

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

*На правах рукописи*

Голубков  
Вадим Валерьевич

ЗАВИСИМОСТЬ РИСКА РАЗВИТИЯ  
ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ОТ ГРУППЫ  
КРОВИ СИСТЕМЫ АВО

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор  
Семинский Игорь Жанович

Иркутск – 2014

## Оглавление

	стр.
<b>Введение.....</b>	<b>4</b>
<b>Глава 1.           Краткие сведения о распространенности и патогенезе ишемического инсульта, методах исследования электрических свойств эритроцитов, группах крови АВО (обзор литературы).....</b>	<b>10</b>
1.1. Общие вопросы этиологии ишемического инсульта.....	10
1.2. Патогенез ишемического инсульта.....	12
1.3. Ишемический инсульт и церебральный атеросклероз.....	15
1.4. Краткая характеристика системы гемостаза.....	17
1.5. Агрегация форменных элементов крови.....	22
1.6. Электрокинетические исследования.....	25
1.6.1. Общие положения.....	25
1.6.2. Вариабельность электрофоретической подвижности эритроцитов.....	29
1.6.3. Индуцированная агрегация эритроцитов.....	30
1.7. Понятие о группах крови системы АВО.....	32
1.8. Ассоциация групповой принадлежности крови с заболеваниями.....	33
1.9. Резюме.....	37
<b>Глава 2.           Материалы и методы исследования.....</b>	<b>38</b>
1.1. Индуцированная агрегация эритроцитов.....	39
1.2. Используемое оборудование.....	40
1.3. Забор материала.....	40
1.4. Подготовка эритроцитов.....	41
1.5. Подготовка раствора хлористого лантана.....	41
1.6. Методика исследования.....	41
1.7. Оценка результатов.....	42
2.0 Электрофоретическая подвижность эритроцитов.....	42
2.1 Используемое оборудование.....	42
2.1.1 Общее оборудование.....	42

2.1.2	Электрофоретическая ячейка.....	43
2.1.3	Электрическая схема.....	43
2.1.4	Фиксация результатов.....	44
2.2.	Забор крови.....	44
2.3.	Подготовка эритроцитов.....	44
2.4.	Техника опыта.....	45
2.5.	Оценка результатов.....	45
3.0.	Исследование частоты встречаемости разных групп крови у пациентов, перенесших ишемический инсульт.....	46
3.1.	Подбор пациентов.....	46
3.2.	Использованное оборудование.....	46
3.3.	Оценка результатов.....	47
4.0.	Изучение параметров гемостаза у пациентов, перенесших ишемический инсульт.....	47
4.1.	Подбор пациентов.....	47
4.2.	Использованное оборудование.....	47
4.3.	Оценка результатов.....	48
Глава 3	Результаты и обсуждение.....	49
Глава 4	Заключение.....	88
	Выводы.....	94
	Практические рекомендации.....	95
	Литература.....	96

## Введение

Ишемическим инсультом называется клинический синдром, который проявляется острым нарушением локальных функций мозга, продолжающимся более суток, или приводящим к смерти за счет недостаточности кровообращения в определенной зоне мозга в результате снижения мозгового кровотока, тромбоза или эмболии, связанных с заболеваниями сердца, сосудов или крови.

Ежегодно в мире от ишемического инсульта умирают несколько миллионов человек, так, в Российской Федерации, ежегодно происходит около полумиллиона случаев ишемического инсульта. Ранняя 30-дневная летальность после инсульта достигает 34%, и до 40% в течение первого года заболевания. [11, 15]

У пациентов, выживших после инсульта, вероятность развития повторного нарушения мозгового кровообращения достигает 30%. Аналогичному риску подвержены и пациенты, перенесшие транзиторные ишемические атаки. Для повторных инсультов характерна более высокая летальность, чем при первичных. [46]

Заболеваемость ишемическим инсультом в 4 раза превышает частоту геморрагического инсульта. В процентном отношении доля ишемических инсультов среди острых нарушений мозгового кровообращения, достигает 80%. Остальные случаи приходятся на внутримозговое кровоизлияние и субарахноидальное кровоизлияние. [14]

Ежегодная смертность от инсультов в России считается одной из наиболее высоких в мире. Инсульт является ведущей причиной стойкой утраты трудоспособности среди населения, старше 60 лет. Около 30% перенесших его пациентов нуждаются в посторонней помощи, еще 20% не могут самостоятельно ходить, и лишь каждый пятый может вернуться к трудовой деятельности. Частым осложнением перенесенного инсульта является депрессивный синдром, который может продолжаться длительное время и затруднять реабилитацию пациента. [13, 39, 57]

Даже в случае своевременно и грамотно проведенного лечения, лишь каждый пятый перенесший ишемический инсульт может вернуться к полноценной трудовой деятельности. [6, 13]

В зависимости от патогенеза, выделяют несколько подтипов ишемического инсульта: кардиоэмболический, атеротромботический, лакунарный и др. Наиболее часто у пациентов встречается ишемический атеротромботический инсульт. После 65 лет он наблюдается в 75% случаев данного заболевания. Причиной этого подтипа инсульта является первичная тромботическая окклюзия церебральной артерии на фоне атеросклеротических изменений. [12, 24, 27, 51]

