

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ТРАНЕКСАМОВОЙ КИСЛОТЫ, ФАКТОРА XIII И КОНЦЕНТРАТА ФИБРИНОГЕНА НА ФОРМИРОВАНИЕ И ЛИЗИС КРОВЯНОГО СГУСТКА ПРИ ИЗБЫТОЧНОМ ФИБРИНОЛИЗЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ ТКАНЕВЫМ И УРОКИНАЗНЫМ АКТИВАТОРОМ ПЛАЗМИНОГЕНА

Effects of tranexamic acid, factor XIII, and fibrinogen on clot formation and lysis in the model of hyperfibrinolysis induced by tissue- vs urokinase-type plasminogen activator

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

Budnik I. A.¹, Morozova O. L.¹, Tsymbal A. A.¹, Shenkman B.², Einav Yu.³

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

¹ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

² Медицинский центр им. Х. Шибы, Тель-ха-Шомер, Израиль

² Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, Israel

³ Холонский технологический институт, Холон, Израиль

³ Holon Institute of Technology, Holon, Israel

Цель исследования. Сравнить влияние транексамовой кислоты (ТКК), фактора XIII (FXIII) и концентрата фибриногена на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях гиперфибринолиза, индуцированного с помощью тканевого (tPA) или урокиназного (uPA) активатора плазминогена *in vitro*.

Материалы и методы. В образцы цитратной крови, полученной от 28 взрослых здоровых добровольцев, добавляли 10 мкг/мл ТКК, 2 МЕ/мл концентрата FXIII или 3 мг/мл концентрата фибриногена. Фибринолиз индуцировали добавлением к крови активатора плазминогена (tPA или uPA) в полумаксимальных эффективных концентрациях (90 и 33 МЕ/мл соответственно). Свертывание крови индуцировали рекальцификацией и добавлением препарата тканевого фактора. Формирование и лизис сгустка изучали методом ротационной тромбоэластометрии.

Результаты. Добавление к крови ТКК вызывало увеличение плотности сгустка в присутствии tPA и оказывало выраженный антифибринолитический эффект вне зависимости от вида действующего активатора плазминогена. Добавление FXIII в условиях как tPA-, так и

Aim of the study. To compare the effects of tranexamic acid (TXA), factor XIII concentrate (FXIII) and fibrinogen concentrate on clot formation and fibrinolytic resistance in the *in vitro* model of hyperfibrinolysis induced by tissue- (tPA) vs urokinase-type (uPA) plasminogen activators.

Materials and methods. Citrated whole blood from 28 adult healthy volunteers was supplemented with 10 µg/mL TXA, 2 IU/mL FXIII, or 3 mg/mL fibrinogen concentrate. Hyperfibrinolysis was induced by spiking the blood with tPA or uPA at their half-maximal effective concentrations (90 and 33 IU/mL, respectively). Clotting was induced by recalcification and addition of tissue factor and monitored using rotation thromboelastometry.

Results. The use of TXA increased maximal clot firmness in the presence of tPA and markedly inhibited clot lysis in the presence of any of the plasminogen activators. Supplementation of blood with FXIII significantly increased clot firmness and improved fibrinolytic resistance in the presence of either tPA or uPA. Supplementation with fibrinogen concentrate elicited a strikingly different effect on clot formation and lysis depending on the type of plasminogen activator. In the presence of tPA, fibrinogen

uPA-индуцированного гиперфибринолиза способствовало увеличению плотности сгустка и повышению его устойчивости к лизису. Добавление концентрата фибриногена в присутствии tPA приводило к повышению плотности и фибринолитической устойчивости сгустка. В отличие от этого, в присутствии uPA добавление концентрата фибриногена вызывало противоположный — профибринолитический — эффект, который выражался в снижении плотности сгустка и увеличении скорости его лизиса. Аналогичный эффект фибриногена обнаруживался в обогащенной тромбоцитами плазме и плазме без клеточных микрочастиц.

Заключение. Эффект от применения гемостатиков в условиях гиперфибринолиза существенно зависит от вида действующего активатора плазминогена. При выборе метода коррекции гемостатического потенциала крови необходим анализ механизмов индукции гиперфибринолиза.

Ключевые слова: гиперфибринолиз; гемостатики; транексамовая кислота; фактор XIII; концентрат фибриногена; тканевой активатор плазминогена; урокиназный активатор плазминогена

Для цитирования: Будник И. А., Морозова О. Л., Цымбал А. А., Шенкман Б., Эйнав Ю. *Анализ влияния транексамовой кислоты, фактора XIII и концентрата фибриногена на формирование и лизис кровяного сгустка при избыточном фибринолизе, индуцированном тканевым и урокиназным активатором плазминогена.* Гематология и трансфузиология 2018; 63(1):55–64

doi: <http://dx.doi.org/10.25837/HAT.2018.86..1..005>

Для корреспонденции: Будник Иван Александрович, доцент кафедры патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения России (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Россия. Электронная почта: budnik.ivan@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.11.17

Принята к печати 16.05.18

concentrate significantly increased clot firmness and attenuated clot lysis. In contrast, in the presence of uPA, the use of fibrinogen markedly reduced clot firmness and promoted clot lysis. Similar effects of fibrinogen concentrate were observed in platelet-rich and microparticles-free plasma.

Conclusion. In hyperfibrinolysis, effect of the hemostatic drugs significantly depends on the type of plasminogen activator used. Therefore, mechanisms of hyperfibrinolysis should be taken into consideration while administering hemostatic drugs.

Keywords: fibrinolysis; hemostatics; tranexamic acid; factor XIII; fibrinogen; tissue plasminogen activator; urokinase-type plasminogen activator

For citation: Budnik I. A., Morozova O. L., Tsybmal A. A., Shenkman B., Einav Yu. *Effects of tranexamic acid, factor XIII, and fibrinogen on clot formation and lysis in the model of hyperfibrinolysis induced by tissue- vs urokinase-type plasminogen activator.* Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya) 2018; 63(1):55–64 (in Russian)

doi: <http://dx.doi.org/10.25837/HAT.2018.86..1..005>

For correspondence: Budnik Ivan, MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathophysiology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119048, Russian Federation
E-mail: budnik.ivan@gmail.com

Information about authors:

Budnik I. A., <http://orcid.org/0000-0002-6652-2667>. Scopus Author ID: 24167930800. ResearcherID: C-3254-2014;

Morozova O. L., <http://orcid.org/0000-0003-2453-1319>. Scopus Author ID: 55805379800. ResearcherID: R-9125-2017;

Tsybmal A. A., <http://orcid.org/0000-0002-2928-1067>;

Shenkman B., <http://orcid.org/0000-0002-2888-8502>. Scopus Author ID: 7005545029;

Einav Y., <http://orcid.org/0000-0001-8222-7695>. Scopus Author ID: 6602990973.

