

Левин Г.Я., Сухарева Е.Г.

Влияние эритроцитарных микровезикул на агрегацию тромбоцитов при ожоговой болезни

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, 603155, Нижний Новгород, Верхневолжская набережная, 18/1

Ожоговая болезнь сопровождается значительными нарушениями гемостаза, в том числе — первичного, связанного с агрегацией тромбоцитов. Роль эритроцитарных микровезикул в этом процессе остается неизученной. Эритроцитарные микровезикулы выделяли из отмытых и хранящихся в течение суток эритроцитов путем ультрацентрифугирования при 100000g. Подсчитывали их концентрацию с помощью проточного цитофлуориметра и стандартизировали их количество в пробах. Исследовали антитромбиновую активность эритроцитарных микровезикул индуцированную и неиндуцированную гепарином клотинговым методом. Изучали стимулирующую АДФ, а также спонтанную агрегацию тромбоцитов в условиях искусственного сдвигового потока. Показано, что в ранний период ожоговой болезни в крови в 4,2 раза увеличивается количество эритроцитарных микровезикул. Установлено, что микровезикулы, выделенные из эритроцитов ожоговых больных обладают значительно меньшим антиагрегационным действием, чем микровезикулы, выделенные из эритроцитов доноров. Установлено, что важной причиной этого является значительное снижение антитромбиновой активности в эритроцитарных микровезикулах ожоговых больных по сравнению с нормой. Можно заключить, что снижение антиагрегационного действия и антитромбиновой активности эритроцитарных микровезикул, происходящее на фоне увеличения их концентрации в крови, способствует развитию постожоговой тромбофилии.

Ключевые слова: эритроциты; микровезикулы; ожоговая болезнь; агрегация тромбоцитов; антитромбиновая активность

Levin G.Ya., Sukhareva E.G.

The influence of erythrocyte-derived microvesicles on aggregation of platelets in burn injury

Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 603155, Nizhny Novgorod, Verhne-Volzhskaya nab., 18/1

Burn Injury is accompanied by a significant homeostasis disorder, including the disorder of primary homeostasis, associated with aggregation of platelets. The role of erythrocyte-derived microvesicles in this process has not undergone thorough research. Microvesicles were isolated from washed erythrocytes after one day of storage by ultracentrifugation at 100000 g. The number of MVs was determined by flow cytometry and was standardized in the samples. Heparin-dependent and heparin-independent antithrombin activity in erythrocyte microvesicles was studied by coagulation method. We studied platelet aggregation induced and not induced by ADP under the conditions of artificial shear flow. It was shown that at the early stage of burn injury the number of erythrocyte-derived microvesicles in blood demonstrated a 4.2 -fold increase. We determined that microvesicles, derived from the erythrocytes of burn patients displayed a significantly less aggregation activity than the microvesicles from donors. The main reason is a considerably lower antithrombin activity in the erythrocyte microvesicles of burn patients. Thus, we can conclude that the decrease of antiaggregation and antithrombin activity of erythrocyte microvesicles associated with the increase in their concentration in blood contributes to thrombophilia of burn patients.

Keywords: erythrocytes, microvesicles, burn injury, platelet aggregation, antithrombin activity

Существует большое количество работ, посвященных нарушению гемостаза при ожоговой болезни [1—3]. В них, как правило, сообщается о выраженной гиперкоагуляции, вплоть до развития ДВС-синдрома после термической травмы. Указывается на

множество причин, вызывающих эту гиперкоагуляцию — выброс тканевого тромбопластина, гиперадреналинемию, гемолиз эритроцитов, активацию перекисного окисления липидов, протеолиза и ряд других факторов [3—5]. Известно, что принципиально важную роль в гемокоагуляции играет агрегация тромбоцитов, обуславливающая первичный гемостаз. Ранее нами было показано, что после термической травмы

Для корреспонденции: Левин Григорий Яковлевич, заслуженный деятель науки РФ, доктор мед. наук, проф., руководитель отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: levin@unn.ac.ru

