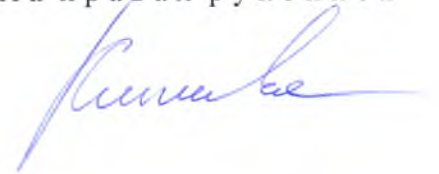


На правах рукописи



КЛЫЧЕВА Майя Михайловна

**Особенности регуляции процессов гемостаза в поздние сроки нормально протекающей  
беременности**

03.03.01 – Физиология

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Иваново – 2018

**Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.**

**Научный руководитель:**

профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Ив НИИ М и Д им. В.Н. Городкова» Минздрава России, **НАЗАРОВ Сергей Борисович**

**Официальные оппоненты:**

профессор, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения гравитационной хирургии и гемодиализа ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, **ЛЕВИН Григорий Яковлевич**

профессор, доктор биологических наук, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России **РОЙТМАН Евгений Витальевич**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского»

**Защита диссертации состоится «18» октября 2018 года в 13 часов** на заседании Диссертационного совета Д.001.008.01 при ФГБНУ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина, по адресу: г. Москва, ул. Моховая, дом 11, строение 4.

**С диссертацией можно ознакомиться** в ФГБНУ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина и на официальном сайте **www.nphys.ru**

**Автореферат разослан «.....»** 2018 года.

Учёный секретарь

диссертационного совета Д.001.008.01,  
доктор биологических наук



**КУБРЯК Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Беременность протекает в условиях физиологической гиперкоагуляции, обусловленной повышенным содержанием фибриногена, всех витамин К-зависимых факторов свертывания крови, снижением фибринолитической и естественной антикоагулянтной активности [Бышевский А.Ш., 2010; Момот А.П. и др., Thornton P., Douglas J., 2010; 2014; Cui C. et al., 2017]. Изменение компонентов системы гемостаза и ее регуляции в поздние сроки беременности является одним из механизмов подготовки организма к родам. При адаптации организма женщины к беременности большое значение имеют адренергические механизмы, которые участвуют в регуляции системы гемостаза и обеспечении физиологического состояния миометрия в течение беременности и в родах [Дмитриева С.Л. и др., 2012].

Изучение продукции оксида азота (NO) как регулятора физиологических функций организма, показало, что NO ингибирует адгезию и агрегацию тромбоцитов [Bajraktari G. et al., 2017]. Физиологическое течение беременности сопровождается изменениями продукции NO. При беременности NO принимает участие в физиологической адаптации сосудов [Valdes G. et al., 2009; Leo S.H. et al., 2017], в регуляции агрегации тромбоцитов [Neri I. et al., 1998]. Большинство исследователей считают, что биосинтез NO при нормально протекающей беременности усиливается, особенно во II триместре, а пика достигает в III триместре [Shaamash A.H. et al., 2000; Choi J.W. et al., 2002; Hodžić J. et al., 2017.]. Однако Hata T. и соавт. (1999) получили результаты о снижении продукции NO, в то время как Brown M.A. с соавт. (1995), Smarason A.K. с соавт. (1997), Teran E. с соавт. (2004) показали, что никаких изменений в биосинтезе NO при нормальной протекающей беременности по сравнению с небеременными женщинами не наблюдается.

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению изменения продукции оксида азота у беременных женщин, до сих пор нет однозначного мнения в вопросах регуляции оксидом азота активности тромбоцитов и влияния на процесс свертывания крови. Сообщения об эффективности и безопасности применения доноров NO при беременности противоречивы, данный вопрос требует дальнейшего изучения [Алимхаджиева М.А., 2009; Conde-Agudelo A., Romero R., 2013; Duckitt K. et al., 2014; Schleussner E. et al., 2014; Abdel Razik M. et al., 2016].

**Степень разработанности темы.** Путь оксид азота-растворимая гуанилатциклаза-циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) контролирует важные физиологические функции, такие как релаксация гладких мышц, агрегация тромбоцитов [Rogers N.M. et al., 2014]. В настоящее время преобладает концепция об ингибирующем действии NO на активацию тромбоцитов [Flierl U. et al., 2015; Inami K. et al., 2015; Xie Y. et al., 2017]. Однако имеются

работы, указывающее на стимулирующее действие эндотелиальной синтазы оксида азота (e-NOS) на секрецию и агрегацию тромбоцитов, индуцированную низкими дозами агонистов тромбоцитов. В исследовании Marjanovic J.A. с соавт. (2005) показано, что донаторы NO в низких концентрациях стимулировали агрегацию тромбоцитов, а в высоких ингибировали. Проводились исследования донаторов NO на свертывание крови методом тромбоэластографии (ТЭГ). В работе Nielsen V.G. с соавт. (2004) на лиофилизированной контрольной плазме показано дозозависимое ингибирующее влияние донатора SIN-1 на свертывание плазмы по данным ТЭГ. Донор NO (DEANONOate) проявлял ингибирующее действие на все параметры ТЭГ в плазме богатой тромбоцитами и цельной крови [Park J.W. et al., 2014]. В настоящее время установлены индивидуальные особенности реактивности тромбоцитов на агонисты агрегации среди здоровых доноров [Горохова В.С. и др., 2016]. Radziwon-Balicka A. с соавт. (2017) в своем исследовании показали, что существуют функционально различные субпопуляции тромбоцитов, основанные на их способности генерировать и реагировать на оксид азота.

Закономерности действия донаторов NO на агрегацию тромбоцитов и свертывание крови в зависимости от индивидуальных особенностей человека к его действию изучены недостаточно полно, в том числе и при физиологически протекающей беременности. Для ответа на данные вопросы было проведено исследование, направленное на анализ вариабельности функционального ответа тромбоцитов: исследовали влияние донатора оксида азота на функцию тромбоцитов и процессы свертывания плазмы крови с использованием метода ТЭГ, в том числе в присутствии адреналина.

**Цели и задачи.** Цель данной работы: установить особенности содержания факторов, регулирующих свертывание крови, и влияния донатора оксида азота SIN-1 in vitro на процессы гемостаза при нормально протекающей беременности в срок гестации 38-40 недель.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выявить особенности состояния системы оксида азота (эндотелиальной синтазы оксида азота, суммарных нитратов и нитритов, циклического гуанозинмонофосфата) и содержания катехоламинов (адреналина, норадреналина) в периферической крови у женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации.
2. Оценить особенности функциональной активности тромбоцитов женщин с нормально протекающей беременностью в срок гестации 38-40 недель путем определения тромбоцитарного фактора 4 и  $\beta$ -тромбоглобулина в периферической крови.
3. Выявить особенности влияния донатора оксида азота SIN-1 in vitro на адреналин- и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов у небеременных и женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации.

4. Исследовать влияние донатора оксида азота SIN-1 и его сочетание с адреналином *in vitro* на свертывание богатой тромбоцитами плазмы методом тромбоэластографии у небеременных и женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации.
5. Установить индивидуальные особенности действия донатора оксида азота SIN-1 на агрегацию тромбоцитов и свертывание богатой тромбоцитами плазмы крови (по данным тромбоэластографии) у небеременных и женщин с нормально протекающей беременностью в срок гестации 38-40 недель.