Financial disclosure. The study had no sponsorship.

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

Received 03 Nov 2017

Accepted 16 May 2018

Введение

Гиперфибринолиз — это типовая форма патологии системы гемостаза, характеризующаяся избыточной активностью плазмина, ускоренным лизисом фибрина и/или фибриногена и, как следствие, склонностью к кровотечениям. Данное состояние осложняет течение различных заболеваний и может служить независимой предпосылкой летального исхода [1]. Одной из частых причин гиперфибринолиза является значительное увеличение концентрации тканевого (tPA) или урокиназного (uPA) активаторов плазминогена в плазме крови. Повышение уров-

ня tPA лежит в основе геморрагического синдрома при травматической коагулопатии [2], операциях с применением аппарата искусственного кровообращения [3], терминальной стадии цирроза печени, операциях по трансплантации печени [4], остром промиелоцитарном лейкозе [5] и др. В свою очередь повышение уровня uPA лежит в основе гиперфибринолиза при амилоидозе [6], метастатическом раке предстательной железы [7], хронической почечной недостаточности [8] и др. Высокий риск больших кровотечений в условиях гиперфибринолиза требу-

ет тщательного мониторинга и своевременной коррекции гемостатического потенциала крови у пациентов с данной патологией.

Несмотря на то что tPA и uPA выполняют одну и ту же каталитическую функцию (превращение плазминогена в плазмин), молекулярная структура и механизм действия этих активаторов существенно различаются. Благодаря наличию пальцевидного домена и лизинсвязывающего сайта во 2-м крингл-домене, tPA может связываться с фибрином. Это связывание приводит к многократному увеличению ферментативной активности tPA и активации связанного с фибрином плазминогена, что определяет высокую фибринселективность данного активатора. Напротив, в структуре uPA отсутствуют домены, способные связываться с фибрином. Тем не менее uPA является активатором как свободного (циркулирующего), так и связанного с фибрином плазминогена, что свидетельствует о его низкой фибринселективности [1]. Более того, показано, что для uPA, в отличие от tPA, характерна выраженная фибринолитическая активность [9]. Эти и другие различия в действии tPA и uPA могут оказывать существенное влияние на эффективность применения гемостатических препаратов в условиях гиперфибринолиза.

Традиционно для коррекции гемостатического потенциала крови в условиях гиперфибринолиза используются антифибринолитики — синтетические аналоги лизина и прямые ингибиторы плазмина [10]. В последнее время интерес вызывает возможность использования с этой целью различных концентратов факторов свертывания [11]. Несмотря на широкое применение в клинической практике как антифибринолитиков, так и концентратов факторов свертывания, до настоящего времени не проводилось сравнительного анализа эффектов от применения этих препаратов в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза. В данной работе, используя модель гиперфибринолиза *in vitro*, с помощью метода ротационной тромбоэластометрии мы впервые показали, что транексамовая кислота (ТКК) и фактор XIII (FXIII) оказывают антифибринолитический эффект как при tPA-, так и при uPA-индуцированном гиперфибринолизе, тогда как эффект концентрата фибриногена существенно зависит от вида действующего активатора плазминогена.

Соответствие исследования этическим требованиям

Данное исследование было одобрено этическим комитетом медицинского центра им. Х. Шибы (Тель-хашомер, Израиль) и проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации. Перед включением в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

Материалы и методы

Взятие крови

В исследовании приняли участие 28 здоровых добровольцев, не имевших в анамнезе нарушений в системе гемостаза и не принимавших никаких лекарственных препаратов в течение 14 дней перед включением в исследование. Взятие крови осуществляли натошак 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 антикоагулянта и крови составляло 1:9. Перед началом манипуляций образцы крови выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре.

Приготовление обогащенной тромбоцитами плазмы и плазмы без клеточных микрочастиц

Для приготовления обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) образцы крови центрифугировали при 134 g в течение 12 мин, после чего верхние две трети объема супернатанта переносили в отдельную пробирку в качестве ОТП. Для приготовления плазмы без клеточных микрочастиц ОТП центрифугировали при 1600 g в течение 15 мин, после чего супернатант переносили в отдельную пробирку и дополнительно центрифугировали при 40 000 g в течение 60 мин. Полученный в итоге супернатант переносили в отдельную пробирку в качестве плазмы без клеточных микрочастиц.

Ротационная тромбоэластометрия

Формирование кровяного сгустка исследовали с помощью ротационного тромбоэластометра ROTEM («Tem Innovations GmbH», Germany). Для теста NATEM в кювету тромбоэластометра помещали 20 мкл реагента star-tem (CaCl₂, конечная концентрация 17 мМ) и 20 мкл фосфатного буфера (PBS; pH 7,4), для теста EXTEM — 20 мкл реагента star-tem и 20 мкл разведенного 1:100 реагента ex-tem (содержит recombinant тканевого фактора и фосфолипиды), для теста INTEM — 20 мкл реагента star-tem и 20 мкл реагента in-tem (содержит фосфолипиды частичного тромбопластина из головного мозга кролика и эллаговую кислоту). Далее в кювету помещали 300 мкл крови или плазмы и тщательно перемешивали с реагентами путем пипетирования. Формирование и лизис кровяного сгустка регистрировали при температуре 37 °C в течение 60 мин в виде кривой — тэмограммы. Оценивали следующие параметры тэмограммы: максимальная плотность сгустка (MCF, мм; максимальная амплитуда тэмограммы), время начала лизиса (LOT, мин; время от момента начала формирования сгустка до снижения амплитуды тэмограммы на 15% от MCF), индекс лизиса на 30-й минуте (LI30, %; амплитуда тэмограммы через

30 мин от момента начала формирования сгустка, выраженная в процентах от MCF). Если не указано иное, то представлены результаты теста EXTEM. Все эксперименты были выполнены в стандартных условиях одним исследователем.