В настоящее время активно изучаются механизмы генетической предрасположенности к развитию ишемического инсульта, поскольку данный фактор риска является перманентным, который, как и прочие: возраст, пол, этническая принадлежность, невозможно модифицировать. Генетически обусловленными могут быть функционирование эндотелия, системы липидного и гомоцистеинового обмена, механизмы вазоконстрикции и вазодилатации, активность РААС. Фенотипически, данные факторы могут проявиться в повышенной склонности к развитию атеросклероза, или как дефект свертывающей и противосвертывающей систем крови. Дальнейшие исследования данного вопроса, несомненно, имеют значение в плане разработки индивидуальных методов профилактики и лечения. [25, 47, 55]

К числу генетически обусловленных факторов риска ишемического инсульта заболеваний можно отнести и групповую принадлежность крови. Взаимосвязь групп крови АВО и риска развития различных заболеваний не отрицается различными авторами и обоснована многочисленными исследованиями на эту тему.

Так, процент лиц с А группой крови среди пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией, достоверно выше в сравнении со здоровыми индивидуумами. Некоторые исследователи связывали этот факт с повышенным содержанием холестерина в крови у носителей типоспецифичного антигена А. [17, 32, 44, 98]

Люди с O группой крови более уязвимы для холеры, вследствие отсутствия у них специфических защитных антигенов, препятствующих адгезии холерных токсинов. В то же время, риск тромбозов, облитерирующего атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний менее всего ассоциирован с данной группой крови. [62, 67, 105, 108]

Ряд злокачественных опухолей экспрессирует антигены, подобные типоспецифичному для A группы крови, что приводит к нарушению иммунного ответа организма. Вследствие этого, носители данного фенотипа ABO чаще страдают раком желудка, легких, яичников. [68, 73, 106, 127]

По данным сравнительного исследования, болезнь Паркинсона достоверно чаще встречалась среди лиц-носителей антигена B, а ишемический инсульт тромбозомболического и атеротромботического подтипов – антигена AB. [116, 160]

В настоящее время повышенный риск развития кардио- и цереброваскулярных заболеваний у лиц с определенной группой крови связывается с различной активностью факторов свертывания крови. Например, уровень факторов VIII, XIII и Виллебранда у людей с O группой крови меньше, чем для других групп крови. Для этой же группы характерна относительно быстрая активация фибринолиза. [62, 157, 161]

Между тем, на процессы свертывания крови, за счет варибельности агрегации форменных элементов, могут влиять электрические свойства клеток и тканей. Наличие отрицательного электрического заряда у эритроцитов, обеспечивающего, в частности, несоприкасаемость клеток в кровотоке, доказано различными независимыми исследователями. Электрический заряд эритроцитов формируется за счет расположенных на его поверхности молекул сиаловой кислоты. В различных экспериментах, удаление сиаловых кислот с поверхности эритроцита приводило к самопроизвольной или легко индуцируемой крупномолекулярными белками агрегации. [59, 60, 71, 92, 93, 119, 143]

Было установлено, что электрический заряд эритроцитов не является стабильной величиной. Достаточно значимое снижение электрического заряда

происходит при старении эритроцита, осаждении на его поверхности различных веществ, и при ряде заболеваний. [22, 88, 124, 130]

Эритроциты, как наиболее многочисленная клеточная фракция в кровотоке, имеют большое значение в процессах свертывания крови. Исследование электрических свойств эритроцитов, по данным литературных источников, проходит параллельно изучению зависимости различных заболеваний от группы крови, без существенных точек соприкосновения. Между тем, ряд патологических процессов, протекающих в организме в составе синдрома ишемического инсульта возможно объяснить с позиций неодинаковой склонности к агрегации эритроцитов разных групп крови АВО. Поскольку агрегация форменных элементов крови, в том числе и эритроцитов, кроме прочих факторов, зависит от величины электрического заряда, в настоящей работе предпринята попытка выявить различия в электрическом заряде между эритроцитами различных групп крови АВО.

***Целью настоящего исследования является:***

Выяснение влияния групповой принадлежности крови по системе АВО на риск развития ишемического атеротромботического инсульта за счет различий в электрическом заряде эритроцитов.

Для достижения вышеуказанной цели были поставлены и решены следующие ***основные задачи:***

1. Выяснение частоты встречаемости фенотипов АВО среди пациентов с ишемическим атеротромботическим инсультом.
2. Определение различий в значениях лабораторных показателей свертывания крови у пациентов с ишемическим инсультом (ПТВ, МНО, АПТВ).
3. Установление различий в величине электрического заряда эритроцитов разных групп крови АВО.
4. Уточнение роли электрических свойств эритроцитов в патогенезе ишемического инсульта.

***Научная новизна исследования:***

— Установлено различие в электрическом заряде внешней поверхности эритроцитов разных групп по системе АВО: наивысший электрический заряд характерен для В и АВ групп крови, а наименьший - для О группы крови.

— Установлено преобладание фенотипа В группы крови системы АВО, у пациентов с ишемическим тромботическим инсультом.

— Разработано теоретическое обоснование повышенному риску развития ишемического атеротромботического инсульта у лиц с В и АВ фенотипом системы групп крови АВО.