резко повышается спонтанная (поток-индуцированная) агрегация тромбоцитов [6]. Механизм гиперагрегации тромбоцитов после ожога остается мало изученным. Совершенно неисследованным является вопрос о возможной роли микровезикул (МВ), в частности, эритроцитарных МВ, в развитии гиперагрегационного синдрома после термической травмы. В многочисленных исследованиях, посвященных гемокоагуляционной функции эритроцитарных микровезикул (эМВ), показано, что они обладают высокой прокоагулянтной активностью, связанной, главным образом, с тем, что имеющиеся на их мембранах фосфатидилсериновые (ФС) кластеры представляют каталитическую поверхность для внутренней и внешней теназы и протромбиназного комплекса [7].

Цель исследования — изучение участия эритроцитарных микровезикул в процессе агрегации тромбоцитов при ожоговой болезни.

Методика

Исследовано 30 образцов крови больных в возрасте от 18 до 65 лет в острый период ожоговой болезни (ожог II—III степени, более 20% поверхности тела) и 40 образцов крови здоровых людей. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали путем центрифугирования цитратной крови в течение 7 мин при 1000 об./мин. Затем кровь центрифугировали 20 мин при 3000 об./мин., после чего отделяли бестромбоцитарную плазму, удаляли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку и выделяли эритроцитарную массу. Последнюю трижды отмывали в физиологическом растворе, а затем ресуспензировали в трис-буфере в соотношении 2:1 и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. В процессе хранения отмытых эритроцитов происходит накопление МВ [8]. После инкубации эритроциты осаждали с помощью центрифугирования в течение 20 мин при 3000 об./мин, затем надосадочную жидкость очищали [9] от клеточного дебриса. Оценка количества и стандартизация концентрации эМВ проводилась на проточном цитофлюориметре Navios/Gallios (Beckman Coulter, США), после их предварительного осаждения с помощью ультрацентрифугирования на центрифуге Sorvall MX 150 Micro-Ultracentrifuge (Thermo Scientific, США) при 100000g, в течение 60 мин [10]. Стандартизация числа эМВ в пробах проводилась путем разбавления образцов и доведения количества МВ до 5000 ± 512 в мкл.

При исследовании индуцированной и спонтанной агрегации тромбоцитов их число в ОТП стандартизовали, добавляя в неё бестромбоцитарную плазму до достижения концентрации тромбоцитов $200\text{—}250 \times 10^9/\text{л}$.

Спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию тромбоцитов исследовали на приборе собственной конструкции [11], в котором использован принцип, предложенный Н. Schmid-Schonbein et al. [12]. В данном приборе клетки крови помещают между двумя плоскостями пластинами, вращающимися навстречу друг другу. Спонтанную агрегацию тромбоцитов оценивали в условиях сдвигового потока с видеозаписью процесса агрегации и последующей компьютерной обработкой полученных микрофотоснимков. Оценка процесса спонтанной агрегации тромбоцитов проводилась по следующим показателям:

1. Степень агрегации — по суммарной максимальной интегральной оптической плотности тромбоцитарных агрегатов (усл.ед.) — M_a .

2. Скорость агрегации — по суммарной интегральной оптической плотности тромбоцитарных агрегатов через 180 с после начала процесса агрегации (усл.ед.) — A_{180} .

Индукцированная АДФ (2×10^5 М) агрегация тромбоцитов исследовалась на агрегометре по методу С. Born (1962) [13]. При этом оценивали:

1. Степень агрегации — по максимальной амплитуде агрегатограммы (мм) — M_a .

2. Скорость агрегации — по амплитуде агрегатограммы через 20 с, после начала процесса агрегации (мм) — A_{20} .

Определяли антитромбиновую активность (АТА) в МВ клотинговым методом по U. Abildgaard (НПО «Ренам», Россия) на коагулометре Sticker Coagulometer BC1 (Германия) [14].