Модель гиперфибринолиза

Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA (препарат Актилизе; «Boehringer Ingelheim», Германия) или 33 МЕ/мл uPA (препарат Actosolv; «Eumedica Pharmaceuticals», Бельгия), что соответствовало предварительно определенным полумаксимальным эффективным концентрациям (EC_{50}) [12]. Чтобы минимизировать преждевременный фибринолиз, после добавления активатора плазминогена образец крови перемешивали путем пипетирования, незамедлительно помещали в кюветы тромбоэластометра, содержащие индукторы свертывания, и начинали запись тэмограммы. О наличии гиперфибринолиза свидетельствовало снижение максимальной амплитуды тэмограммы на 15% и более от MCF [13]. Чтобы оценить возможности коррекции формирования кровяного сгустка в условиях гиперфибринолиза, в образцы крови перед применением активатора плазминогена добавляли один из следующих препаратов: 10 мкг/мл ТКК (препарат Суклокарпон, «Pfizer», Бельгия), 2 МЕ/мл концентрата FXIII (препарат Fibrogammin P, «CSL Behring», Германия), 3 мг/мл концентрата фибриногена (препарат Наемосомплеттан Р, «CSL Behring», Германия) или 3 мг/мл фибриногена (F4883, «Sigma-Aldrich Company Ltd.», США), растворенного в PBS. В контрольные образцы крови вместо указанных гемостатических препаратов добавляли соответствующее количество PBS.

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с помощью программы Statistica 10 (Statsoft, США). Результаты исследования представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее значение для выборки, SD — стандартное отклонение. Для каждого анализируемого показателя тэмограммы сравнивали значения средних в цельной крови, при добавлении активатора плазминогена, а также при добавлении активатора плазминогена в сочетании с вышеуказанными гемостатическими препаратами (всего 12 сравнений). Сравнения проводили с использованием двухстороннего t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Во избежание эффекта множественных сравнений значения p были откорректированы по методу Шидака. Различия средних считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Формирование и лизис кровяного сгустка в присутствии tPA и uPA

В образцах цельной крови MCF составила $60 \pm 2,2$ мм, спонтанный лизис кровяного сгустка не наблюдался. Добавление к крови 90 МЕ/мл tPA приводило к снижению MCF до $42,2 \pm 5,9$ мм ($p < 0,001$) и индуцировало лизис сгустка. LOT при этом составило $23,7 \pm 4,1$ мин, LI30 был равен $18,8 \pm 13,9\%$. При добавлении к крови 33 МЕ/мл uPA значения MCF и LOT статистически значимо не отличались от значений в присутствии tPA, однако LI30 был существенно больше, чем в образцах с tPA, и составил $64,1 \pm 8,1\%$ ($p < 0,001$). Иными словами, в использованных концентрациях tPA и uPA в одинаковой мере снижали максимальную плотность кровяного сгустка и через схожие промежутки времени индуцировали его лизис (гиперфибринолиз), хотя

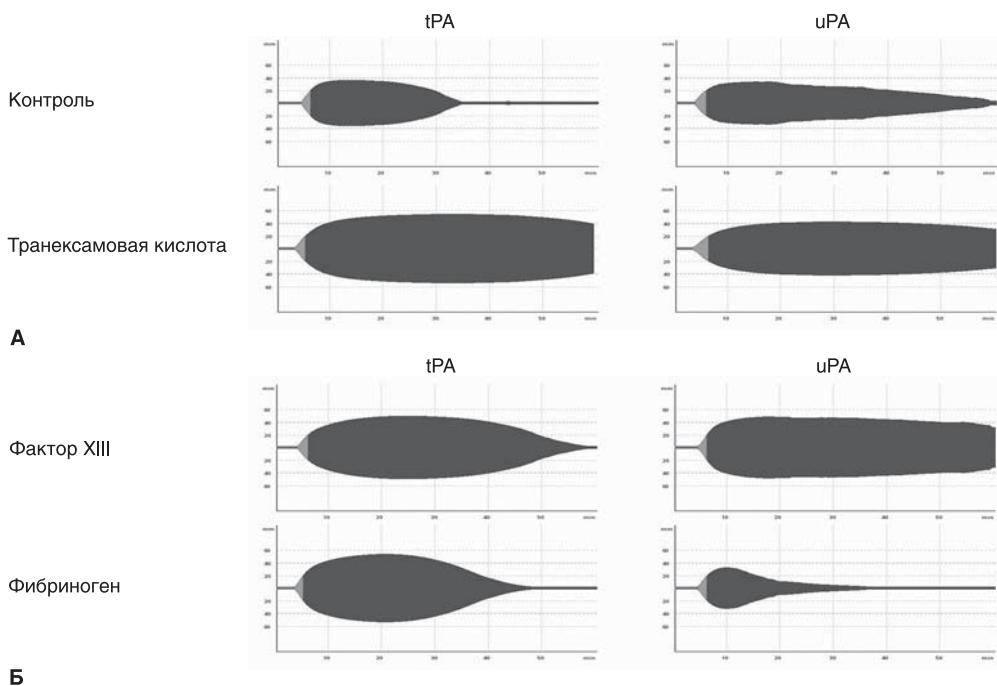


Рисунок 1. Влияние транексамовой кислоты, концентрата фактора XIII и концентрата фибриногена на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях гиперфибринолиза, индуцированного с помощью тканевого (tPA) или урокиназного (uPA) активатора плазминогена. В цельную кровь добавляли 10 мкг/мл транексамовой кислоты, 2 МЕ/мл концентрата фактора XIII или 3 мг/мл концентрата фибриногена. В контрольные образцы добавляли соответствующее количество фосфатного буфера. Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA или 33 МЕ/мл uPA. Формирование и лизис сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Представлены репрезентативные тэмограммы одного из десяти независимых экспериментов.

динамика лизиса сгустка при этом имела определенные различия (рис. 1).