***Практическая значимость исследования*** заключается в том, что полученные результаты могут быть использованы в дальнейших работах по изучению электрических свойств клеток и тканей, а также для предварительной оценки риска возникновения инсульта, частоты профилактических и диагностических мероприятий в отношении конкретных людей.

***Положения, выносимые на защиту:***

1. Риск развития ишемического атеротромботического инсульта выше для людей с В группой крови, системы групп крови АВО

2. Величина электрического заряда эритроцитов зависит от групповой принадлежности крови системы АВО. Наибольший электрический заряд свойственен эритроцитам В и АВ групп крови

3. Генетически обусловленные различия в электрическом заряде эритроцитов системы АВО влекут за собой особенности их агрегационной устойчивости в кровотоке, что служит дополнительным фактором риском развития острого нарушения мозгового кровообращения ишемического характера.

***Апробация работы:*** Основные материалы диссертации были представлены: на Международной научно-практической конференции «Актуальные научные проблемы. Рассмотрение. Решение. Практика» (Польша, Вроцлав, 2014); IV Международной научно-практической конференции «Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития» (Краснодар, 2014); Международной научно-практической конференции «Роль медицины в развитии общества» (Уфа, 2014);



Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины» (Уфа, 2014).

***Личный вклад автора:***

Автором самостоятельно выполнена работа по анализу литературных источников, сбору материалов и данных для проведения собственных исследований, планированию и исполнению экспериментальных методик. Произведено обобщение полученных результатов, оформлены выводы и заключение диссертационного исследования, подготовлены публикации в научной литературе.

***Публикации:***

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 - в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки.

***Структура и объем диссертации:***

Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав с изложением собственных результатов исследования, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы, содержащего 65 отечественных и 96 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 8 рисунками, 6 таблицами, 1 схемой.

## Обзор литературы

### 1.1 Общие вопросы этиологии ишемического инсульта

Согласно существующей в настоящее время классификации (РАМН, 2000г.), ишемический инсульт подразделяют на несколько подтипов, соответственно этиологии их возникновения.

- Атеротромботический
- Кардиоэмболический
- Гемодинамический
- Лакунарный
- Гемореологический

*Кардиоэмболический* инсульт развивается на фоне патологии сердца и сердечных клапанов, и составляет около 40% от общего количества ишемических инсультов. Наиболее частыми причинами, приводящими к возникновению кардиоэмболического инсульта, считаются: заболевания клапанов сердца, в том числе протезирование, острый инфаркт миокарда, инфекционный эндокардит, мерцательная аритмия. Подобный подтип ишемического инсульта имеет высокую склонность к рецидивам, причем они могут возникать каждый раз в разном сосудистом бассейне. В клинической практике, нарушение ритма сердца значительно ухудшает прогноз выживаемости среди пациентов, проходящих стационарное лечение по поводу острого нарушения мозгового кровообращения. [126]

Поражение мелких перфорирующих ветвей средней мозговой артерии, задней мозговой артерии и базилярной артерии с развитием небольших очагов некроза – лакун, в глубинных отделах головного мозга приводит к развитию т.н. *лакунарного* инсульта. Величина ишемического очага в головном мозге при данном подтипе инсульта составляет от 0,1 см и менее до 1,5-2,0 см. Как правило, при развитии лакунарного инсульта не отмечается нарушения корковых функций.

Повышение вязкости крови, нарушение свертывания крови за счет разнообразных гематологических нарушений, таких как: тромбоцитопеническая пурпура, ДВС-синдром, полицитемия, могут привести к развитию острых артериальных тромбозов, в том числе, и в церебральных артериях. Такой подтип инсульта носит название *гемореологической микроокклюзии*.

*Гемодинамический* инсульт часто возникает на фоне атеросклеротического изменения стенок церебральных артерий, ремоделировании сердечно-сосудистой системы вследствие длительно существующей артериальной гипертензии. В подобных условиях даже небольшое снижение сердечного выброса или изменение уровня артериального давления, может привести к ишемии в зонах смежного кровоснабжения передней, средней и задней мозговых артерий. Иногда, подобные нарушения мозгового кровообращения возникают по механизму "обкрадывания" – ишемии участка головного мозга вследствие отвлечения крови в другие сосудистые бассейны, через систему анастомозов.

Наиболее тяжелым и наиболее часто встречающимся подтипом инсульта в пожилом возрасте считается ишемический *тромботический* инсульт. После 65 лет он наблюдается в 75% случаев данного заболевания. Данный подтип инсульта развивается в результате острого тромбоза церебральных артерий, измененных вследствие атеросклероза. Как правило, к моменту развития инсульта степень окклюзии церебральных артерий достигает 50% и более. Нередко, возникновению острого нарушения церебрального кровообращения подобного подтипа предшествуют транзиторные ишемические атаки в проблемном артериальном бассейне. [6, 12, 24, 27, 51]

Причины, приводящие к развитию ишемического инсульта неодинаковы для разных возрастных групп населения. Так, в молодом возрасте (18-45 лет) по данным исследования, проводившегося в Научном центре неврологии РАМН, частота встречаемости ишемического инсульта составляла 14%, в сравнении с внутримозговыми кровоизлияниями, а ведущими причинами его развития авторами признавались диссекция мозговых артерий (25%), кардиогенная эмболия (12%) и антифосфолипидный синдром (11%). В противоположность