**Научная новизна.** Установлены особенности системы оксида азота у женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации, которые заключаются в снижении уровня e-NOS, цГМФ в плазме крови и NOx в сыворотке крови по сравнению с небеременными женщинами. Выявлено различие в функциональной активности тромбоцитов, проявляющееся в снижении уровня тромбоцитарного фактора 4 в плазме крови у женщин с нормально протекающей беременностью в срок гестации 38-40 недель по сравнению с небеременными женщинами. На основании изучения влияния донатора оксида азота SIN-1 *in vitro* у женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации на функциональную активность тромбоцитов впервые показано, что SIN-1 вызывает менее выраженное снижение максимальной степени агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, по сравнению с небеременными женщинами. Впервые установлены индивидуальные особенности чувствительности тромбоцитов у женщин на стимуляцию донатором оксида азота SIN-1 *in vitro*. В группе беременных чаще встречаются женщины со сниженной чувствительностью тромбоцитов к донатору оксида азота SIN-1 (по данным агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ) по сравнению с небеременными женщинами. На основании исследования влияния донатора оксида азота SIN-1, адреналина *in vitro* на свертывание богатой тромбоцитами плазмы выявлены более выраженные изменения показателей тромбоэластограммы у женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации по сравнению с небеременными женщинами. Установлено, что в зависимости от чувствительности тромбоцитов к действию оксида азота у обследованных женщин наблюдается различная гемостатическая направленность плазмы крови. У женщин с повышенным коагуляционным потенциалом крови по данным тромбоэластографии наблюдается угнетающее действие SIN-1 на свертывание богатой тромбоцитами плазмы крови *in vitro*.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Получены новые теоретические данные о влиянии донатора оксида азота SIN-1 на агрегацию тромбоцитов и свертывание крови, которые могут служить теоретической основой для разработки персонализированных подходов к лечению осложнений беременности. Полученные значения

доверительных интервалов лабораторных показателей e-NOS, цГМФ, адреналина, норадреналина могут применяться как ориентировочные границы нормы для беременных женщин в срок гестации 38-40 недель.

**Методология и методы исследования.** Исследование проведено на базе ФГБУ «ИВ НИИ М и Д им. В.Н. Городкова» Минздрава России. Лабораторные исследования проводились в лаборатории клинической биохимии и генетики, а также в клинко-диагностической лаборатории. На всех этапах работы соблюдены этические принципы проведения исследований с участием человека в качестве субъекта исследований. В исследование были включены 70 женщин в возрасте от 20 до 32 лет. Контрольную группу составили 20 практически здоровых небеременных женщин, основную группу – 50 женщин с нормально протекающей беременностью в срок гестации 38-40 недель. В качестве донатора NO использовали 3-Morpholinopyridone hydrochloride (SIN-1, Acros Organics).

Для выявления индивидуальных особенностей небеременных и беременных женщин в зависимости от действия SIN-1 на агрегацию тромбоцитов были сформированы подгруппы, критерием для формирования которых служило относительное изменение степени агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, после инкубации плазмы богатой тромбоцитами (PRP) с SIN-1 у небеременных женщин, которое составило -59,4 отн. ед. [-79,3; -41,6]. По границам доверительного интервала данного критерия женщины были разделены на подгруппы со средней, сниженной и повышенной чувствительностью тромбоцитов к действию SIN-1. Для оценки индивидуальных особенностей женщин в зависимости от действия донатора SIN-1 на свертывание PRP использовали критерий – относительное изменение показателя R тромбоэластограммы ( $\Delta R$ , у.е.) после инкубации с SIN-1. У небеременных женщин значение данного показателя составило -13,1 отн. ед. [-25,5; 8,52]. По границам данного интервала небеременные и беременные женщины были разделены на статистические подгруппы со средним, стимулирующим и угнетающим действием SIN-1 на свертывание плазмы крови.

Содержание суммарных нитратов и нитритов (NOx) в сыворотке крови оценивали путем восстановления нитратов в нитриты в присутствии хлорида ванадия [Miranda К.М. и др., 2001]. Уровень NOx определяли на спектрофотометре Solar PV 1251С. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) проводили определение в плазме крови: уровня адреналина и норадреналина (наборами фирмы «IBL», Германия); концентрации человеческой e-NOS («R&D Systems», США); уровня цГМФ («Enzo Life Science», Германия); уровня фактора 4 тромбоцитов (PF4) и  $\beta$ -тромбоглобулина ( $\beta$ -ТГ) («Asserachrom», Франция). Для ИФА использовали автоматический ридер EL-808 (BIO-ТЕК INSTRUMENTS INC, США).

Параметры плазменного гемостаза – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), уровень фибриногена

определяли на приборе «STA Compact» (Франция) с использованием реактивов фирмы «Diagnostica Stago». Фибринолитическую активность определяли по методу М.А. Котовщиковой и Б.И. Кузника.

Исследовали влияние SIN-1 на агрегационные свойства тромбоцитов на агрегометре Solar AP 2110 (Беларусь). PRP инкубировали с SIN-1 (конечная концентрация – 10  $\mu$ M) в течение 1 часа в термостате при температуре 37 °C. Затем проводили запись агрегатограммы в течение 10 минут с адреналином (1 мкг/мл) и АДФ (5 мкг/мл). Влияние SIN-1 и адреналина на свертывание плазмы крови изучали на анализаторе гемостаза ТЭГ 5000 (Haemoscope Corporation, США). После инкубации PRP с SIN-1 (конечная концентрация – 10 мМ) проводили запись тромбоэластограммы богатой тромбоцитами плазмы; плазмы с добавлением адреналина ( $2,8 \times 10^{-4}$  мг/мл); плазмы проинкубированной с SIN-1; плазмы, проинкубированной с SIN-1 и добавлением 10 мкл адреналина. Тромбоэластограмму оценивали по параметрам образования сгустка и его лизиса: R (мин) – время от момента постановки пробы до начала образования первых нитей фибрина; K (мин) – время с момента начала образования сгустка до достижения фиксированного уровня прочности сгустка (амплитуда 20 мм);  $\alpha$  (°) – угол, построенный по касательной к тромбоэластограмме из точки начала образования сгустка; MA (мм) – максимальная амплитуда; TMA (мин) – время достижения максимальной амплитуды; G (Kd/sc) – прочность сгустка; MRTG (мм/мин) – максимальная скорость образования сгустка; TMRTG (мин) – время максимальной скорости образования сгустка; LY30 (%) – процент, на который уменьшается амплитуда сгустка в течение 30 минут после достижения MA.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. У женщин с нормально протекающей беременностью в срок гестации 38-40 недель наблюдается сниженная продукция e-NOS, NOx и сниженный уровень цГМФ, снижение тромбоцитарного фактора 4, повышенный уровень адреналина и норадреналина по сравнению с небеременными женщинами, что свидетельствует об участии системы оксида азота и катехоламинов в регуляции формирования гиперкоагуляционного потенциала при физиологической беременности.

2. У женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации выявлены особенности действия донатора оксида азота SIN-1 *in vitro* на процессы гемостаза, проявляющиеся в менее выраженном снижении максимальной степени агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ и более выраженном изменении показателей тромбоэластограммы, по сравнению с небеременными женщинами. У женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации установлены изменения показателей тромбоэластограммы после введения адреналина и более выраженные изменения показателей тромбоэластограммы после

сочетанного действия донатором оксида азота SIN-1 с адреналином *in vitro* по сравнению с небеременными женщинами.

3. Выявлены индивидуальные особенности действия донатора оксида азота SIN-1 у небеременных женщин и женщин с нормально протекающей беременностью на процессы гемостаза *in vitro*. В зависимости от способности тромбоцитов реагировать на стимуляцию SIN-1 в группе беременных женщин чаще встречаются женщины со сниженной чувствительностью тромбоцитов к оксиду азота (по данным агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ) по сравнению с небеременными женщинами. У небеременных и беременных женщин в подгруппе с угнетающим действием донатора оксида азота SIN-1 отмечается более сильный коагуляционный потенциал по данным тромбозластографии.

**Степень достоверности результатов проведенных исследований.** Достоверность результатов диссертационной работы обеспечена экспериментальными доказательствами, полученными в ходе её выполнения. В том числе, достоверность обеспечивалась адекватной организацией исследования и выбором методов, проведением достаточного для статистически значимых результатов числа наблюдений. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с применением пакета программы STATISTIKA-6.0. Для оценки различий между двумя независимыми выборками использовали U-критерий Манна-Уитни, критерий Колмогорова-Смирнова. Для проверки различий между двумя выборками парных измерений использовали T-критерий Уилкоксона. Данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей [Me (25-75%)]. Достоверным считали уровень значимости  $p < 0,05$ .