Эффект ТКК в условиях гиперфибринолиза

В условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза добавление к крови 10 мкг/мл ТКК вызывало повышение MCF до $54,9 \pm 6,2$ мм ($p = 0,002$) и значительно ингибировало лизис сгустка, о чем свидетельствовало удлинение LOT до $50,5 \pm 7,7$ мин ($p < 0,001$) и увеличение LI30 до 100% во всех исследованных образцах (см. рис. 1). В условиях uPA-индуцированного гиперфибринолиза после добавления ТКК MCF составила $45,1 \pm 5,9$ мм, однако по сравнению с контролем данное изменение не достигло уровня статистической значимости ($p = 0,084$). LOT при этом увеличивалось до $53,1 \pm 6,5$ мин ($p < 0,001$), LI30 возрастал до $97,2 \pm 3,7\%$ ($p < 0,001$), что существенно не отличалось от значений этих показателей в присутствии tPA (см. табл. 1). Следовательно, добавление к крови ТКК способствовало увеличению плотности сгустка в присутствии tPA и оказывало выраженный антифибринолитический эффект вне зависимости от действующего активатора плазминогена.

Эффект FXIII в условиях гиперфибринолиза

Добавление к крови 2 МЕ/мл FXIII в условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза вызывало повышение MCF до $53,3 \pm 6,6$ мм ($p = 0,042$), удлинение

LOT до $39,4 \pm 5,2$ мин ($p < 0,001$) и увеличение LI30 до $92,4 \pm 5,7\%$ ($p < 0,001$). Схожие изменения показателей тэмограммы наблюдались и в присутствии uPA: после добавления концентрата FXIII MCF увеличивалась до $49,5 \pm 5,5$ мм ($p = 0,002$), LOT — до $43,5 \pm 6,2$ мин ($p < 0,001$) и LI30 — до $96,3 \pm 5,3\%$ ($p < 0,001$) (см. рис. 1). Таким образом, добавление к крови концентрата FXIII в условиях как tPA-, так и uPA-индуцированного гиперфибринолиза способствовало увеличению плотности сгустка и повышению его устойчивости к лизису.

Эффект концентрата фибриногена в условиях гиперфибринолиза

В условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза добавление к крови 3 мг/мл концентрата фибриногена (препарат Наемосcompletтан Р) приводило к выраженному увеличению MCF, которая составила $57,2 \pm 4,7$ мм ($p < 0,001$), незначительному удлинению LOT (до $29,4 \pm 4,5$ мин; $p = 0,096$) и существенному увеличению LI30, составившего $65,2 \pm 9,4\%$ ($p < 0,001$), что в целом свидетельствовало о повышении плотности и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка. Принципиально иной эффект от применения данного препарата наблюдался в присутствии uPA. В этих условиях добавление к крови концентрата фибриногена не вызывало заметного изменения MCF, укорачивало LOT до $11 \pm 2,5$ мин ($p = 0,017$) и значительно умень-

Таблица 1. Влияние транексамовой кислоты, FXIII и фибриногена на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза

Показатель	tPA		uPA		tPA vs uPA
	M ± SD	p ¹	M ± SD	p ¹	p
MCF:					
Контроль	$42,2 \pm 5,9$	–	$36,5 \pm 6,8$	–	0,528
ТКК	$54,9 \pm 6,2$	0,002	$45,1 \pm 5,9$	0,084	0,024
FXIII	$53,3 \pm 6,6$	0,042	$49,5 \pm 5,5$	0,002	0,906
Фибриноген	$57,2 \pm 4,7$	0,001	$34,1 \pm 4,3$	0,995	< 0,001
LOT:					
Контроль	$23,7 \pm 4,1$	–	$18,5 \pm 5,8$	–	0,328
ТКК	$50,5 \pm 7,7$	< 0,001	$53,1 \pm 6,5$	< 0,001	0,999
FXIII	$39,4 \pm 5,2$	< 0,001	$43,5 \pm 6,2$	< 0,001	0,803
Фибриноген	$29,4 \pm 4,5$	0,096	$11,0 \pm 2,5$	0,017	< 0,001
LI30:					
Контроль	$18,8 \pm 13,9$	–	$64,1 \pm 8,1$	–	< 0,001
ТКК	100 ± 0	< 0,001	$97,2 \pm 3,7$	< 0,001	0,287
FXIII	$92,4 \pm 5,7$	< 0,001	$96,3 \pm 5,3$	< 0,001	0,813
Фибриноген	$65,2 \pm 9,4$	< 0,001	$8,0 \pm 5,5$	< 0,001	< 0,001

¹ Значения p при сравнении с соответствующим контролем.

LI30 — индекс лизиса на 30-й минуте; LOT — время начала лизиса; M — выборочное среднее; MCF — максимальная плотность сгустка;

SD — стандартное отклонение; tPA — тканевой активатор плазминогена; uPA — урокиназный активатор плазминогена. Объем каждой выборки — 10 наблюдений. Сравнения средних выполнены с помощью t-критерия Стьюдента. Значения p откорректированы по методу Шидака.

шало L130 — до $8 \pm 5,5\%$ ($p < 0,001$) (см. рис. 1). Иными словами, в присутствии uPA добавление концентрата фибриногена вызвало противоположный — профибринолитический — эффект.

С целью верификации обнаруженного явления мы повторили эксперимент с добавлением к крови того же концентрата фибриногена, используя вместо теста EXTEM тесты INTEM и NATEM (рис. 2). В обоих тестах в присутствии tPA концентрат фибриногена повышал плотность сгустка и его устойчивость к фибринолизу и, напротив, в присутствии uPA оказывал профибри-

нолитическое действие. Аналогичные результаты были получены также в тесте EXTEM при добавлении к крови раствора фибриногена от другого производителя (F4883, «Sigma-Aldrich») (результаты не представлены).