этому, в пожилом и старческом возрасте частота встречаемости ишемического инсульта значительно возрастает (до 80%) и среди причин, приводящих к развитию ишемического инсульта, приоритетными являются: атеросклероз церебральных артерий, артериальная гипертензия и сочетание этих двух факторов. [16, 21]

Среди женщин отмечается меньшая частота развития ишемического инсульта, если проводить сравнение в одинаковых возрастных группах с мужчинами. Однако, при возникновении ишемического инсульта у женщин чаще развиваются тяжелые и стойкие нарушения функций. [129]

Общепризнанными факторами риска развития ишемического инсульта считаются: артериальная гипертензия, курение, заболевания сердца, гиподинамия, сахарный диабет, дисбаланс липидов крови, ожирение, повышение уровня гомоцистеина в крови. Выделяют также реализующие факторы, т.е. такие, которые могут спровоцировать развитие ишемического инсульта на фоне существующих факторов риска и изменений в сердечно-сосудистой системе. Из основных реализующих факторов имеют значение такие как: психо-эмоциональный стресс, физические перегрузки, обильная еда, прием алкоголя. Различные факторы риска возникновения мозгового инсульта редко действуют изолированно, чаще наблюдается их совместное воздействие. [109, 120, 139]

Любой подтип ишемического инсульта является угрожающим жизни состоянием, с частым наступлением стойкой утраты трудоспособности вследствие парезов и параличей конечностей, нарушений координации движений, речи и пр.

## **1.2 Патогенез ишемического инсульта**

В норме, мозговой кровоток составляет  $50-55\text{мл}/100\text{г}/\text{мин}^{-1}$  для здорового человека. Критическим порогом, после которого наступает необратимое повреждение клеток, считается  $10\text{мл}/100\text{г}/\text{мин}^{-1}$ . В организме существует система ауторегуляции мозгового кровотока, обеспечивающая достаточный

энергетический обмен в клетках при колебаниях среднего АД в диапазоне 60-160мм.рт.ст. для поддержания нормальной перфузии тканей головного мозга. Ведущим механизмом ауторегуляции, обеспечивающим нормальную перфузию тканей головного мозга, является изменение просвета кровеносных сосудов, под влиянием вегетативной иннервации, нейромедиаторов, изменений рН среды, и увеличения сосудистой резистентности в ответ на повышение АД.

Снижение величины мозгового кровотока в результате различных причин, из которых наиболее часто встречается закупорка кровеносного сосуда тромботическими массами, приводит к гипоксии с последующим повреждением клеточных мембран и гибели нейронов и клеток нейроглии. Немаловажную роль в поддержании нормального кровообращения головного мозга играют эритроциты. Способность мембраны эритроцита к деформации играет важную роль в капиллярах меньшего диаметра, чем диаметр эритроцита (менее 7мкм). В более крупных сосудах значение имеют скорость эритроцитов и устойчивость их к агрегации в сосудистом просвете. Считается, что пластичность мембраны эритроцита уменьшается в процессе его старения, а также зависит от рН цитоплазмы и окружающей среды. **[56 99, 102]**

У пациентов с ишемическим инсультом, а также при начальных проявлениях недостаточности мозгового кровообращения наблюдается повышение вязкости крови, гематокрита, и усиление агрегации форменных элементов крови. Указанные изменения не всегда связаны с нарушением функции тромбоцитов. Установлено, что агрегация эритроцитов изменяется чаще, чем вязкость крови и агрегация тромбоцитов, и зависит от значения гематокрита. Изменение электрического заряда на поврежденном участке сосуда приводит к адгезии и агрегации всех форменных элементов крови, в том числе, эритроцитов. **[5, 10]**

Недостаток кислорода в тканях головного мозга, возникающий вследствие снижения или полного прекращения кровотока, приводит к переходу клеток на анаэробный путь утилизации глюкозы. Развивается метаболический ацидоз, за

счет избытка молочной кислоты, гидролиза АТФ и под воздействием прочих факторов, снижающих утилизацию  $H^+$  за счет снижения синтеза АТФ.

Кроме того, избыток водородных ионов тормозит гликолиз за счет ингибирования ключевых ферментов, и ведет к необратимому энергетическому дефициту. Резкое снижение рН крови в раннем постишемическом периоде является неблагоприятным прогностическим признаком. Ацидоз и дефицит АТФ приводят к повышению проницаемости клеточных мембран, нарушению работы мембранных белков-переносчиков, в результате чего в клетку поступает избыточное количество ионов кальция из межклеточного матрикса.

Необходимо отметить, что содержание кислорода в тканях даже в условиях выраженной ишемии остается значительным, что делает возможным активацию перекисного окисления липидов. Активные формы кислорода могут вырабатываться при гипоксии вследствие метаболических реакций арахидоновой кислоты, а также за счет фагоцитов, мигрирующих в область ишемии и воспаления. Кроме прочего, источниками свободных радикалов кислорода являются восстановленные ионы  $Fe^{2+}$  и высвобожденный из митохондрий цитохром С. На фоне развивающегося ацидоза процессы перекисного окисления протекают ускоренно, провоцируя развитие т.н. оксидантного стресса. Накопление свободных радикалов приводит к дальнейшему повреждению клеточной мембраны и митохондрий.