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы доложены на: 93-й ежегодной научной конференции студентов и молодых ученых «Неделя науки-2013» с международным участием (Иваново, 2013); межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические вопросы здоровья и патологии человека» (Иваново, 2014); межрегиональной научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (Иваново, 2016, 2017); межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы здоровья матери и ребенка» (Иваново, 2014, 2017); IX, X, XI международной научной конференции «Микроциркуляция и гемореология» (Ярославль, 2013, 2015, 2017); Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием (Рязань, 2015); научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием (Душанбе, 2016, 2017); IX междисциплинарной всероссийской конференции с международным участием по акушерству, перинатологии, неонатологии «Здоровая женщина – здоровый новорожденный» (Санкт-Петербург, 2016); международной



научно-практической конференции «Новая наука: проблемы и перспективы» (Стерлитамак, 2016); Всероссийской конференции молодых ученых «Мультидисциплинарный подход к репродуктивному здоровью женщин. Возрастные аспекты» (Москва, 2017).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации диссертационных исследований.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 142 страницах печатного текста, работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Список использованной литературы включает 205 работ, из них 80 работ отечественных авторов. Диссертация иллюстрирована 27 рисунками, 18 таблицами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Характеристика показателей системы гемостаза и ее регуляции

В результате исследования показателей гемостаза у женщин получены данные, указывающие на адаптивное изменение гемостатического равновесия в сторону гиперкоагуляции у беременных женщин, которые согласуются с результатами многочисленных исследований [Момот А.П. и др., 2015; Szecsi P.V. et al., 2010] (таблица 1).

Таблица 1. Показатели гемостаза у обследованных женщин

| Показатель                      | небеременные женщины, n=20 | беременные женщины, n=50 | p     |
|---------------------------------|----------------------------|--------------------------|-------|
| АЧТВ, с                         | 38,2 [38,0; 41,6]          | 36,2 [36,0; 37,0]        | 0,000 |
| Протромбиновое время, с         | 14,1 [13,8; 14,95]         | 13,0 [13,0; 13,5]        | 0,000 |
| Тромбиновое время, с            | 17,1 [16,4; 17,4]          | 16,1 [15,5; 16,5]        | 0,000 |
| Фибриноген плазмы, г/л          | 2,65 [2,31; 3,21]          | 4,92 [4,56; 5,33]        | 0,000 |
| Фибринолитическая активность, % | 12,0 [11,5; 13,0]          | 7,00 [7,00; 8,00]        | 0,000 |

Примечание: числовое значение p приведено как показатель достоверности различий по сравнению с группой небеременных женщин.

В плазме крови беременных женщин уровень тромбоцитарного фактора 4 (PF4) составлял 13,7 [12,2; 15,5] и был достоверно ниже чем в плазме крови небеременных женщин 18,0 [13,8; 19,0] (p=0,000). Поскольку PF4 является специфичным для тромбоцитов продуктом их активации, попадающим в плазму лишь в ходе дегрануляции тромбоцитарных гранул [Thachil J., 2010], полученные в ходе настоящего исследования данные свидетельствуют о

снижении функциональной активности тромбоцитов. Содержание  $\beta$ -тромбоглобулина ( $\beta$ -ТГ) в плазме крови не различалось: 27,8 U/ml [17,9; 33,0] у беременных женщин и 28,0 U/ml [20,0; 35,0] у небеременных. Возможно, сниженный уровень PF4, а также уровень  $\beta$ -ТГ характерный для небеременных женщин может быть эндогенным компенсаторным механизмом, который уменьшает активацию тромбоцитов в конце нормально протекающей беременности.

О концентрации оксида азота судили по уровню в крови NOx. По данным наших исследований концентрация NOx у небеременных женщин составила 74,5 мкмоль/л [63,5; 87,5], у беременных женщин была ниже и составила 52,0 мкмоль/л [44,0; 62,0] ( $p=0,000$ ). Анализ полученных данных показал, что у небеременных женщин концентрация e-NOS в плазме составила 3,65 нг/мл [3,34; 3,75], в то время как у беременных женщин выявлено ее снижение 2,44 нг/мл [1,90; 3,20] ( $p=0,000$ ). Уровень цГМФ у небеременных женщин составил 0,69 пмоль/мл [0,56; 0,74], а у беременных – 0,46 пмоль/мл [0,30; 0,62] ( $p=0,001$ ).

Возможно, снижение продукции NO в конце III триместра неосложненной беременности связано со сниженным количеством свободного аргинина в сыворотке крови. Так, в исследованиях Хлыбовой С.В. с соавт. (2006) показано, что содержание свободного аргинина в сыворотке крови пациенток остается неизменным на протяжении I триместра и существенно возрастает во II триместре. Повышение уровня свободного аргинина в данном сроке гестации обеспечивает оптимальный уровень синтеза NO и способствует физиологическому течению беременности. III триместр характеризуется снижением содержания аргинина. По данным Климова В.А. (2008) максимальная продукция NO наблюдается в 28 недель физиологически протекающей беременности, затем концентрация NO уменьшается параллельно с увеличением степени зрелости плаценты. Полученные нами данные указывают на то, что в конце физиологической беременности отмечается снижение атромбогенного потенциала эндотелия, о чем свидетельствуют снижение уровней NO. Оксид азота является основным стимулятором образования цГМФ, поэтому в организме обследованных беременных женщин снижено количество цГМФ, что может иметь отношение к механизмам индукции родовой деятельности.

По результатам нашего исследования было выявлено, что содержание катехоламинов в плазме крови у беременных женщин в срок гестации 38-40 недель было достоверно выше, чем у небеременных, что согласуется с литературными данными [Ушакова Г.А., Петрич Л.Н., 2016; Козырина А.А., 2017]. Так, у небеременных женщин содержание адреналина составило 65,4 пг/мл [64,7; 109,3], у беременных – 110,1 пг/мл [66,8; 211,4] ( $p=0,005$ ). Концентрация норадреналина в плазме крови у небеременных женщин соответствовала 305,3 пг/мл [199,2; 312,8], у беременных – 316,6 пг/мл [311,0; 320,4] ( $p=0,001$ ).

## **2. Влияние донатора оксида азота SIN-1 на агрегацию тромбоцитов и свертывание плазмы крови *in vitro***

При оценке исходной агрегационной активности максимальная степень АДФ-индуцированной агрегации у небеременных женщин составляла 96,1% [85,0; 113,5], в то время как у беременных женщин была отмечена более низкая – 74,2% [62,5; 87,8] ( $p=0,000$ ). При стимуляции адреналином агрегационная способность тромбоцитов в двух группах женщин различалась: у небеременных женщин максимальная степень агрегации составила 96,9% [89,9; 107,9], у беременных – 75,2% [60,9; 84,4] ( $p=0,000$ ). Инкубация PRP с SIN-1 приводила к значительному снижению агрегации тромбоцитов. Максимальная степень агрегации тромбоцитов после инкубации с SIN-1 с индуктором агрегации АДФ снижалась до 41,5% [22,8; 61,1] (на 57%) у небеременных женщин, до 46,2% [32,2; 58,8] (на 38%) у беременных женщин. При использовании в качестве индуктора агрегации тромбоцитов адреналина SIN-1 также снижал агрегацию тромбоцитов у небеременных женщин до 9,85% [3,65; 38,0] (на 90%), до 9,30% [2,40; 53,5] (на 88%) у беременных женщин. Известно, что SIN-1 повышает активность гуанилатциклазы, что приводит к увеличению содержания цГМФ и снижению уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , вследствие чего осуществляется контроль над агрегацией тромбоцитов и опосредуется сигнал к дезагрегации [ Roy B., Garthwaite J., 2006; Priora R. et al., 2011].

Относительное изменение максимальной степени агрегации тромбоцитов с АДФ у небеременных женщин составило  $0,48 \pm 0,09$  отн. ед., тогда как у беременных женщин изменение данного показателя оказалось более слабым и равнялось  $0,85 \pm 0,22$  отн. ед. ( $p=0,012$ ). При использовании в качестве индуктора агрегации адреналина различий между группами женщин в относительном изменении максимальной степени агрегации тромбоцитов и относительном изменении интегрального показателя агрегации тромбоцитов не наблюдалось.