Для дальнейшего исследования эффектов концентрата фибриногена (препарат Haemocompletan P) в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза мы изучили влияние препарата на показатели тэмограммы в ОТП и плазме без клеточных микрочастиц. Как и в цельной крови, в присутствии tPA добавление концентрата фибриногена к ОТП приводило

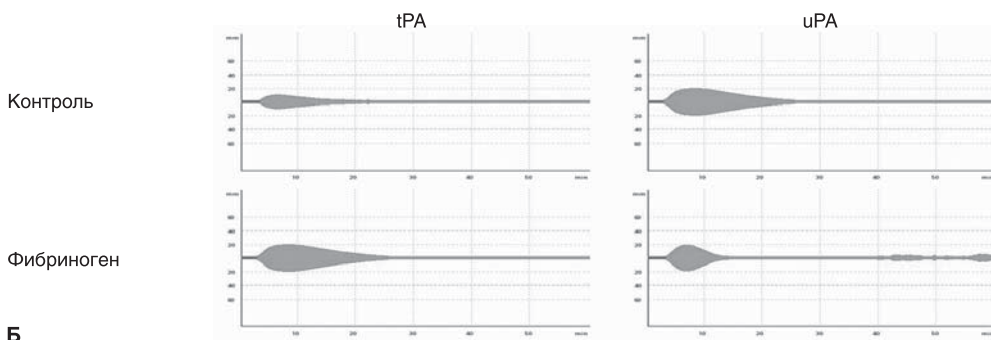
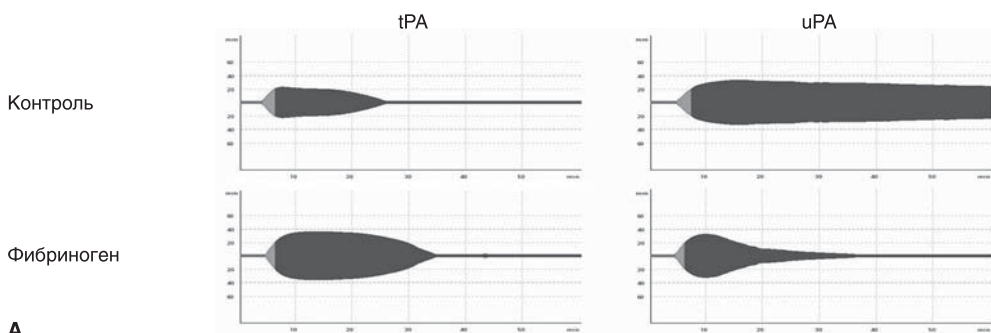
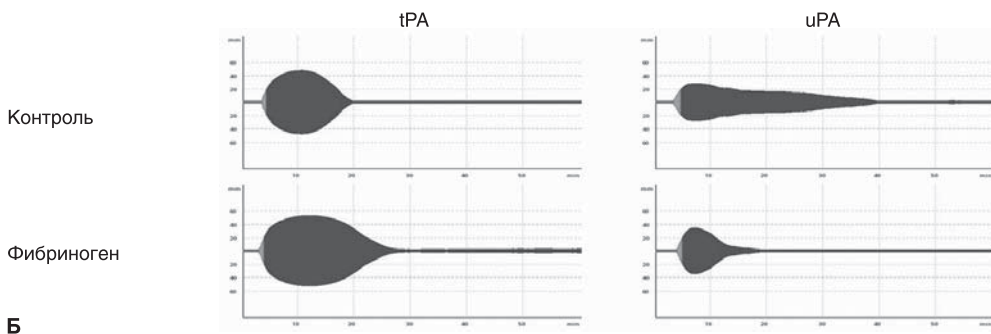
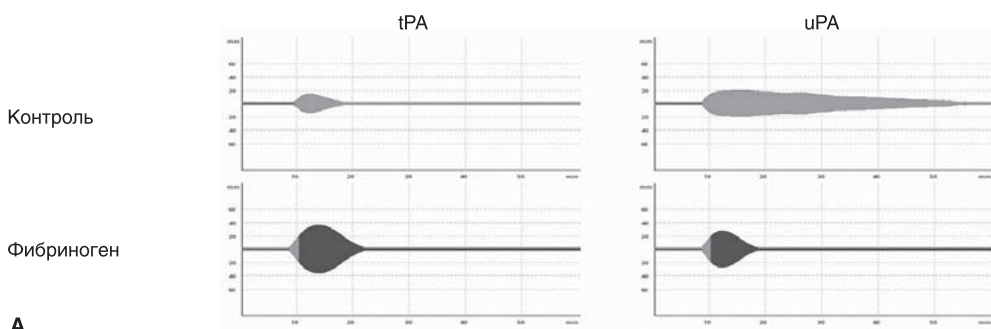


Рисунок 2. Влияние концентрата фибриногена на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях гиперфибринолиза, индуцированного с помощью тканевого (tPA) или урокиназного (uPA) активатора плазминогена. В цельную кровь добавляли 3 мг/мл концентрата фибриногена. В контрольные образцы добавляли соответствующее количество фосфатного буфера. Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA или 33 МЕ/мл uPA. Формирование и лизис сгустка изучали методом ROTEM. **А.** Тест NATEM. **Б.** Тест INTEM. Представлены репрезентативные тэмограммы одного из пяти независимых экспериментов.

Рисунок 3. Влияние концентрата фибриногена на формирование и лизис сгустка плазмы в условиях гиперфибринолиза, индуцированного с помощью тканевого (tPA) или урокиназного (uPA) активатора плазминогена. В обогащенную тромбоцитами плазму (**А**) или плазму без клеточных микрочастиц (**Б**) добавляли 3 мг/мл концентрата фибриногена. В контрольные образцы добавляли соответствующее количество фосфатного буфера. Фибринолиз индуцировали добавлением 90 МЕ/мл tPA или 33 МЕ/мл uPA. Формирование и лизис сгустка изучали методом ROTEM (тест EXTEM). Представлены репрезентативные тэмограммы одного из пяти независимых экспериментов.

к увеличению MCF и удлинению LOT по сравнению с контролем, тогда как в присутствии uPA препарат фибриногена не оказывал заметного влияния на величину MCF, но значительно укорачивал LOT, т. е. оказывал профибринолитическое действие (рис. 3, А). Аналогичные результаты были получены при добавлении концентрата фибриногена к плазме без клеточных микрочастиц в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза (рис. 3, Б).