Наступающая вследствие ионного дисбаланса деполяризация мембран, главным образом аксонов глутаматергических нейронов, приводит к поступлению в синаптическую щель большого количества эксайтотоксичных аминокислот (глутамат, аспартат). Данные аминокислоты активируют в постсинаптических нейронах глутаматные рецепторы NDMA-типа, вследствие чего еще больше возрастает внутриклеточная концентрация ионов кальция, которые переходят в активную форму посредством соединения с внутриклеточным рецептором кальмодулином. Этот процесс вызывает активацию ряда внутриклеточных ферментов: фосфолипаз, протеинкиназ, эндонуклеаз, что, в свою очередь,

приводит к множественным повреждениям биомакромолекул и реализации механизмов апоптоза.

Немаловажное значение в процессах повреждения клеток головного мозга при снижении перфузии отводится местной воспалительной реакции за счет активации лейкоцитов, высвобождения провоспалительных цитокинов. [11, 12]

### **1.3 Ишемический инсульт и церебральный атеросклероз**

Тромбозу, приводящему к развитию ишемического инсульта, нередко предшествуют патологические изменения стенок артерий, основной причиной которых является атеросклероз. Данное патологическое состояние более характерно для лиц старшей возрастной группы. Существует несколько теорий в отношении причин развития атеросклероза, среди которых: генетическая предрасположенность, нарушение метаболизма, образ жизни, хронический стресс. Рассматривается возможность влияния некоторых бактерий, таких как хламидии, на возможность развития атеросклероза. Немалое значение придается нарушению соотношения липопротеидов плазмы крови, преобладанию фракций с низкой плотностью. Тем не менее, единого мнения, объясняющего точные и применимые к большинству случаев предпосылки для развития атеросклероза, в настоящее время не существует. [1]

В начальной стадии развития атеросклероза происходят изменения интимы сосудистой стенки по типу повреждения эндотелия, межучной ткани, повышения проницаемости эндотелиальных клеток. По мере прогрессирования патологического процесса в интимае сосудов накапливаются липиды низкой плотности в комплексе с иммуноглобулинами, происходит трансформация гладкомышечных клеток интимы в ксантомные. Данная стадия носит название липоидоза.

Липосклероз, следующая стадия развития атеросклероза начинается с прогрессирования гипоксии в области измененной интимы сосуда. Это приводит к некротическим изменениям в стенке сосуда, микрогеморрагиям.

Реваскуляризация поврежденного сегмента сосуда и образование молодой соединительной ткани приводит к отграничению липидного ядра от просвета сосуда. Возникают фиброзные атеросклеротические бляшки, которые могут кальцинироваться с течением времени. Подобный тип бляшек носит название стабильных, поскольку длительное время они могут существовать практически бессимптомно, не проявляя тенденции к увеличению. Просвет пораженного сосуда может быть сужен на незначительную в отношении гемодинамики величину.

Наиболее опасны в отношении развития тромбозов т.н. осложненные атеросклеротические бляшки. Их появление провоцируется значительным увеличением липидного ядра (до 30% и более от общего объема бляшки), возникновением кровоизлияний в бляшку, истончением ее фиброзной капсулы и разрушением покрышки с образованием трещин и разрывов. При повреждении сосудистой стенки нарушаются защитные свойства эндотелия и реализуются механизмы вазоконстрикции, адгезии и агрегации форменных элементов. Физико-химическая сущность процесса заключается в изменении электрического заряда сосудистой стенки и клеток крови, повышении адгезивно-агрегационной способности тромбоцитов. [7, 20, 38, 58]

Здесь стоит отметить, что у людей в возрасте 50-60 лет, за счет снижения синтетической функции печени происходит изменение продукции факторов свертывающей и противосвертывающей систем. Так, физиологической особенностью системы гемокоагуляции в пожилом и старческом возрасте является повышение концентрации фибриногена, тромбина, и прочих факторов, способствующих усилению свертываемости крови. Наряду с этим значительно снижается концентрация антитромбинов II и III. [8]

Прогрессирование атеросклероза приводит к усугублению имеющихся нарушений свертывания крови, повышению содержания фактора Виллебранда в плазме крови, снижению защитных свойств эндотелия. Тем не менее, подобные нарушения могут длительное время существовать латентно, провоцируясь воздействием внешнего фактора, к примеру, т.н. «метаболического синдрома», в



состав которого входят: гиперлипидемия, артериальная гипертония, нарушение толерантности к глюкозе, гиперурикемия и др. Течение атеросклероза, как правило, носит характер волнообразного, с периодами стабилизации, сменяющимися быстрым прогрессированием.[37, 52, 150]

Таким образом, атеросклеротическое поражение артерий реализует такие патофизиологические предпосылки для возникновения тромбоза, как повреждение клеточной стенки, нарушение ламинарного кровотока, дисбаланс между свертывающей и противосвертывающей системами крови. Данные нарушения создают условия для образования тромбоцитарных и эритроцитарных агрегатов как в микроциркуляторном русле, так и в крупных артериях, пораженных атеросклерозом. [29, 41, 56]

#### **1.4 Краткая характеристика системы гемостаза**

Несомненно, что в патогенезе ишемического тромботического инсульта немаловажную роль играет состояние системы гемостаза.