Различие в ингибирование донатором SIN-1 агрегации тромбоцитов с АДФ возможно связано с понижением уровня цГМФ при физиологическом течении беременности и низким содержанием NO у данных женщин. В ряде работ показано, что активация тромбоцитарного рецептора к АДФ  $P2Y_{12}$  сильно снижает ингибирующий эффект оксида азота [Kirkby N.S. et al., 2013]. АДФ связывается с рецепторами  $P2Y_{12}$  и  $P2Y_1$ , которые сопряжены с Gi- и Gq-белками соответственно. Сигнал через Gi-белок ингибирует активность аденилатциклазы (AC) и передаёт сигнал PI3-киназам (PI3K), что приводит к активации MAP-киназ (MAPKs), и в дальнейшем к синтезу ТХА2 и секреции гранул [Шатурный В.И. и др., 2014]. Поэтому, можно предположить, что менее выраженное снижение агрегации тромбоцитов у беременных женщин связано со свойственным для физиологически протекающей беременности повышенным содержанием цАМФ [Погорелова Т.Н. и др., 2014], который снижает активность тромбоцитов.

Результаты исследований ТЭГ в богатой тромбоцитами плазме крови демонстрировали более сильный коагуляционный потенциал у беременных женщин в поздние сроки гестации (таблица 2), что согласуется с данными литературы [Polak F. et al., 2011; Sharma S. et al., 2013].

Таблица 2. Особенности показателей тромбоэластограммы у беременных женщин в поздние сроки гестации

| Показатель   | Группа женщин        |                    | p      |
|--------------|----------------------|--------------------|--------|
|              | небеременные<br>n=20 | беременные<br>n=49 |        |
| R, мин       | 17,1 [13,9; 22,1]    | 16,8 [12,8; 19,3]  | > 0,05 |
| K, мин       | 6,40 [5,70; 7,85]    | 4,90 [3,70; 6,20]  | 0,002  |
| Angle, град  | 36,6 [28,0; 42,0]    | 41,3 [35,8; 47,2]  | > 0,05 |
| МА, мм       | 60,6 [52,9; 64,0]    | 73,6 [69,9; 75,5]  | 0,000  |
| ТМА, мин     | 48,7 [44,3; 52,9]    | 47,8 [41,2; 53,5]  | > 0,05 |
| G, Kd/sc     | 7,70 [5,60; 8,90]    | 14,0 [11,6; 15,4]  | 0,000  |
| MRTG, мм/мин | 3,77 [3,23; 6,11]    | 6,32 [4,93; 7,88]  | 0,002  |
| TMRTG, мин   | 22,4 [15,5; 29,5]    | 22,7 [17,4; 26,6]  | > 0,05 |
| LY30, %      | 0,00 [0,00; 0,40]    | 0,00 [0,00; 0,00]  | > 0,05 |

Примечание: числовое значение p приведено как показатель достоверности различий по сравнению с группой небеременных женщин.

Динамику свертывания PRP после стимуляции SIN-1 определяли сравнением показателей тромбоэластограммы PRP с показателями плазмы, инкубированной с SIN-1 (таблица 3). У небеременных и беременных женщин по данным ТЭГ донатор SIN-1 приводит к снижению времени ТМА, усилению лизиса сгустка LY30; у беременных женщин также вызывает снижение времени R, TMRTG, увеличение значения угла  $\alpha$ . Данные изменения демонстрируют более выраженное усиление коагуляции крови у беременных женщин на экзогенный оксид азота *in vitro*. Донатор SIN-1 приводил к усилению лизиса сгустка в обеих группах женщин. Известно, что NO регулирует высвобождение активатора плазминогена: в экспериментах *in vitro* донатор оксида азота снижал уровень PAI-1 [200 Schini-Kerth V.B., 1999].

У беременных женщин добавление адреналина в богатую тромбоцитами плазму приводит к достоверному укорочению времени K, ТМА, увеличению угла  $\alpha$ , усилению лизиса LY30 по сравнению с небеременными женщинами (таблица 3).

У небеременных и беременных женщин сочетанное введение SIN-1 и адреналина в богатую тромбоцитами плазму приводит к снижению времени ТМА, усилению лизиса сгустка LY30, а также дополнительно в группе беременных женщин – к снижению времени R, K, TMRTG, максимальной амплитуды МА, плотности сгустка G, повышению угла  $\alpha$ . Это указывает на то, что данный донатор модулирует активность тромбоцитов после введения адреналина *in vitro* (таблица 3).

Таблица 3. Показатели тромбозластограммы небеременных и беременных женщин в поздние сроки гестации

| Показатель         | Вид экспериментального воздействия | Группа женщин                    |                                  |
|--------------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                    |                                    | небеременные<br>n = 20           | беременные<br>n = 49             |
| R,<br>мин          | контроль                           | 17,1 [13,9; 22,1]                | 16,8 [12,8; 19,3]                |
|                    | Sin-1                              | 15,8 [13,7; 21,8]                | 13,7 [12,1; 16,6] <sup>***</sup> |
|                    | адреналин                          | 18,3 [13,6; 22,05]               | 16,1 [12,8; 19,5]                |
|                    | Sin-1 + адреналин                  | 16,55 [14,2; 19,7]               | 13,4 [11,2; 15,1] <sup>***</sup> |
| K,<br>мин          | контроль                           | 6,40 [5,70; 7,85]                | 4,90 [3,70; 6,20]                |
|                    | Sin-1                              | 5,65 [4,10; 7,00]                | 4,20 [3,45; 5,15]                |
|                    | адреналин                          | 6,00 [4,80; 8,50]                | 4,20 [3,70; 5,20]                |
|                    | Sin-1 + адреналин                  | 5,80 [4,50; 7,40]                | 4,00 [3,10; 4,80] <sup>*</sup>   |
| $\alpha$ ,<br>град | контроль                           | 36,6 [28,0; 42,0]                | 41,3 [35,8; 47,2]                |
|                    | Sin-1                              | 37,2 [30,0; 44,0]                | 46,2 [41,1; 53,9] <sup>***</sup> |
|                    | адреналин                          | 33,6 [27,2; 39,3]                | 44,6 [38,5; 51,9] <sup>*</sup>   |
|                    | Sin-1 + адреналин                  | 35,5 [30,6; 41,7]                | 47,0 [39,6; 54,8] <sup>*</sup>   |
| МА,<br>мм          | контроль                           | 60,6 [52,9; 64,0]                | 73,6 [69,9; 75,5]                |
|                    | Sin-1                              | 57,6 [52,0; 65,1]                | 70,7 [67,5; 75,4]                |
|                    | адреналин                          | 60,0 [50,8; 66,2]                | 73,0 [70,1; 76,1]                |
|                    | Sin-1 + адреналин                  | 57,0 [49,7; 62,5]                | 69,5 [60,1; 73,4] <sup>***</sup> |
| ТМА,<br>мин        | контроль                           | 48,7 [44,3; 52,9]                | 47,8 [41,2; 53,5]                |
|                    | Sin-1                              | 42,9 [36,7; 48,0] <sup>**</sup>  | 37,7 [34,6; 45,9] <sup>***</sup> |
|                    | адреналин                          | 49,7 [43,1; 54,2]                | 46,0 [38,3; 51,8] <sup>*</sup>   |
|                    | Sin-1 + адреналин                  | 44,0 [36,2; 46,9] <sup>*</sup>   | 35,1 [31,3; 38,6] <sup>***</sup> |
| G,<br>Kd/sc        | контроль                           | 7,70 [5,60; 8,90]                | 14,0 [11,6; 15,4]                |
|                    | Sin-1                              | 6,80 [5,40; 9,30]                | 12,1 [10,4; 15,3]                |
|                    | адреналин                          | 7,50 [5,15; 9,80]                | 13,5 [11,7; 15,9]                |
|                    | Sin-1 + адреналин                  | 6,60 [4,90; 8,30]                | 11,4 [7,50; 13,8] <sup>***</sup> |
| MRTG,<br>мм/мин    | контроль                           | 3,77 [3,23; 6,11]                | 6,32 [4,93; 7,88]                |
|                    | Sin-1                              | 4,52 [3,38; 6,50]                | 6,71 [5,22; 9,63]                |
|                    | адреналин                          | 4,27 [2,62; 5,60]                | 6,88 [5,47; 8,23]                |
|                    | Sin-1 + адреналин                  | 4,57 [3,43; 5,34]                | 6,98 [5,65; 8,92]                |
| TMRTG,<br>мин      | контроль                           | 22,4 [15,5; 29,5]                | 22,7 [17,4; 26,6]                |
|                    | Sin-1                              | 19,9 [17,5; 26,3]                | 17,8 [15,7; 20,7] <sup>***</sup> |
|                    | адреналин                          | 26,1 [19,2; 28,5]                | 21,3 [16,5; 25,6]                |
|                    | Sin-1 + адреналин                  | 21,4 [19,4; 25,0]                | 18,3 [15,2; 21,0] <sup>***</sup> |
| LY30,<br>%         | контроль                           | 0,00 [0,00; 0,40]                | 0,00 [0,00; 0,00]                |
|                    | Sin-1                              | 1,00 [0,00; 4,00] <sup>*</sup>   | 0,60 [0,00; 3,70] <sup>***</sup> |
|                    | адреналин                          | 0,00 [0,00; 0,40]                | 0,00 [0,00; 0,20] <sup>*</sup>   |
|                    | Sin-1 + адреналин                  | 3,00 [0,50; 5,40] <sup>***</sup> | 4,50 [2,40; 6,10] <sup>***</sup> |