Принцип метода заключается в определении времени образования сгустка фибрина в смеси, содержащей раствор гепарина в имидазоловом буфере (рН 8,2), тромбина, фибриногена и суспензию МВ. Регистрировали время с момента добавления фибриногена до образования сгустка при +37°C. В контроле вместо суспензии эМВ использовали трис-НС1 буфер.

Оценивали также влияние эМВ на время образования фибринового сгустка в отсутствии гепарина. Смесь, содержащую суспензию эМВ и тромбин, до добавления раствора фибриногена инкубировали в течение 2 ч. После этого добавляли раствор фибриногена и определяли время фибринообразования. В контроле вместо суспензии эМВ использовали трис-НС1 буфер. Регистрировали время с момента добавления фибриногена до образования сгустка при +37°C на коагулометре.

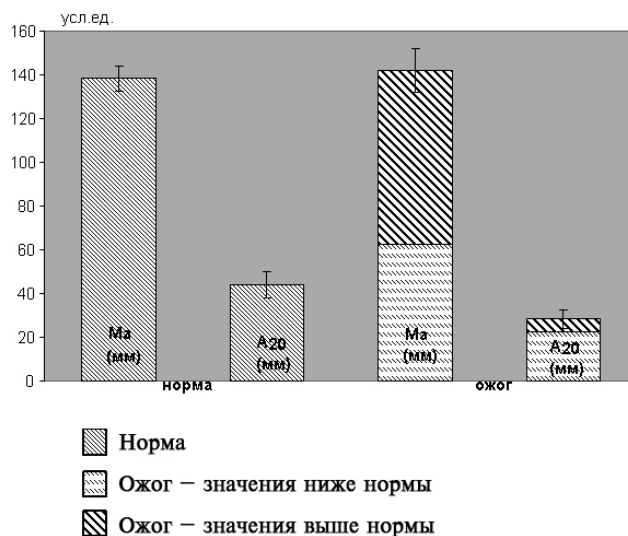
Результаты исследований обработаны с использованием методов непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона и Манна — Уитни при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Как показали проведенные исследования, ожоговая травма вызывает разнонаправленные изменения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (рисунок).

Скорость агрегации в 80% случаев была ниже нормы, а степень — в 56% случаев — выше нормы. Не изменяли эМВ статистически значимо также АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в ОТП как здоровых доноров, так и ожоговых больных. Спонтанная агрегация тромбоцитов у ожоговых больных, напротив, практически во всех случаях характеризовалась резким увеличением как скорости, так и степени (табл.1).

Как показали проведенные исследования, эМВ в значительной степени угнетали спонтанную агрегацию тромбоцитов в ОТП здоровых доноров, причем антиагрегационное действие МВ, выделенных из эритроцитов здоровых людей, было существенно выше, чем эМВ ожоговых больных. Если под влиянием эМВ, выделенных из крови ожоговых больных, скорость агрегации тромбоцитов в плазме снижалась по сравнению с контролем на 21%, а степень на 14%,



Изменение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в ранний период ожоговой болезни.

то под влиянием эМВ, выделенных из крови здоровых доноров, скорость агрегации снижалась на 31%, а степень — на 19% (табл. 2).

Изменение спонтанной агрегации тромбоцитов в острый период ожоговой болезни

Таблица 1

Показатели	Норма	Ожог
Ma (усл.ед.)	466,72 ± 56,95	1063,14 ± 96,41 **
A ₁₈₀ (усл.ед.)	106,05 ± 19,92	450,74 ± 54,01 **

Примечание. ** — p<0,001, критерий Манна — Уитни

Изменение спонтанной агрегации тромбоцитов под действием эритроцитарных микровезикул

Таблица 2

	MA (усл.ед.)	A ₁₈₀ (усл.ед.)
Плазма здорового донора + трис-буфер	1754,68 ± 123,5	1509,15 ± 133,9
Плазма здорового донора + эМВ здорового донора	1430,31 ± 145,5*	1044,04 ± 158,6*
Плазма здорового донора + эМВ ожогового больного	1503,63 ± 130,1*	1186,11 ± 186,9*
Плазма ожогового больного + трис-буфер	2342,67 ± 136,3	2059,75 ± 122,8
Плазма ожогового больного + эМВ здорового донора	1774,72 ± 149,8#	1163,64 ± 179,8#
Плазма ожогового больного + эМВ ожогового больного	1884,64 ± 101,3#	1644,34 ± 132,4#&