В настоящее время, различают сосудисто-тромбоцитарный гемостаз и процесс гемокоагуляции. В первом случае речь идет об остановке кровотечения из мелких сосудов, а во втором, соответственно, из артерий и вен. Конечно, при повреждении кровеносного сосуда любого калибра оба механизма гемостаза функционируют одновременно, поэтому подобное подразделение можно считать условным.

Механизм гемокоагуляции можно разделить на три основные фазы:

- образование протромбиназы
- образование тромбина из протромбина
- образование фибринового сгустка

Образование тромбина может происходить по т.н. «внешнему» и «внутреннему» путям. Первый путь требует для своей активации наличие специфического белка, называемого тканевой фактор, который в норме отсутствует в тканях, появляясь лишь при повреждениях. Внутренний путь

образования тромбина начинается с контактной активации XII фактора и прекалликреина, и имеет мультипричинную активацию, т.е. может быть спровоцирован любым патологическим состоянием.

И внутренний и внешний пути активации протромбиназы завершаются образованием тромбина из протромбина, однако развитие процесса по внутреннему пути занимает в несколько раз больше времени, за счет большего количества стадий.

Внутренний путь свертывания крови начинается со связывания XII фактора с компонентами субэндотелия, активированными тромбоцитами и последующей его протеолитической активацией калликреином. Затем, XIIa фактор активирует XI фактор, который, в свою очередь способствует активации IX фактора в присутствии ионов кальция. Повреждение стенки кровеносного сосуда, например, за счет атеросклероза, сопровождается не только обнажением субэндотелия, но приводит к выделению тканевого фактора, и избыточному поступлению в клетки ионов кальция, что приводит к нарушению структуры мембраны, образованию «кластеров» на ее поверхности, к которым в последующем прикрепляются факторы свертывания крови. Активация фактора X протекает на поверхности мембран клеток, в присутствии ионов кальция, под действием фактора IXa.

При внешнем пути свертывания крови, тромбоциты, активированные контактом с субэндотелием, выделяют Va фактор. Образующийся в месте травмы тканевой фактор вступает в реакцию с VII фактором свертывания. Комплекс ТФ-VIIa активирует X и IX факторы, а в дальнейшем факторы Xa и Va в присутствии ионов кальция на поверхности субэндотелия образуют протромбиназу. Отмечалось снижение риска развития ишемического инсульта при врожденном дефиците XI фактора свертывания, за счет снижения образования тромбина. [142]

Оба пути активации X фактора: за счет XIIa фактора, или комплекса ТФ-VIIa фактор обладают примерно одинаковой эффективностью. Образованный фермент протромбиназа способствует переходу протромбина в активную форму – тромбин. Последний, в свою очередь, способствует переходу фибриногена в фибрин, за счет отщепления фибрин-пептидов от основной молекулы, и

активирует фактор XIII, стабилизирующий фибрин. Молекула фибриногена состоит из четырех углеводных цепей с остатками сиаловых кислот на концах. Отщепление сиаловых кислот ускоряет полимеризацию фибрина, а увеличение их количества, например, вследствие различных заболеваний, приводит к нарушению функции фибриногена, его взаимодействию с эритроцитами и тромбоцитами. Образовавшийся фибриновый сгусток со временем подвергается ретракции и, в последующем, фибринолизу под действием плазмина.

Противосвертывающая система состоит из ряда веществ, которые вырабатываются как генетически детерминированные компоненты организма (первичные антикоагулянты) или возникают в процессе свертывания крови (вторичные антикоагулянты).

Первичные антикоагулянты, постоянно содержатся в крови, их синтез в организме не зависит от активности системы свертывания в настоящий момент.

Вторичные антикоагулянты образуются в процессе гемокоагуляции и фибринолиза и являются результатом дальнейшей ферментативной деградации некоторых коагуляционных факторов; в силу чего они после изначальной активации теряют способность к участию в процессе свертывания крови и приобретают свойства антикоагулянтов.

Основные первичные антикоагулянты:

- Антитромбин III представляет собой белок, относится к серпинам. Основным местом синтеза антитромбина являются паренхиматозные клетки печени, в тоже время незначительное его количество синтезируется эндотелием. Выполняет роль основного плазменного кофактора гепарина, под влиянием которого трансформируется из прогрессивного антикоагулянта в ингибитор немедленного действия – антитромбин II. Антитромбин III является основным ингибитором тромбина и активных форм многих других плазменных факторов (Ха, IXa, XIa, XIIIa).

Низкая активность АТ-III в крови выявляется у больных инфарктом миокарда, сахарным диабетом, атеросклерозом, болезнями печени, острым

панкреатитом, тромбоэмболиями, возникающими в послеоперационном периоде, второй половине беременности, а также в период родов и послеродовом периоде.

- Гепарин представляет собой смесь полисульфатированных эфиров гликозаминогликанов. Синтезируется тучными клетками, ассоциированными с эндотелием. Является ингибитором поливалентного действия, который ограничивает все фазы гемокоагуляции. Как уже отмечалось, образуя комплекс с антитромбином III, трансформирует его в антикоагулянт немедленного действия, что приводит к повышению эффективности АТ III и подавлению образования и действия тромбина.