Примечание: различия достоверны по сравнению с контролем: \* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001

Как известно, при беременности возрастает  $\beta$ -адренореактивность, поэтому, возможно, изменения показателей ТЭГ при введении адреналина *in vitro* наблюдались только у беременных женщин. Было показано, что адреналин способствует снижению функциональной

активности тромбоцитов по показателям МА и G в плазме крови, проинкубированной с SIN-1, по сравнению PRP. Возможно, это связано с тем, что стимуляция  $\beta$ 2-адренорецепторов или повышение уровня цАМФ активирует тромбоцитарную NOS, и эта активация происходит без заметного увеличения внутриклеточного  $Ca^{2+}$  [Queen L.R. et al., 2000].

Результаты последних исследований показывают, что NO и цГМФ играют двойную роль в активации тромбоцитов и тромбообразовании [Blackmore P.F., 2011]. Нами установлено, что инкубация PRP с SIN-1 вызывает ускорение времени R, TMA, TMRTG, увеличение угла ( $\alpha$ ). Возможно, это связано с растворимой гуанилатциклазой, в эксперименте с которой выявлена ее важная стимулирующая роль в агонист-вызванной активации тромбоцитов [Zhang G. et al., 2011]. В работе Stojanovic A. с соавт. (2006) было показано, что *in vitro* стимулирующий эффект NO и цГМФ на активацию тромбоцитов проявлялся только при низкой дозе агонистов тромбоцитов, необходимой для агрегация-зависимой секреции, достаточной для полномасштабной агрегации тромбоцитов и тормозящий – в высокой концентрации.

### **3. Индивидуальные особенности NO-зависимых изменений показателей агрегации тромбоцитов и свертывания крови у женщин в поздние сроки нормально протекающей беременности *in vitro***

Донатор оксида азота SIN-1 подавляет агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, с различной силой как среди беременных, так и небеременных. Согласно нашей гипотезе, противоречивость данных литературы о физиологических эффектах NO и адреналина при беременности может быть обусловлена индивидуальными различиями. В ходе эксперимента установлено, что у разных женщин SIN-1 подавляет агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, с различной силой. На рисунке 1 показаны агрегационные кривые небеременных и беременных женщин с добавлением SIN-1 и без добавления донатора.

Выявлено, что 58% небеременных женщин имели среднюю чувствительность тромбоцитов к действию SIN-1, 21% – сниженную и 21% – повышенную. Среди беременных женщин наблюдалось другое процентное соотношение: слабо реагировали тромбоциты на действие SIN-1 у 51% беременных женщин, у 8% SIN-1 вызывал сильное угнетение агрегации тромбоцитов, а у 41% женщин наблюдалась средняя реакция тромбоцитов на его действие. Согласно процентному соотношению у беременных женщин наблюдается сдвиг чувствительности тромбоцитов к слабой реакции на действие SIN-1 ( $p=0,028$ ).

Определение концентрации адреналина в крови небеременных женщин показало, что наибольшее его количество содержалось у женщин со средней чувствительностью к SIN-1 – 107,2 пг/мл [65,2; 110,3]. У женщин со сниженной чувствительностью к SIN-1 концентрация адреналина составляла 65,0 пг/мл [56,1; 65,2] и была более низкой, чем в группе женщин со

средней чувствительностью к SIN-1 ( $p=0,038$ ). У женщин с повышенной чувствительностью к SIN-1 концентрация адреналина была равна 63,9 пг/мл [40,5; 87,7]. По результатам наших исследований выявлено снижение уровня цГМФ у небеременных женщин со сниженной чувствительностью к действию SIN-1 по сравнению с женщинами со средней чувствительностью к SIN-1, что составило соответственно 0,52 пмоль/мл [0,47; 0,57] и 0,72 пмоль/мл [0,67; 0,80] ( $p=0,009$ ). Концентрация цГМФ в крови женщин с повышенной чувствительностью к SIN-1 соответствовала 0,70 пмоль/мл [0,51; 1,00]. Возможно, отсутствие угнетения тромбоцитарного ответа у данных женщин в ответ на стимуляцию SIN-1, а также снижение уровня цГМФ в крови указывают на нарушение в сигнальной системе NO/цГМФ. Сигнальный путь NO/цГМФ является важным физиологическим модулятором вазомоторного тонуса и функции тромбоцитов [Chirkov Y.Y., Horowitz J.D., 2007; Willoughby S.R. et al., 2012]. Более низкая концентрация цГМФ в крови может быть связана со снижением базальной активности фермента растворимой гуанилатциклазы, которая катализирует биосинтез цГМФ [Reiss C. et al., 2015]. Не исключено, что снижение уровня цГМФ у женщин является компенсаторным и связано с низким содержанием адреналина в крови.