Обсуждение

Данное исследование посвящено изучению возможностей фармакологической коррекции формирования и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка в условиях гиперфибринолиза. Для решения поставленной задачи мы использовали модель гиперфибринолиза *in vitro*, в которой фибринолиз индуцировали добавлением в цельную кровь tPA или uPA, а формирование и лизис кровяного сгустка изучали методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM). В отличие от традиционных методов исследования системы гемостаза, ROTEM учитывает вклад не только плазменных, но и всех клеточных компонентов системы гемостаза в их взаимосвязи и позволяет дать глобальную оценку гемостатического потенциала крови пациента [14, 15]. Данный метод широко используется в клинической практике для диагностики гиперфибринолиза и оценки эффективности проводимой гемостатической терапии [13].

Для корректного сравнения эффектов от применения гемостатических препаратов в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза активаторы плазминогена использовали в их полумаксимальных эффективных концентрациях (EC_{50}), определенных в цельной крови методом ROTEM. Примечательно, что в этих условиях значение EC_{50} для uPA в три раза ниже такового для tPA (33 и 90 МЕ/мл соответственно). Это указывает на то, что активность uPA в крови выше, чем в искусственной среде, используемой производителями активаторов плазминогена для определения их активности. Возможным объяснением более выраженной профибринолитической активности uPA в цельной крови является прямое протеолитическое действие uPA в отношении фибриногена [9], а также усиление активности введенного в кровь uPA при его связывании с эндогенным tPA, присутствующим в плазме [12]. Необходимо также отметить, что добавление к крови как tPA, так и uPA не только индуцировало лизис кровяного сгустка, но и вызывало снижение его максимальной плотности (амплитуды тэмограммы). По-видимому, данный эффект обусловлен тем, что при активации свертывания крови в присутствии активатора плазминогена формирование кровяного сгустка происходит на фоне нарастающего образования плазмينا, в результате чего лизис сгустка начинается еще до достижения им максимальной плотности.

ТКК относится к группе синтетических аналогов лизина и представляет собой более стабильную по химической структуре версию ϵ -аминокапроновой кислоты (АКК). Препараты данной группы конкурируют с фибрином за лизинсвязывающие сайты крингл-доменов плазминогена/плазмينا, образуя с ними обратимую связь. Несмотря на то что оба препарата успешно применяются в клинической практике в качестве антифибринолитиков [16, 17], эффект от их применения существенно зависит от ряда факторов. Например, установлено, что введение ТКК в течение первых 3 ч после тяжелой травмы снижает риск летального исхода, но значительно увеличивает его при более позднем введении [18]. Показано, что в концентрации более 5 мМ АКК замедляет индуцированный плазмином лизис фибрина, но в концентрации 1 мМ ускоряет его, что, по-видимому, объясняется уменьшением связывания плазмينا с С-концевыми остатками лизина фибриновой сети и улучшением его диффузии в толщу сгустка [19]. Имеются также данные о различном влиянии аналогов лизина на скорость активации плазминогена в зависимости от вида действующего активатора. Большинство авторов указывают на уменьшение скорости tPA-индуцированной активации плазминогена и фибринолиза в присутствии ТКК и АКК [20, 21], поскольку связывание плазминогена с аналогами лизина препятствует его связыванию с фибрином и тем самым нарушает образование тройного комплекса с tPA, необходимого для реализации его каталитической функции. Показано также, что АКК может связывать и сам tPA, препятствуя его взаимодействию с фибрином [22].

Напротив, в присутствии uPA аналоги лизина вызывают увеличение скорости активации плазминогена, поскольку при взаимодействии с этими препаратами молекулы плазминогена стабилизируются в «открытой» конформации [21, 23, 24]. Несмотря на это в присутствии аналогов лизина отмечается угнетение uPA-индуцированного лизиса фибрина [21, 23, 25]. И вместе с тем в модели черепно-мозговой травмы на мышцах недавно было показано, что введение ТКК на фоне повышения уровня uPA в цереброспинальной жидкости приводит к увеличению объема внутричерепного кровоизлияния, что указывает на профибринолитическое действие данного активатора плазминогена [26].

Вышеизложенное свидетельствует о необходимости дальнейшего уточнения механизмов действия синтетических аналогов лизина в условиях tPA- и uPA-индуцированного гиперфибринолиза. В данном исследовании мы показали, что добавление к крови ТКК способствует увеличению плотности кровяного сгустка в условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза и оказывает выраженный антифибринолитический эффект в присутствии как tPA, так и uPA, что согласуется с результатами экспериментов *in vitro* [27], а также клиническими наблюдениями [3, 7]. Наиболее вероятным

объяснением обнаруженного нами эффекта является то, что плазмин, образующийся из связанного с ТКК плазминогена, оставаясь связанным с данным препаратом, не может реализовать свое фибринолитическое действие вне зависимости от действующего активатора плазминогена [21, 28]. Поскольку в использованной нами экспериментальной модели формирование кровяного сгустка происходило на фоне образования плазмينا, добавление к крови ТКК и связывание с ней значительной части плазмина приводило не только к отдалению времени начала лизиса, но и к увеличению максимальной плотности кровяного сгустка.

FXIII (протеин-глутамин- γ -глутамилтрансфераза) под влиянием тромбина переходит в активную форму (XIIIa) и катализирует образование изопептидных связей («сшивок») между остатками глутаминовой кислоты и лизина γ -узлов и α C-областей соседних молекул фибрина, что приводит к образованию его олиго- и полимеров. Увеличение концентрации FXIII способствует уменьшению размера пор фибринового сгустка, формированию более тонких нитей фибрина и увеличению плотности фибриновой сети [29]. Кроме того, FXIIIa обеспечивает ковалентное связывание с фибрином ряда антифибринолитических факторов, включая α 2-антиплазмин, ингибитор активатора плазминогена-2, активируемый тромбином ингибитор фибринолиза, компонент C3 комплемента [30]. Дефицит FXIII связан с большей частотой послеоперационных кровотечений. Введение FXIII перед началом операции уменьшает объем периоперационной кровопотери [31].