Примечание. * — p<0,05; сравнение с контролем (плазма здорового донора и трис-буфер); # — p<0,05 — сравнение с контролем (плазма ожогового больного с трис-буфером); & — p<0,05; сравнение с исследованием плазмы ожогового больного и МВ ожогового больного; критерий Вилкоксона

Антитромбиновая активность в эритроцитарных микровезикулах по U. Abildgaard

Таблица 3

	Кровь здоровых доноров		Кровь ожоговых больных	
	Контроль	МВ	Контроль	МВ
Опыт с гепарином, с	17,4 ± 0,36	23,8 ± 0,59*	17,7 ± 0,26	19,3 ± 0,31*
Опыт без гепарина, с	16,8 ± 0,38	28,4 ± 1,02*	16,8 ± 0,52	24,6 ± 0,61*

Примечание. * — p<0,05; сравнение с контролем, критерий Вилкоксона

Такое же действие эМВ на спонтанную агрегацию тромбоцитов было выявлено и при использовании плазмы ожоговых больных. У ожоговых больных эМВ снижали агрегацию тромбоцитов в меньшей степени, по сравнению с эМВ здоровых доноров. (табл. 2).

При исследовании АТА в эМВ нами установлено, что они замедляли время образования сгустка фибрина из фибриногена в присутствии экзогенного тромбина и гепарина (табл. 3). Выявлена разница в действии на процесс фибринообразования (в условиях активации АТ гепарином) МВ, полученных из эритроцитов ожоговых больных и здоровых доноров. Установлено, что замедление образования сгустка фибрина более выражено при использовании МВ, выделенных из эритроцитов здоровых доноров. Если МВ из эритроцитов ожоговых больных замедляли этот процесс всего на 9%, то эМВ здоровых доноров — на 34%.

Кроме того, изучали АТА эМВ в опытах, в которых в качестве ее катализатора гепарин не использовали. Известно, что АТ без гепарина вызывает медленно прогрессирующее торможение тромбина, максимум которого достигается через 2 ч инкубации АТ и тромбина. Это время инкубации и использовали в данной серии исследований. Установлено, что МВ, выделенные из эритроцитов ожоговых больных, в опытах без использования гепарина, замедляли время фибринообразования в среднем на 46% (табл. 3). Действие эМВ, выделенных из крови здоровых доноров, на процесс фибринообразования без использования гепарина было выражено сильнее и составляло 69%. Можно отметить, что в опытах без гепарина степень замедления фибринообразования под влиянием эМВ была большей (в среднем 69%), чем в опытах с использованием гепарина (в среднем 37%).

Известно, что в острые периоды ожоговой болезни наблюдается выраженная гиперкоагуляция — в крови появляется большое количество активированных факторов свертывания крови, тромбин-антитромбиновых комплексов, увеличивается концентрация фибриногена и D-димеров, снижается уровень анти-тромбинов [15]. В развитии постожоговой тромбофилии, как показано нами, важную роль играет значительное увеличение спонтанной агрегации тромбоцитов [6]. Значимость эМВ в этом процессе остается неизученной.

Как свидетельствуют результаты проведенных нами исследований, в острый период ожоговой болезни значительно увеличивается количество МВ в крови больных. Это может быть связано с двумя основными причинами — увеличением самой везикуляции и со снижением процесса утилизации МВ [16]. Влияние эМВ на гемостаз, в том числе и на первичный ге-

мостаз, может быть обусловлено изменением не только их количества, но и их свойств, о чем свидетельствуют результаты проведенных нами исследований, в которых количество МВ в пробах было стандартизовано.