Гепарин также активирует фибринолиз, что способствует растворению тромбов, образует комплексы с плазмином, фибриногеном и адреналином, которые оказывают противосвертывающее и фибринолитическое действие.

К другим первичным физиологическим антикоагулянтам относят: протеин S, тромбомодулин, протеин C, C1-ингибитор, кофактор гепарина II,  $\alpha_2$ -макроглобулин и др.

Вторичные антикоагулянты:

- Антитромбин I (АТИ), который представляет собой фибрин, адсорбирующий и инактивирующий практически весь тромбин, образовавшийся в процессе гемокоагуляции; т.е. фактически АТ I функционирует как физиологический антикоагулянт.

- Антитромбопластины, представляющие собой отработанные продукты активации коагуляционных факторов VII или X, и угнетающие действие тканевого тромбопластина, а также его комплекса с фактором VII.

- Продукты деградации фибриногена/фибрина (ПДФ), которые образуются в результате действия плазмина, блокирующие фибриноген, ингибирующие активный фактор IX, а также фибринолиз и агрегацию тромбоцитов. ПДФ обладают слабым антитромбиновым действием, а также угнетают конечный этап свертывания - образование фибрина за счет ингибирующего влияния на процессы полимеризации фибрин-мономеров.

К вторичным антикоагулянтам относятся также т.н. фибринопептиды (продуктами протеолиза фибриногена тромбином), метафакторы активных плазменных факторов, антитромбин IX, ауто-II-антикоагулянт и пр.

Активация противосвертывающей системы осуществляется параллельно активации системы свертывания, т.е. с момента активации фактора Хагемана и появления первых порций активного плазменного XII фактора. Фактически самоторможение системы гемостаза отмечается уже на этапе активации свертывающей системы. Точкой приложения физиологических антикоагулянтов являются только активные формы всех коагуляционных факторов крови.

В тоже время, следует помнить, что антисвертывающая система истощается значительно быстрее, чем свертывающая, темпы выработки физиологических антикоагулянтов в условиях патологии значительно отстают от темпов их потребления, что диктует необходимость восполнения их дефицита в условиях патологии. [20, 28, 53]

Механизм свертывания крови включает в себя множество обратных связей, дублирующих путей запуска различных этапов образования тромба. Благодаря этому поддерживается баланс между свертывающей и противосвертывающей системами, обеспечивается высокая надежность функционирования системы гемостаза в целом.

Существенное значение в поддержании нормального функционирования свертывающей системы крови имеет эндотелий сосудов. Нормально функционирующие эндотелиоциты обладают тромборезистентными свойствами за счет отрицательного электрического заряда, наличия фермента АДФ-азы, секреции веществ, угнетающих функциональную активность тромбоцитов (простациклин, оксид азота и пр.). Кроме того, клетки эндотелия обладают способностью связывать тромбин и выделять в кровоток тканевой активатор плазминогена. Неповрежденный эндотелий препятствует миграции липопротеидов в субэндотелиальное пространство. [30, 158]

Изменения, возникающие в свертывающей системе крови в процессе развития ишемического инсульта, как правило, носят характер гиперкоагуляции.

Отмечается повышенное содержания фибрина в плазме крови, усиление спонтанной агрегации тромбоцитов, снижение реактивности эндотелия. Данные нарушения могут сохраняться не только в остром периоде ишемического инсульта, но и в раннем восстановительном. К концу второй недели от начала заболевания данные нарушения достигают максимума, после чего запускается обратный процесс, причем, нередко он протекает стремительно, по типу ДВС синдрома. В ходе ишемического инсульта эритроциты подвергаются конформационным изменениям, за счет воспалительных процессов. В ходе ишемического инсульта исследователями отмечалось нарушение функции фибрина, образование им хаотических скоплений, в которых застревают эритроциты, укрепляя тромб и способствуя его персистированию. [23, 48 136]

Среди факторов, влияющих на изменение формы и пластичности эритроцитов, и их последующий гемолиз, выделяют три группы: взаимодействие с дисперсным тромбоцитарным тромбом, за счет чего эритроцит не успевает восстановить свою форму после предыдущего соударения; сформировавшиеся пристеночные тромбы, столкновение с которыми приводит к более сильному повреждению эритроцита; малый диаметр сосуда и высокая плотность клеток, что уменьшает свободу маневра для эритроцита. [113]

### **1.5 Агрегация форменных элементов крови**

Одним из неперенных этапов свертывания крови считается агрегация форменных элементов и адгезия их, преимущественно, тромбоцитов, к поврежденному участку сосуда.

Показано, что спонтанная взаимная агрегация эритроцитов у лиц, перенесших инсульт, значимо выше, при наличии таких факторов риска как артериальная гипертензия и сахарный диабет. Сравнение производилось в отношении здоровых индивидуумов, и перенесших ишемический инсульт, но без вышеуказанных факторов риска. [78, 131]

К факторам, вызывающим адгезию и агрегацию тромбоцитов, относятся фактор Виллебранда, тромбоксан  $A_2$ , фактор активации тромбоцитов, АДФ. Из перечисленного, только тромбоксан  $A_2$  синтезируется в самих тромбоцитах, а прочие факторы образуются в эндотелии, причем необязательно поврежденном. Препятствуют агрегации тромбоцитов простагландин  $I_2$ , оксид азота и экто-АДФ-аза, вырабатываемые эндотелием. Про- и антиагреганты постоянно находятся в кровотоке и их эффекты взаимно уравновешиваются.