В то же время сведения о применении данного препарата у пациентов с гиперфибринолизом весьма малочисленны, а данные о его влиянии на формирование и устойчивость сгустка к лизису противоречивы. В ранних работах было показано, что в «чистых» фибринолитических средах FXIII в физиологической концентрации не оказывает существенного влияния на скорость лизиса фибрина [32], но снижает ее при использовании в более высоких концентрациях [33]. Позднее было установлено, что добавление FXIII в цельную кровь также вызывает угнетение tPA-индуцированного гиперфибринолиза [27]. Влияние FXIII на формирование и лизис кровяного сгустка в условиях uPA-индуцированного фибринолиза остается наименее изученным. В данной работе мы показали, что добавление к крови FXIII в условиях как tPA-, так и uPA-индуцированного гиперфибринолиза способствует увеличению плотности кровяного сгустка и повышает его фибринолитическую устойчивость, что выражается в более позднем начале и меньшей скорости лизиса. Полученные результаты свидетельствуют о возможной эффективности концентрата FXIII в качестве гемостатика в условиях гиперфибринолиза независимо от действующего активатора плазминогена.

При больших кровотечениях концентрация фибриногена первой достигает критически низких значений

по сравнению с другими факторами свертывания крови, что во многом определяет прогноз пациента [34]. Концентраты фибриногена успешно используются для экстренной коррекции гемостатического потенциала крови при различных геморрагических состояниях [35]. Увеличение уровня фибриногена в плазме обеспечивает формирование более плотной фибриновой сети, состоящей из более тонких и разветвленных нитей фибрина и отличающейся меньшим размером пор, что в совокупности обеспечивает более высокую фибринолитическую устойчивость сгустка [36]. В данной работе мы показали, что в условиях tPA-индуцированного гиперфибринолиза увеличение концентрации фибриногена обеспечивало повышение плотности и фибринолитической устойчивости кровяного сгустка. Принципиально иной, профибринолитический эффект концентрата фибриногена мы обнаружили при индукции гиперфибринолиза с помощью uPA. Причем данный эффект наблюдался при добавлении к крови фибриногена разных производителей — как препарата Haemocompletan P («CSL Behring»), так и раствора фибриногена («Sigma-Aldrich»). Это свидетельствует о том, что обнаруженный эффект концентрата фибриногена не зависит от способа его приготовления и не связан с наличием в использованных растворах определенных вспомогательных веществ или компонентов плазмы. Данный эффект воспроизводился как в тесте EXTEM, так и в тестах INTEM и NATEM, что указывает на то, что профибринолитическое действие фибриногена не зависит от способа активации системы свертывания крови. Более того, профибринолитический эффект фибриногена, выявленный в цельной крови, воспроизводился также в ОТП и в плазме без клеточных микрочастиц. В целом вышеизложенное свидетельствует о том, что профибринолитический эффект фибриногена в условиях uPA-индуцированного гиперфибринолиза является не лабораторным артефактом, а истинным феноменом, не требующим участия форменных элементов крови для его реализации.

Механизм профибринолитического действия концентрата фибриногена в присутствии uPA требует специального изучения. Возможно, обнаруженный нами феномен связан с выраженной фибринолитической активностью uPA. Показано, что под влиянием данного активатора от молекулы фибриногена отщепляется сначала фибринопептид В, а затем С-концевые участки α - и β -цепей [9]. С одной стороны, это делает фибриноген неподходящим субстратом для тромбина и тем самым замедляет образование фибрина, а с другой, вероятно, приводит к изменению конформации молекул фибриногена и экспонированию скрытых до этого остатков лизина [9, 37]. Мы полагаем, что это влечет за собой связывание плазминогена с экспонированными остатками лизина и его стабилизацию в «открытой» конформации, что в свою очередь приводит

к увеличению скорости его активации под действием uPA. Чем больше фибриногена содержится в крови, тем больше остатков лизина экспонируется в результате uPA-индуцированного фибринолиза и тем больше плазминогена затем активируется под влиянием uPA. Таким образом, увеличение концентрации фибриногена в присутствии uPA, по-видимому, приводит к увеличению образования плазмина и, как следствие, усилению фибринолиза и гиперфибринолизу.

Наше исследование имеет некоторые ограничения. Использованная в работе модель гиперфибринолиза *in vitro* не позволяет оценить влияние эндотелия сосудистой стенки и гемодинамики на формирование и лизис кровяного сгустка, что требует осторожности при экстраполяции полученных данных на клиническую ситуацию. Поскольку гиперфибринолиз индуцировали в крови, полученной от здоровых доноров, данная модель не учитывает модифицирующее действие других факторов, характерных для той формы патологии, с которой связан гиперфибринолиз. Несмотря на то что гемостатические препараты были использованы в конечных концентрациях, близких к тем, которые наблюдаются в крови пациентов при внутривенном введении, эффект от применения этих препаратов во многом зависит от дозы.

Таким образом, с помощью метода ротационной тромбоэластометрии мы показали, что в условиях гиперфибринолиза эффект от применения гемостатических препаратов может существенно различаться в зависимости от вида действующего активатора плазминогена. В случае tPA-индуцированного гиперфибринолиза и ТКК, и концентрат FXIII, и концентрат фибриногена способствуют увеличению плотности кровяного сгустка и оказывают отчетливый антифибринолитический эффект. В случае uPA-индуцированного гиперфибринолиза ТКК и концентрат FXIII вызывают аналогичный эффект, а концентрат фибриногена вызывает противоположный — профибринолитический эффект. Полученные данные указывают на необходимость анализа механизмов индукции гиперфибринолиза при выборе средств для коррекции гемостатического потенциала крови у пациентов и могут служить ориентиром при планировании клинических исследований.