Установлено, что эМВ здоровых доноров обладают антиагрегационным действием — они снижают как скорость, так и степень спонтанной агрегации тромбоцитов.

Процесс агрегации тромбоцитов связан с достаточно сложными молекулярными взаимодействиями, которые развиваются в ходе реакции активации после стимуляции тромбоцитов растворимыми агонистами [17, 18]. Принципиально важную роль в этих процессах играет тромбин. Он представляет собой трипсиноподобную сериновую протеиназу с уникальными свойствами. Молекула тромбина наряду с классическим активным центром имеет дополнительный центр связывания — узнавания субстратов и рецепторов, содержащих аминокислотную последовательность Arg-Gly-Asp. Благодаря наличию в молекуле тромбина двух субсайтов — анионсвязывающий экзосайт 2, называемый участком связывания гепарина, и анионсвязывающий экзосайт 1, называемый также участком узнавания фибриногена — тромбин способен связываться с отрицательно заряженными клеточными мембранами [19—21].

Известно, что образование МВ связано с дестабилизацией липидного комплекса мембраны родительской клетки и переходом ФС на внешнюю поверхность мембраны. Можно полагать, что снижение спонтанной агрегации тромбоцитов под действием эритроцитарных МВ обусловлено тем, что имеющиеся на их мембранах ФС кластеры, несущие отрицательный заряд, предоставляют поверхность для связывания с анионсвязывающими экзосайтами молекулы тромбина. При этом тромбин может терять способность активировать тромбоциты через PAR рецепторы. Потеря тромбином способности активировать тромбоциты при его взаимодействии с МВ эритроцитов может быть вызвана двумя факторами: во-первых, анионсвязывающие экзосайты тромбина, связываясь с отрицательно заряженными мембранами МВ эритроцитов, уже не имеют возможности взаимодействовать с PAR рецепторами тромбоцитов; во-вторых, анионсвязывающие экзосайты молекулы тромбина рассматриваются некоторыми исследователями как аллостерические центры, изменяющие свойства тромбина при его связывании с определенными эффекторами [22]. Таким образом, возможно, что взаимодействие хотя бы одного из анионсвязывающих экзосайтов тромбина с ФС кластерами МВ эритроцитов приводит к инактивации всей молекулы тромбина как агониста тромбоцитарной агрегации.

Процесс инактивации, по-видимому, обусловлен также наличием антитромбинов на поверхности МВ, что и показано в наших исследованиях. АТА эритроцитарных МВ может быть обусловлена двумя факторами — присутствием на их мембранах гепарин-зависимых и гепарин независимых ингибиторов, а также свойствами мембраны, на поверхности которой могут не только формироваться теназные и протромбиназные комплексы, но и изменяться способность тромбина расщеплять фибриноген. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что торможение фибринообразования МВ более выражено в опытах без гепарина, причем после предварительной инкубации тромбина с эритроцитами или МВ. Медленно прогрессирующим антитромбиновым действием обладают антитромбин (если он не активирован гепарином) и α_2 макроглобулин, что показано еще в 1978 году [23].

В присутствии гепарина проявляется и быстро прогрессирующая инактивация тромбина, что свидетельствует о наличии на мембране МВ гепарин-зависимых ингибиторов, прежде всего — антитромбина и кофактора гепарина II. В связи с использованием нами человеческого тромбина разделить влияние того или другого ингибитора на АТА не удается, хотя известно, что сродство к гепарину у кофактора гепарина II на порядок ниже, чем у антитромбина [24]. Определенную роль в общей АТА МВ могут играть и свойства самой мембраны, в частности — наличие на ее поверхности ФС. Еще в 1976 году было показано, что ФС тормозит реакцию тромбин-антитромбин, образуя устойчивый комплекс с тромбином и с субстратом-фибриногеном [25]. Нельзя исключить усиление сорбции тканевого фактора на мембранах МВ именно при ожоговой болезни, при которой повреждение тканей сопровождается выбросом в кровотоки большого количества тканевого фактора. При этом на фосфолипидных мембранах МВ образуется большое количество активных комплексов тканевого фактора с VII [26]. Учитывая, что образование МВ связано с дестабилизацией липидного комплекса мембраны родительской клетки, в результате которого происходит перераспределение фосфолипидов, можно полагать, что оно во многом определяет АТА эритроцитарных МВ. АТА в МВ, выделяемых из эритроцитов ожоговых больных, особенно при ее активации гепарином, меньшая, чем в выделяемых из эритроцитов здоровых доноров. Это может быть связано с рядом факторов: во-первых, более низкая АТА может определяться повышенной генерацией тромбина при ожоговой болезни, и, как следствие, большим связыванием антитромбинов, во-вторых, снижение содержания антитромбинов в плазме крови может приводить к связыванию их в меньшем количестве с мембранами эритроцитов, в-третьих, наличие гепариноте-