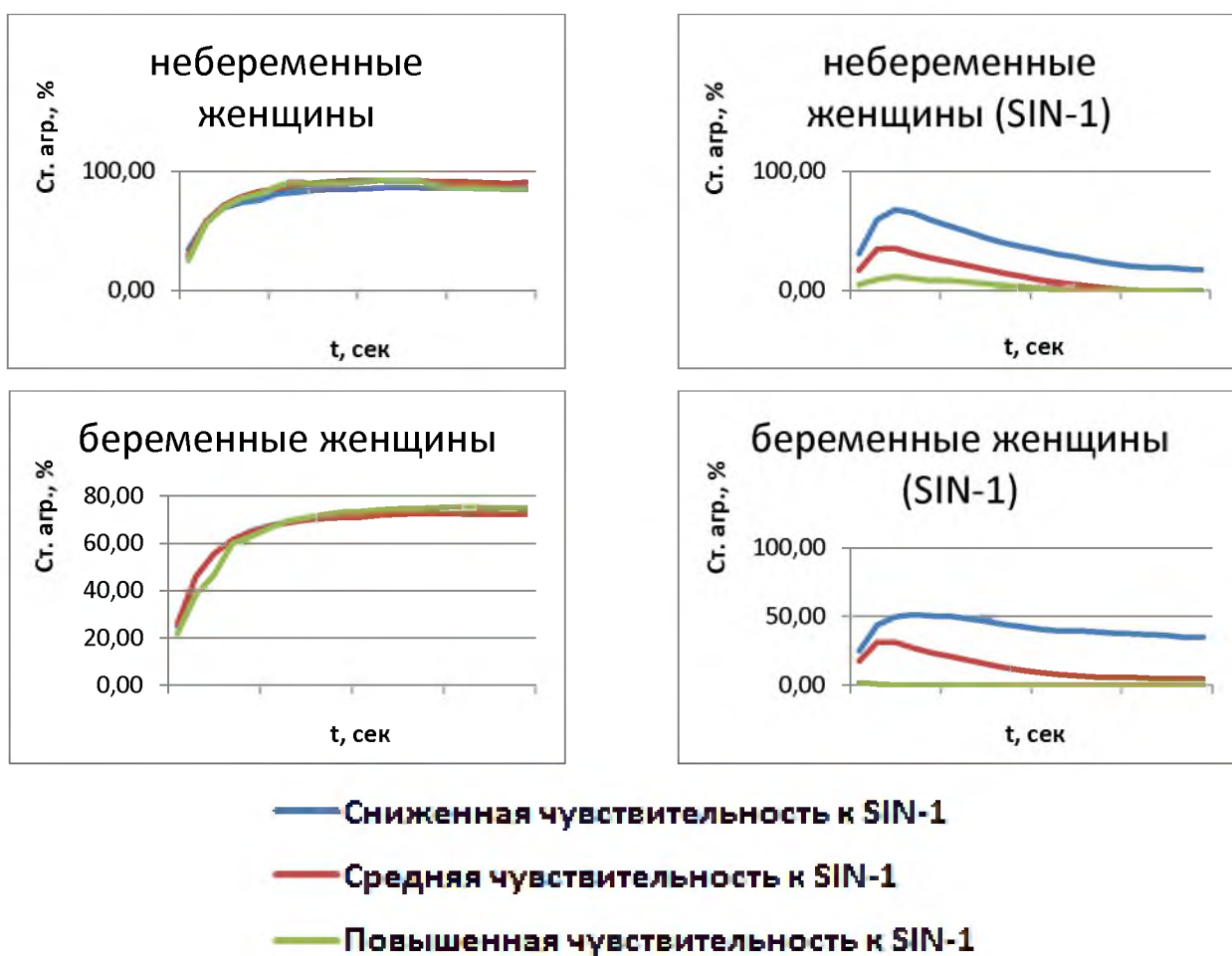


Рисунок 1. Особенности агрегации тромбоцитов у женщин под влиянием SIN-1.

У беременных женщин наблюдались другие достоверные изменения показателей среди выделенных подгрупп. Было отмечено, что у женщин с повышенной чувствительностью тромбоцитов к SIN-1, степень агрегации тромбоцитов с адреналином оказалась достоверно выше (91,1% [83,6; 103,4]), чем в подгруппах со средней (67,3% [58,5; 83,3],  $p=0,025$ ) и повышенной чувствительностью тромбоцитов к донатору оксида азота SIN-1 (73,5 % [64,5; 84,3],  $p=0,032$ ). Также была выявлена разница в содержании  $\beta$ -ТГ. Уровень  $\beta$ -ТГ был повышен у женщин со сниженной чувствительностью тромбоцитов к SIN-1 (30,0 U/ml [24,6; 35,0]) по сравнению с женщинами из подгруппы средней реакции на данный донатор (21,5 U/ml [14,6; 29,0],  $p=0,025$ ). У женщин с повышенной чувствительностью тромбоцитов к действию SIN-1 уровень  $\beta$ -ТГ равнялся 29,0 U/ml [20,0; 33,5]. Так как основная масса женщин с физиологически протекающей беременностью имеет сниженную реакцию на SIN-1, то повышение уровня  $\beta$ -ТГ можно считать физиологичным, что согласуется с литературными данными [Hayashi M. et al., 2002]. Выявлено, что в подгруппе беременных женщин с повышенной чувствительностью тромбоцитов к действию SIN-1 концентрация e-NOS в крови составляла 3,31 нг/мл [2,33; 3,49] и была достоверно выше чем у женщин со средней чувствительностью тромбоцитов к действию SIN-1 (2,21 нг/мл [1,90; 2,83],  $p<0,05$ ). В подгруппе беременных женщин со сниженной чувствительностью тромбоцитов к SIN-1 уровень e-NOS составил 2,54 нг/мл [1,89; 3,46]. По-видимому, NO оказывает модулирующее действие на активность тромбоцитов, а повышенная чувствительность к SIN-1 и увеличение содержания e-NOS являются компенсаторными.

Запись тромбоэластограммы небеременных и беременных женщин показала, что инкубация богатой тромбоцитами плазмы с донатором оксида азота SIN-1 приводила к изменению показателей ТЭГ. При этом SIN-1 вызывал разнонаправленное изменение показателя  $\Delta R$  (у.е.) как среди небеременных, так и беременных женщин. Относительное изменение показателя R тромбоэластограммы –  $\Delta R$  (у.е.) после инкубации с SIN-1 составила – 0,87 отн. ед. [0,74; 1,09]. При разделении на подгруппы небеременных женщин по границам доверительного интервала данного критерия получили, что у 50% небеременных женщин SIN-1 оказывал среднее действие на свертывание богатой тромбоцитами плазмы крови, у 25% – стимулирующее действие и у 25% – угнетающее действие. При разделении на подгруппы беременных женщин по границам доверительного интервала данного критерия выявили, что у 48% женщин SIN-1 оказывал среднее действие на свертывание плазмы крови; у 29% – стимулирующее и у 23% – угнетающее действие.

По данным исследований отмечено, что в подгруппе небеременных женщин с угнетающим действием донатора оксида азота SIN-1 на свертывание богатой тромбоцитами плазмы крови показатели тромбоэластограммы R и K, характеризующие время свертывания,



оказались достоверно ниже, чем в подгруппе женщин со стимулирующим действием SIN-1 (таблица 4). Время R у данных женщин было укорочено и по сравнению с женщинами со средним действием SIN-1. Время, необходимое для формирования устойчивого сгустка TMA, а также время максимальной скорости образования сгустка крови TMRTG у женщин в подгруппе с угнетающим действием SIN-1 также оказались укорочены по сравнению с женщинами других двух подгрупп. Между подгруппами со стимулирующим и угнетающим действием SIN-1 наблюдалась разница в максимальной скорости образования сгустка; она была выше у женщин с угнетающим действием SIN-1. Показатели, характеризующие наибольшую плотность сгустка и его прочность MA и G, также были повышены у женщин из подгруппы с угнетающим действием SIN-1 по сравнению с женщинами других подгрупп.

Таблица 4. Особенности показателей небеременных женщин в зависимости от изменения показателя R тромбоэластограммы под влиянием SIN-1

| Показатель     | Среднее действие SIN-1 (n=10) | Стимулирующее действие SIN-1 (n=5) | Угнетающее действие SIN-1 (n=5) |
|----------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| R, мин         | 21,1 [16,4; 23,9]             | 19,3 [15,7; 22,1]                  | 12,8 [8,80; 13,7]               |
| p <sub>1</sub> |                               |                                    | 0,014                           |
| p <sub>2</sub> |                               |                                    | 0,029                           |
| K, мин         | 6,55 [6,00; 8,60]             | 6,60 [6,20; 7,70]                  | 4,20 [3,20; 5,40]               |
| p <sub>1</sub> |                               |                                    | 0,020                           |
| p <sub>2</sub> |                               |                                    |                                 |
| α, град.       | 33,5 [27,3; 38,7]             | 28,4 [27,5; 36,0]                  | 43,8 [39,2; 48,6]               |
| p <sub>1</sub> |                               |                                    |                                 |
| p <sub>2</sub> |                               |                                    |                                 |
| MA, мм         | 56,3 [50,6; 63,3]             | 60,4 [58,8; 60,8]                  | 64,7 [61,7; 68,8]               |
| p <sub>1</sub> |                               |                                    | 0,037                           |
| p <sub>2</sub> |                               |                                    | 0,029                           |
| TMA, мин       | 49,7 [44,6; 53,5]             | 52,3 [48,8; 63,9]                  | 41,0 [36,6; 44,3]               |
| p <sub>1</sub> |                               |                                    | 0,023                           |
| p <sub>2</sub> |                               |                                    | 0,016                           |
| G, Kd/sc       | 6,45 [5,10; 8,60]             | 7,60 [7,10; 7,80]                  | 9,20 [8,10; 11,0]               |
| p <sub>1</sub> |                               |                                    | 0,037                           |
| p <sub>2</sub> |                               |                                    | 0,028                           |
| MRTG, мм/мин   | 4,14 [3,07; 6,03]             | 3,25 [3,20; 3,63]                  | 6,21 [3,81; 7,11]               |
| p <sub>1</sub> |                               |                                    |                                 |
| p <sub>2</sub> |                               |                                    | 0,047                           |
| TMRTG, мин     | 25,0 [20,9; 32,1]             | 23,8 [16,2; 28,7]                  | 14,3 [14,3; 14,8]               |
| p <sub>1</sub> |                               |                                    | 0,010                           |
| p <sub>2</sub> |                               |                                    | 0,047                           |

