила: 29.11.12.

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON SPATIAL FIBRIN CLOT FORMATION  
PROCESS IN THROMBODYNAMICS

*I.A. Shcherbina<sup>1,3</sup>, E.N. Lipets<sup>1</sup>, A.A. Abaeva<sup>1</sup>, A.N. Balandina<sup>1,4</sup>, F.I. Ataullakhanov<sup>1,2,3,4,5</sup>*

<sup>1</sup>Federal Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,  
ul. Samory Mashela, 1, Moscow, 117198 Russia; fax: +7 (495)-664-70-78;

e-mail: info@fccho-moscow.ru

<sup>2</sup>HemaCore LLC, Moscow, Russia

<sup>3</sup>National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, Russia

<sup>5</sup>Department of Physics, Moscow State University, Moscow, Russia

In this study we have investigated the process of spatial fibrin clot formation in non-steered platelet-free plasma at the temperatures from 20°C to 43°C using thrombodynamics – the novel *in vitro* hemostasis assay, which imitates the process of hemostatic clot growth *in vivo*. During data processing the following parameters were calculated: initial ( $V_i$ ) and stationary ( $V_{st}$ ) rates of clot growth which characterize initiation and propagation phases of clotting process, and clot size on the 30<sup>th</sup> minute.

The temperature dependence of extrinsic and intrinsic tenase activities, which determine values of the initial and stationary clot growth rates, respectively, have been also measured.

It was established that the temperature lowering from 37°C to 24°C extends mainly on the initiation phase of clot growth, while the stationary rate of clot growth changes insignificantly. Meanwhile none of the thrombodynamics parameters shows the dramatic change of plasma coagulation system condition at the temperature of 24°C (acute hypothermia). Using the thrombodynamics assay an assumption, that the temperature lowering does not change the state of plasma hemostasis system significantly has been confirmed.

**Key words:** thrombodynamics, hypothermia, spatial clot growth rate, hemorrhage.