рапии в острый период ожоговой болезни приводит к связыванию антитромбинов.

Вероятнее всего, именно снижением АТ активности в МВ, выделенных из эритроцитов ожоговых больных, обусловлен значительно меньший антиагрегационный эффект этих микровезикул. Выявлена четкая корреляция этих процессов при ожоговой болезни.

АДФ индуцированная агрегация тромбоцитов имеет совершенно иной механизм развития. Освобождаясь из активированных клеток (плотных гранул тромбоцитов), АДФ взаимодействует со специфическими пуриновыми рецепторами на тромбоцитах и может вызывать обратимую и необратимую агрегацию в зависимости от концентрации агониста. При действии небольших концентраций АДФ происходит обратимая агрегация, которая ведет к изменению формы клеток и экспонированию на поверхность интегринов α_{IIb}/β_3 , связывающих фибриноген. Необратимая агрегация, вызываемая более высокими концентрациями АДФ, приводит к реакции высвобождения. Эта реакция обеспечивается взаимодействием АДФ с другим членом семейства пуриновых рецепторов — P2Y₁₂, связанным с белком G_i.

Судя по полученным нами данным, эМВ не вызывают существенных изменений в процессе АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов ни в норме, ни при ожоговой болезни.

Заключение

Таким образом, нами установлено, что антиагрегационное действие эМВ на тромбоциты значительно менее выражено у ожоговых больных. Важной причиной этого является снижение АТ активности МВ, выделенных из эритроцитов ожоговых больных. Можно заключить, что снижение «защитного» действия эМВ (антиагрегационного и антитромбинового) при ожоговой болезни, происходящего на фоне их высокой прокоагулянтной активности и увеличения их концентрации в крови, способствует развитию постожоговой тромбофилии.

Список литературы

1. Innes D., Sevitt S. Coagulation and fibrinolysis in injured patients. *J. Clin. Pathol.* 1964; 17(1): 1-13.
2. Arturson G. Forty years in burns research — the postburn inflammatory response. *Burns.* 2000; 26: 599-604.
3. Lavrentieva A., Kontakiotis T., Bitzani M., Papaioannou-Gaki G., Parlapani A., Thomareis O., et al. Early coagulation disorders after severe burn injury: impact on mortality. *Intensive Care Med.* 2008; 34: 700-6.
4. Fang C.H., Li B.G., Wray C.J., Hasselgren P.O. Insulin-like growth factor-I inhibits lysosomal and proteaso-

me-dependent proteolysis in skeletal muscle after burn injury. *J. Burn Care Rehabil.* 2002; 23(5): 318-25.

5. Eurenus K., Rossi T.D., McEuen D.D., Arnold J., McManus W.F. Blood Coagulation in Burn Injury. *Exp. Biol. Med.* 1974; 147: 878-82.

6. Levin G.Y., Egorihina M.N. The role of fibrinogen in aggregation of platelets in burn injury. *Burns.* 2010; 36: 806-10.

7. Rubin O., Crettaz D., Tissot J.-D., Lion N. Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs? *Blood Transfus.* 2010; 8: 31-8.