Примечание: числовое значение p приведено как показатель достоверности различий: p<sub>1</sub> – по сравнению с группой женщин со средней чувствительностью к SIN-1; p<sub>2</sub> – между группами со стимулирующим и угнетающим действием SIN-1

У беременных женщин достоверных различий между подгруппами выявлено меньше (таблица 5). Так, в подгруппе женщин с угнетающим действием SIN-1 время R наступало быстрее по сравнению с женщинами в подгруппах со средним и стимулирующим действием SIN-1. Время наступления максимальной амплитуды TMA у женщин с угнетающим действием SIN-1 было короче, чем в группе женщин со стимулирующим действием SIN-1. Различался между подгруппами и показатель, отображающий время максимальной скорости образования сгустка TMRTG; данный показатель оказался повышенным в подгруппе женщин со стимулирующим действием SIN-1 и пониженным в подгруппе женщин с угнетающим действием SIN-1 по сравнению с женщинами из подгруппы со средним действием SIN-1.

Таблица 5. Особенности показателей беременных женщин в зависимости от изменения показателя R тромбоэластограммы, под влиянием SIN-1

| Показатель     | Среднее действие SIN-1 (n=23) | Стимулирующее действие SIN-1 (n=14) | Угнетающее действие SIN-1 (n=11) |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| R, мин         | 16,8 [12,8; 21,1]             | 18,6 [17,6; 19,4]                   | 12,2 [10,8; 16,1]                |
| p <sub>1</sub> |                               |                                     | 0,025                            |
| p <sub>2</sub> |                               |                                     | 0,001                            |
| K, мин         | 4,50 [3,30; 6,30]             | 5,45 [4,20; 6,20]                   | 4,70 [3,20; 6,30]                |
| p <sub>1</sub> |                               |                                     |                                  |
| p <sub>2</sub> |                               |                                     |                                  |
| α, град.       | 43,9 [35,4; 48,0]             | 40,1 [33,5; 42,6]                   | 44,5 [37,3; 53,1]                |
| p <sub>1</sub> |                               |                                     |                                  |
| p <sub>2</sub> |                               |                                     |                                  |
| МА, мм         | 74,6 [71,6; 76,7]             | 73,0 [69,5; 76,3]                   | 70,3 [66,6; 74,7]                |
| p <sub>1</sub> |                               |                                     |                                  |
| p <sub>2</sub> |                               |                                     |                                  |
| TMA, мин       | 47,7 [40,8; 53,5]             | 50,7 [49,8; 57,6]                   | 41,8 [38,5; 46,1]                |
| p <sub>1</sub> |                               |                                     |                                  |
| p <sub>2</sub> |                               |                                     | 0,001                            |
| G, Kd/sc       | 14,7 [12,6; 16,5]             | 13,6 [11,4; 16,1]                   | 11,9 [10,0; 14,7]                |
| p <sub>1</sub> |                               |                                     |                                  |
| p <sub>2</sub> |                               |                                     |                                  |
| MRTG, мм/мин   | 6,55 [4,83; 9,41]             | 5,81 [4,86; 6,32]                   | 7,08 [5,39; 8,00]                |
| p <sub>1</sub> |                               |                                     |                                  |
| p <sub>2</sub> |                               |                                     |                                  |
| TMRTG, мин     | 21,7 [16,1; 27,3]             | 24,2 [23,1; 27,5]                   | 17,9 [14,3; 25,7]                |
| p <sub>1</sub> |                               | <0,05                               |                                  |
| p <sub>2</sub> |                               |                                     | 0,043                            |

Примечание: числовое значение p приведено как показатель достоверности различий: p<sub>1</sub> – по сравнению с группой женщин со средней чувствительностью к SIN-1; p<sub>2</sub> – между группами со стимулирующим и угнетающим действием SIN-1

По результатам наших данных установлено снижение уровня e-NOS в подгруппе небеременных женщин с угнетающим действием SIN-1 на свертывание плазмы крови по сравнению с женщинами из подгруппы со средним действием NO, что составило соответственно 3,28 нг/мл [3,05; 3,32] и 3,68 нг/мл [3,55; 3,77].

Анализ полученных данных показывает, что среди небеременных и беременных женщин донатор оксида азота SIN-1 оказывает модулирующее действие на свертывание богатой тромбоцитами плазмы крови. Так у женщин в подгруппе с угнетающим действием SIN-1 наблюдается тенденция к гиперкоагуляции по значению показателей ТЭГ по сравнению с другими подгруппами. Возможно, это связано с более сильной активностью ферментных систем плазмы на стадии инициирования и усиления коагуляции. Повышенная максимальная амплитуда у небеременных женщин в подгруппе с угнетающим действием SIN-1 указывает на усиление функциональной активности тромбоцитов. При этом отсутствие различий в показателях МА среди подгрупп беременных женщин свидетельствует о повышении функциональной активности тромбоцитов у всех здоровых беременных женщин.

### **Выводы**

1. У женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации установлено снижение уровня эндотелиальной синтазы оксида азота, суммарных нитратов и нитритов, циклического гуанозинмонофосфата, а также повышение содержания адреналина и норадреналина в периферической крови по сравнению с небеременными женщинами.

2. Выявлено снижение тромбоцитарного фактора 4 в периферической крови у женщин с нормально протекающей беременностью в срок гестации 38-40 недель по сравнению с небеременными женщинами. Содержание  $\beta$ -тромбоглобулина в изучаемых группах женщин не различается.

3. У небеременных женщин и женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации отмечено снижение агрегации тромбоцитов, индуцированной адреналином и АДФ, под влиянием донатора оксида азота SIN-1 *in vitro*. В группе беременных женщин установлено менее выраженное снижение максимальной степени агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, под влиянием донатора оксида азота SIN-1 *in vitro* по сравнению с небеременными женщинами. Различий между группами женщин в снижении максимальной степени агрегации тромбоцитов, индуцированной адреналином, не наблюдается.

4. У женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации и небеременных женщин по данным тромбоэластографии донатор SIN-1 *in vitro* приводит к снижению времени достижения максимальной амплитуды TMA, усилению лизиса сгустка

LY30; у беременных женщин также вызывает уменьшение времени начала образования сгустка R, времени наступления максимальной скорости образования сгустка TMRTG, увеличение значения угла  $\alpha$ . У беременных женщин добавление адреналина в плазму богатую тромбоцитами *in vitro* приводит к достоверному укорочению времени K, времени наступления максимальной амплитуды TMA, увеличению угла  $\alpha$ , усилению лизиса LY30 по сравнению с небеременными женщинами. У женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации и небеременных женщин сочетанное введение SIN-1 и адреналина в богатую тромбоцитами плазму крови *in vitro* приводит к снижению времени достижения максимальной амплитуды TMA, усилению лизиса сгустка LY30, а также дополнительно в группе беременных женщин – к снижению времени начала образования сгустка R, интервала K, времени наступления максимальной скорости формирования сгустка TMRTG, максимальной амплитуды MA, плотности сгустка G, повышению угла  $\alpha$ .

5. У беременных женщин добавление адреналина в плазму богатую тромбоцитами *in vitro* вызывает увеличение значения угла  $\alpha$  в тромбозластограмме в отличие от небеременных женщин, у которых этот показатель снижается. Сочетанное добавление SIN-1 и адреналина в богатую тромбоцитами плазму крови *in vitro* приводит к более выраженному снижению времени начала образования сгустка R, времени достижения максимальной амплитуды TMA у беременных женщин по сравнению с небеременными; а также вызывает снижение времени наступления максимальной скорости формирования сгустка TMRTG в группе беременных женщин и повышение его у небеременных женщин.