Литература

1. Kolev K, Longstaff C. Bleeding related to disturbed fibrinolysis. *Br J Haematol* 2016; 175:12–23.
2. Davenport RA, Guerreiro M, Frith D et al. Activated protein C drives the hyperfibrinolysis of acute traumatic coagulopathy. *Anesthesiology* 2017; 126:115–127.
3. Kojima T, Gando S, Morimoto Y et al. Systematic elucidation of effects of tranexamic acid on fibrinolysis and bleeding during and after cardiopulmonary bypass surgery. *Thromb Res* 2001; 104:301–307.
4. Saner FH, Gieseler RK, Akiz H et al. Delicate balance of bleeding and thrombosis in end-stage liver disease and liver transplantation. *Digestion* 2013; 88:135–144.
5. Huang D, Yang Y, Sun J et al. Annexin A2-S100A10 heterotetramer is upregulated by PML/RAR α fusion protein and promotes plasminogen-dependent fibrinolysis and matrix invasion in acute promyelocytic leukemia. *Front Med* 2017; 11:410–422.
6. Uchiba M, Imamura T, Hata H et al. Excessive fibrinolysis in AL-amyloidosis is induced by urokinase-type plasminogen activator from bone marrow plasma cells. *Amyloid* 2009; 16:89–93.
7. Prokopchuk-Gauk O, Brose K. Tranexamic acid to treat life-threatening hemorrhage in prostate cancer associated disseminated intravascular coagulation with excessive fibrinolysis. *Cureus* 2015; 7:e428.
8. Pawlak K, Buraczewska-Buczko A, Pawlak D et al. Hyperfibrinolysis, uPA/suPAR system, kynurenines, and the prevalence of cardiovascular disease in patients with chronic renal failure on conservative treatment. *Am J Med Sci* 2010; 339:5–9.
9. Weitz JI, Leslie B. Urokinase has direct catalytic activity against fibrinogen and renders it less clottable by thrombin. *J Clin Invest* 1990; 86:203–212.
10. Биткова Е. Е., Тимербаев В. Х., Хватов В. Б. и др. Влияние отечественных препаратов — ингибиторов фибринолиза на агрегантное состояние крови и объем операционной кровопотери у кардиохирургических больных. *Анестезиология и реаниматология* 2014; 2:59–64.
11. Буланов А. Ю., Прасолов Н. В. Средства фармацевтического гемостаза в современной клинической практике. *Тольяттинский медицинский консилиум* 2013; 3–4:25–29.
12. Shenkman B, Livnat T, Budnik I et al. Plasma tissue-type plasminogen activator increases fibrinolytic activity of exogenous urokinase-type plasminogen activator. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012; 23:729–733.
13. Gall I, Brohi K, Davenport R. Diagnosis and treatment of hyperfibrinolysis in trauma (a European perspective). *Semin Thromb Hemost* 2017; 43:224–234.
14. Буланов А. Ю. Роль тромбоэластографии в трансфузионной терапии посттравматической коагулопатии. *Трансфузиология* 2011; 12:47–55.
15. Ройтман Е. В. «Проблема гемостаза» в лабораторной диагностике. *Поликлиника* 2016; 1–3:29–36.
16. Жибурт Е. Б. Менеджмент крови пациента при критическом кровотечении. *Эффективная фармакотерапия* 2014; 6:20–27.
17. Чарная М. А., Дементьева И. И. Аминокaproновая или транексамовая кислоты в кардиохирургии: что? где? когда? Обзор литературы. Часть 1. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия* 2016; 9:72–77.
18. Roberts I, Edwards P, Prieto D et al. Tranexamic acid in bleeding trauma patients: an exploration of benefits and harms. *Trials* 2017; 18:48.
19. Varju I, Tenekedjiev K, Keresztes Z et al. Fractal kinetic behavior of plasmin on the surface of fibrin meshwork. *Biochemistry* 2014; 53:6348–6356.
20. Krishnamurti C, Vukelja SJ, Alving BM. Inhibitory effects of lysine analogues on t-PA induced whole blood clot lysis. *Thromb Res* 1994; 73:419–430.
21. Silva MMCG, Thelwell C, Williams SC et al. Regulation of fibrinolysis by C-terminal lysines operates through plasminogen and plasmin but not tissue-type plasminogen activator. *J Thromb Haemost* 2012; 10:2354–2360.
22. Stewart RJ, Fredenburgh JC, Weitz JI. Characterization of the interactions of plasminogen and tissue and vampire bat plasminogen activators with fibrinogen, fibrin, and the complex of D-dimer noncovalently linked to fragment E. *JBC* 1998; 273:18292–18299.

23. Takada A, Makino Y, Takada Y. Effects of tranexamic acid on fibrinolysis, fibrinogenolysis and amidolysis. *Thromb Res* 1986; 42:39–47.
24. Takada A, Sugawara Y, Takada Y. Enhancement of the activation of Glu-plasminogen by urokinase in the simultaneous presence of tranexamic acid or fibrin. *Haemostasis* 1989; 19:26–31.
25. Stief TW. In vitro simulation of thrombolysis inhibition. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008; 14:234–237.
26. Hijazi N, Abu Fanne R, Abramovitch R et al. Endogenous plasminogen activators mediate progressive intracerebral hemorrhage after traumatic brain injury in mice. *Blood* 2015; 125:2558–2567.
27. Cushing MM, Fitzgerald MM, Harris RM et al. Influence of cryoprecipitate, factor XIII, and fibrinogen concentrate on hyperfibrinolysis. *Transfusion* 2017; 57:2502–2510.
28. Aisina RB, Mukhametova LI. Structure and function of plasminogen/plasmin system. *Russ J Bioorg Chem* 2014; 40:590–605.
29. Hethershaw EL, Cilia La Corte AL, Duval C et al. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2014; 12:197–205.
30. Rijken DC, Uitte de Willige S. Inhibition of fibrinolysis by coagulation factor XIII. *Biomed Res Int* 2017; 2017:1209676.
31. Solomon C, Korte W, Fries D et al. Safety of factor XIII concentrate: analysis of more than 20 years of pharmacovigilance data. *Transfus Med Hemother* 2016; 43:365–373.
32. Gladner JA, Nossal R. Effects of crosslinking on the rigidity and proteolytic susceptibility of human fibrin clots. *Thromb Res* 1983; 30:273–288.
33. Francis CW, Marder VJ. Increased resistance to plasminic degradation of fibrin with highly crosslinked alpha-polymer chains formed at high factor XIII concentrations. *Blood* 1988; 71:1361–1365.
34. Жибурт Е. Б. Менеджмент крови пациента при критическом кровотечении и массивной трансфузии. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова* 2013; 8:71–77.
35. Галстян Г. М., Берковский А. Л., Журавлев В. В. и др. Нужны ли в России препараты фибриногена? *Анестезиология и реаниматология* 2014; 3:49–59.
36. Ryan EA, Mockros LF, Weisel JW et al. Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys J* 1999; 77:2813–2826.
37. Lijnen HR, Van Hoef B, Collen D. Influence of cyanogen-bromide-digested fibrinogen on the kinetics of plasminogen activation by urokinase. *Eur J Biochem* 1984; 144:541–544.