8. Distler J.H., Huber L.C., Hueber A.J., Reich C.F., Gay S., Distler O., et al. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis.* 2005; 10: 731-41.

9. Dey-Hazra E., Hertel B., Kirsch T., Woywodt A., Lovric S., Haller H., et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc. Health Risk Manag.* 2010; 6: 1125-33.

10. Chung S.M., Bae O.N., Lim K.M., Noh J.Y., Lee M.Y., Jung Y.S., et al. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 414-21.

11. Левин Г.Я., Модин А.П., Кудрицкий С.Ю., Соснина Л.Н. Устройство для исследования агрегации тромбоцитов. Патент 22783816 РФ; 2006.

12. Schmid-Schonbein H., Gosen J.V., Heinrich L., Klose H.J., Volger E. Counterrotating "rheoscope chamber" for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry. *Microvasc. Res.* 1973; 6: 366-76.

13. Born C.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962; 194: 927-9.

14. Abildgaard U. Biological action and clinical significance of antithrombin III. *Haematologia.* 1984; 17(1): 77-9.

15. Garcia-Avello A., Lorente J.A., Cesar-Perez J., Garcia-Frade L.J., Alvarado R., Arevalo J.M., et al. Degree of hypercoagulability and hyperfibrinolysis is related to organ failure and prognosis after burn trauma. *Thromb. Res.* 1998; 89(2): 59-64.

16. Pham T.N., Warren A.J., Phan H.H., Molitor F., Greenhalgh D.G., Palmieri T.L. Impact of tight glycemic control in severely burned children. *J. Trauma.* 2005; 59(5): 1148-54.

17. Струкова С.М. Роль тромбоцитов и сериновых протеаз в сопряжении свертывания крови и воспаления. *Биохимия.* 2004; 69(10): 1314-31.

18. Siss W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiological Reviews.* 1989; 69(1): 58-178.

19. Струкова С.М. Тромбин — регулятор процессов воспаления и репарации тканей. *Биохимия.* 2001; 66(1): 14-27.

20. Fenton J.W. Thrombin functions and antithrombotic intervention. *Thromb. Haemost.* 1995; 74: 493-98.

21. Stubbs M.T., Bode W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res.* 1993; 69(1): 1-58.

22. Струкова С.М., Киреева Е.Г., Дугина Т.Н. Механизмы взаимодействия тромбина с клетками. Взаимодействие тромбина с клетками эндотелия, тучными и другими. *Вестник МГУ. Биология.* 1997; 1: 8-13.

23. Abildgaard U. Evidence that antithrombin III is the main physiological inhibitor of coagulation enzymes. In: *The*

physiological inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis. 1979. North-Holland: Elsevier, Biomedical Press; 1979: 31-3.

24. Rau J.C., Beaulieu L.M., Huntington J.A., Church F.C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(1): 102-15.

25. Мухачева И.А. Липоидный антикоагулянт, свойства, противосвертывающее начало, механизм влияния на гемокоагуляцию: Дис. автореф. канд. биол. наук. М.; 1976. 23 с.

26. Neuenchwander P.F., Bianco-Fisher E., Rezaie A.R., Morrissey J.H. Phosphatidylethalamine augments factor VIIa-tissue factor activity: enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. *Biochemistry.* 1995; 34(43): 13988-93.

Поступила 23.06.15

References

1. Innes D., Sevt S. Coagulation and fibrinolysis in injured patients. *J. Clin. Pathol.* 1964; 17(1): 1-13.

2. Arturson G. Forty years in burns research — the postburn inflammatory response. *Burns.* 2000; 26: 599-604.

3. Lavrentieva A., Kontakiotis T., Bitzani M., Papaioannou-Gaki G., Parlapani A., Thomareis O., et al. Early coagulation disorders after severe burn injury: impact on mortality. *Intensive Care Med.* 2008; 34: 700-6.

4. Fang C.H., Li B.G., Wray C.J., Hasselgren P.O. Insulin-like growth factor-I inhibits lysosomal and proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle after burn injury. *J. Burn Care Rehabil.* 2002; 23(5): 318-25.