6. В группе беременных женщин достоверно чаще встречаются женщины со сниженной чувствительностью к оксиду азота (по данным агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ) по сравнению с небеременными женщинами.

7. У небеременных женщин со сниженной чувствительностью тромбоцитов к донатору оксида азота наблюдается сниженный уровень цГМФ и адреналина в крови по сравнению с женщинами со средней чувствительностью, а у беременных женщин данные показатели между изучаемыми подгруппами не различаются. У беременных женщин с повышенной чувствительностью тромбоцитов к SIN-1 имеет место: повышение степени агрегации тромбоцитов с адреналином по сравнению с женщинами в подгруппах со средней и сниженной чувствительностью; увеличение уровня e-NOS по сравнению с женщинами со средней чувствительностью. Уровень  $\beta$ -тромбоглобулина повышен у беременных женщин со сниженной чувствительностью тромбоцитов к SIN-1 по сравнению с женщинами из подгруппы средней реакции на данный донатор. У небеременных женщин данные показатели между изучаемыми подгруппами не различаются.

8. У женщин с угнетающим действием донатора оксида азота SIN-1 отмечается более сильный коагуляционный потенциал по данным тромбозластографии: у женщин с нормально протекающей беременностью в 38-40 недель гестации по показателям R, TMA, TMRTG; у небеременных женщин по показателям R, K, MA, TMA, G, MRTG, TMRTG. В подгруппе небеременных женщин с угнетающим действием SIN-1 на свертывание плазмы крови по сравнению с женщинами из подгруппы со средним действием установлено снижение уровня e-NOS. В группе беременных женщин различия не обнаружены.

**Практические рекомендации.** Установленные индивидуальные особенности чувствительности тромбоцитов к действию донатора SIN-1 могут служить теоретической основой для разработки персонифицированных подходов к лечению осложнений беременности с использованием препаратов этой группы в клинической практике. Рекомендовано использовать в лабораторной практике разработанные границы нормы для лабораторных показателей e-NOS, цГМФ для небеременных и беременных женщин в срок гестации 38-40 недель.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

*Публикации в журналах, включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации научных результатов диссертаций*

1. Особенности изменения уровней гуморальных факторов, регулирующих систему гемостаза, в поздние сроки физиологической беременности / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, Г.Н. Кузьменко, И.Г. Попова, О.Г. Ситникова, Е.Л. Бойко, Н.В. Харламова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – 63 (6). – С. 368-371.
2. Взаимосвязь содержания адреналина и цГМФ и чувствительности тромбоцитов к действию оксида азота у здоровых женщин / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, И.Г. Попова, Г.Н. Кузьменко, О.Г. Ситникова // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2016. – № 4 (68). – С. 48-50.
3. Индивидуальные особенности изменения показателей свертывания крови у небеременных и беременных женщин под влиянием оксида азота *in vitro* / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, Г.Н. Кузьменко, О.Г. Ситникова // Таврический медико-биологический вестник. – 2016. – Т. 19, № 4. – С. 38-41.
4. Влияние донатора оксида азота и адреналина на гемокоагуляцию и его особенности у женщин в поздние сроки беременности / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, Г.Н. Кузьменко, О.Г. Ситникова, И.Г. Попова, А.И. Малышкина // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2015. – № 4 (64). – С. 59-62.
5. Особенности действия донатора оксида азота SIN-1 на состояние гемостаза при физиологической беременности *in vitro* / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, Г.Н. Кузьменко, О.Г.

Ситникова, И.Г. Попова // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – № 3 (49). – С. 103-104.

*Публикации в журналах, сборниках, материалах конференций и тезисы докладов*

6. Клычева М.М. Влияние цГМФ на агрегацию тромбоцитов с донатором оксида азота *in vitro* / М.М. Клычева, С.Б. Назаров // Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека: материалы III Всероссийской образовательно-научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. В 2 тт. Т. 1. – Иваново, 2017. – С. 14.
7. Клычева М.М. Факторы регуляции агрегации тромбоцитов в поздние сроки беременности / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, И.Г. Попова // Трансляционная медицина. – 2017. – Приложение № 2. – С. 13.
8. Клычева М.М. Особенности изменения e-NOS, NOx и цГМФ при физиологической беременности // Роль молодежи в развитии медицинской науки: материалы научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием. Душанбе, 2017. – С. 435-436.
9. Клычева М.М. Особенности тромбоэластограммы женщин в зависимости от индивидуальной чувствительности к оксиду азота *in vitro* / М.М. Клычева, С.Б. Назаров // Микроциркуляция и гемореология (посвященная 100-летию со дня рождения академика Алексея Михайловича Чернуха): материалы XI международной конференции. Ярославль, 2017. – С. 22.
10. Клычева М.М. Индивидуальные особенности изменения показателей свертывания крови у женщин под влиянием оксида азота *in vitro* / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, Г.Н. Кузьменко // Новая наука: проблемы и перспективы: международное научное периодическое издание по итогам международной научно-практической конференции. В 3 ч. Ч. 3. – Стерлитамак: РИЦ АМИ, 2016. – С. 5-7.
11. Клычева М.М. Индивидуальные особенности изменения показателей тромбоэластограммы у женщин под влиянием донатора оксида азота *in vitro* // Медицинская наука: достижения и перспективы: материалы научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием. – Душанбе, 2016. – С. 340.
12. Клычева М.М. Индивидуальные особенности чувствительности тромбоцитов к действию оксида азота у небеременных и беременных женщин / М.М. Клычева, С.Б. Назаров // Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека»: материалы межрегиональной научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. В 2 тт. Т. 1. – Иваново, 2016., С. 3-4.

13. Некоторые особенности NO-зависимой регуляции свертывания крови при физиологической беременности / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, Г.Н. Кузьменко, И.Г. Попова // Трансляционная медицина. – 2016. – Приложение № 4. – С. 20.
14. Зависимость эффектов донаторов оксида азота от эндотелиальной NO-синтазы у небеременных и беременных женщин *in vitro* / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, И.Г. Попова, Г.Н. Кузьменко, О.Г. Ситникова // Актуальные вопросы акушерства, гинекологии, неонатологии и педиатрии: сб. науч. тр., посвященный 35-летию со дня основания института / под ред. А.И. Малышкиной, С.Б. Назарова. – Иваново: «Изд-во МИК», 2015. – С. 59-62.
15. Клычева М.М. Особенности факторов регуляции свертывания крови при физиологической беременности / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, И.Г. Попова // Микроциркуляция и гемореология (Клиника и эксперимент: из лаборатории к постели больного): материалы X международной научной конференции. – Ярославль, 2015. – С. 82.
16. Особенности фармакодинамики донатора оксида азота у беременных женщин *in vitro* / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, Г.Н. Кузьменко, О.Г. Ситникова, И.Г. Попова // Достижения современной фармакологической науки: сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием, посвященной 150-летию со дня рождения академика Н.П. Кравкова / под ред. Е.Н. Якушевой. – Рязань, 2015. – С. 137-140.
17. Клычева М.М. Особенности изменения показателей тромбоэластограммы у беременных женщин при введении SIN-1 *in vitro* // «Неделя науки – 2013»: материалы 93-й ежегодной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Иваново, 2013. – С. 25.
18. Сравнительная характеристика изменений гемокоагуляции под влиянием донатора оксида азота и адреналина у беременных и небеременных женщин / М.М. Клычева, С.Б. Назаров, О.Г. Ситникова, Г.Н. Кузьменко, И.Г. Попова // Микроциркуляция и гемореология (от ангиогенеза до центрального кровообращения): материалы IX международной конференции. – Ярославль, 2013. – С. 25.
19. Клычева М.М. Влияние адреналина и SIN-1 на показатели тромбоэластограммы у практически здоровых женщин *in vitro* // Актуальные проблемы, медицинские и организационные технологии охраны репродуктивного здоровья семьи: сб. науч. статей. – Иваново, 2012. – С. 193-195.