5. Eurenus K., Rossi T.D., McEuen D.D., Arnold J., McManus W.F. Blood Coagulation in Burn Injury. *Exp. Biol. Med.* 1974; 147: 878-82.

6. Levin G.Y., Egorihina M.N. The role of fibrinogen in aggregation of platelets in burn injury. *Burns.* 2010; 36: 806-10.

7. Rubin O., Crettaz D., Tissot J.-D., Lion N. Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs? *Blood Transfus.* 2010; 8: 31-8.

8. Distler J.H., Huber L.C., Hueber A.J., Reich C.F., Gay S., Distler O., et al. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis.* 2005; 10: 731-41.

9. Dey-Hazra E., Hertel B., Kirsch T., Woywodt A., Lovric S., Haller H., et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc. Health Risk Manag.* 2010; 6: 1125-33.

10. Chung S.M., Bae O.N., Lim K.M., Noh J.Y., Lee M.Y., Jung Y.S., et al. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 414-21.

11. Levin G.Y., Modin A.P., Kudritsky S.Y., Sosnina L.N. Device for researching platelet aggregation. Patent 2278381, RF; 2006. (in Russian)

12. Schmid-Schonbein H., Gosen J.V., Heinrich L., Klose H.J., Volger E. Counterrotating "rheoscope chamber" for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry. *Microvasc. Res.* 1973; 6: 366-76.

13. Born C.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962; 194: 927-9.

14. Abildgaard U. Biological action and clinical significance of antithrombin III. *Haematologia*. 1984; 17(1): 77-9.
15. Garcia-Avello A., Lorente J.A., Cesar-Perez J., Garcia-Frade L.J., Alvarado R., Arevalo J.M., et al. Degree of hypercoagulability and hyperfibrinolysis is related to organ failure and prognosis after burn trauma. *Thromb. Res*. 1998; 89(2): 59-64.
16. Pham T.N., Warren A.J., Phan H.H., Molitor F., Greenhalgh D.G., Palmieri T.L. Impact of tight glycemic control in severely burned children. *J. Trauma*. 2005; 59(5): 1148-54.
17. Strukova S.M. Role of platelets and serine proteinases in coupling of blood coagulation and inflammation. *Biokhimiya*. 2004; 69(10): 1314-31. (in Russian)
18. Siss W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiological Reviews*. 1989; 69(1): 58-178.
19. Strukova S.M. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biokhimiya*. 2001; 66(1): 14-27. (in Russian)
20. Fenton J.W. Thrombin functions and antithrombotic intervention. *Thromb. Haemost.* 1995; 74: 493-98.
21. Stubbs M.T., Bode W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res*. 1993; 69(1): 1-58.
22. Strukova S.M., Kireeva E.G., Dugina T.N. Mechanisms of thrombin-cellular interaction. Interaction of thrombin with endothelial cells, mast cells and others. *Vestnik MGU. Biologiya*. 1997; 1: 8-13. (in Russian)
23. Abildgaard U. Evidence that antithrombin III is the main physiological inhibitor of coagulation enzymes. In: *The physiological inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis*. 1979. North-Holland: Elsevier, Biomedical Press; 1979: 31-3.
24. Rau J.C., Beaulieu L.M., Huntington J.A., Church F.C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(1): 102-15.
25. Mukhacheva I.A. *Lipoid anticoagulant, properties, anticoagulant beginning, mechanism of influence on hemocoagulation* diss. avtoref. Moscow; 1976. 23 p. (in Russian)
26. Neuenschwander P.F., Bianco-Fisher E., Rezaie A.R., Morrissey J.H. Phosphatidylethalamine augments factor VIIa-tissue factor activity: enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. *Biochemistry*. 1995; 34(43): 13988-93.

Received 23.06.15

Сведения об авторах:

Сухарева Екатерина Геннадьевна — мл. науч. сотр. отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: ekaterina.syhareva@gmail.com