Известно, что в эритроцитах также содержится несколько биологически активных веществ, принимающих участие в свертывании крови. К их числу относятся тромбопластический фактор, антигепариновый фактор, акцелерин, АДФ и другие. Большая часть в эритроцитарных факторов свертывания крови становится активными только при разрушении эритроцита. С другой стороны, эритроцит адсорбирует на своей поверхности фибриноген, гепарин, тромбопластин и другие факторы свертывания крови и фибринолиза. В условиях образования фибринового сгустка, под действием тромбина, эритроциты фиксируются между нитями фибрина, придавая сгустку прочность. [20, 53]

Скорость движения форменных элементов в кровотоке достаточно высока, и одним из необходимых условий для начала агрегации и адгезии является локальное замедление кровотока. В сосудах малого калибра, в условиях сужения сосудистого просвета, за счет атеросклероза, вероятность самопроизвольной или обусловленной повреждением эндотелия агрегации существенно возрастает.

В экспериментальном исследовании была отражена роль эритроцитов в формировании тромба. Несмотря на то, что сами эритроциты могут способствовать активации тромбоцитов, они же уменьшают размер пристеночного тромба за счет физического контакта, соударений. Показано, что в извитых сосудах, относительный размер тромба коррелирует с количеством эритроцитов в крови: чем их больше, тем существеннее размеры тромба. Значения гематокрита в пределах 20-55% не оказывают существенного влияния на гемостаз, однако, размер тромба и вовлечение в его образование форменных элементов крови напрямую зависит от количества эритроцитов и скорости

кровотока. Считается, что естественная миграция тромбоцитов на периферию потока крови в кровеносном сосуде сильно зависит от количества и размеров эритроцитов. С увеличением этих двух параметров значительно возрастает степень агрегации и адгезии тромбоцитов к интима сосуда. [66, 54, 80, 82, 152]

Даже небольшое локальное уменьшение диаметра сосуда ведет к повышению напряжения сдвига (тангенциальное давление кровотока на стенки сосуда). В подобной ситуации затруднена спонтанная агрегация клеток, за счет малого времени взаимного контакта, однако высокое напряжение сдвига может привести к активации клеточного звена гемостаза, прежде всего тромбоцитов и лейкоцитов, с развитием адгезии и агрегации этих клеток, на фоне сохраненных антикоагулянтных свойств сосудистой стенки. Так, например, высокое напряжение сдвига приводит к связыванию фактора Виллебранда с мембранными гликопротеинами тромбоцитов, что, в свою очередь, вызывает высвобождение ионов кальция и агрегацию тромбоцитов. В подобной ситуации фактор Виллебранда может выступать единственным стимулом агрегации тромбоцитов, при малом участии фибриногена и плазменного кальция. Изучены механизмы образования тромба при малой скорости кровотока: в подобной ситуации величина тромба в обратной степени зависит от гематокрита и сам тромб преимущественно состоит из эритроцитов и фибрина. [85, 110, 118, 141, 147, 149]

В то же время, нарастание интенсивности механического воздействия на интиму сосудистой стенки сопровождается активацией синтеза простациклина эпителиоцитами, обладающего сосудорасширяющим эффектом. Кроме прочего, простациклин способствует понижению активности тромбоцитов, и, таким образом, снижается вероятность развития процесса свертывания крови. В условиях функционально неполноценной сосудистой стенки, избыточная продукция простациклина и других сосудорасширяющих веществ может привести к резкому снижению напряжения сдвига с закономерным развитием стаза. [89, 100, 101]

В этой ситуации становится возможной экспрессия тканевого фактора эндотелиальными клетками, вызванная, в частности провоспалительными



цитокинами. Данный процесс, в свою очередь, может приводить к активации реакций плазменного гемостаза с депозицией фибрина. [90]

Немаловажным фактором, обеспечивающим нормальное функционирование системы гемостаза, за счет препятствия самопроизвольной агрегации, является электрический заряд форменных элементов, макромолекул, эндотелия.

## **1.6 Электрокинетические исследования**

### **1.6.1 Общие положения**

Рядом научных исследований было установлено, что эритроциты млекопитающих несут на внешней поверхности своей мембраны отрицательный электрический заряд, который формируется за счет расположенных в гликокаликсе карбоксильных остатков сиаловых кислот. Семейство сиаловых кислот в организме человека представлено несколькими видами молекул, принимающих важное участие в процессах регуляции жизнедеятельности. Наиболее характерным представителем в качестве источника отрицательного электрического заряда для клеток и тканей считают N-ацетил-нейраминовую кислоту (NANA). Расчетным путем было установлено среднее содержание сиаловой кислоты на поверхности эритроцитов. Это значение составляет примерно  $46-53 \cdot 10^6$  молекул на клетку. Авторы не нашли существенных различий в содержании N-ацетил-нейраминовой кислоты у эритроцитов разных групп крови АВО. [74, 87]

По данным разных авторов, величина электрического заряда внешней поверхности эритроцита считалась равной от 4 до 15 миллионов элементарных зарядов. Точное определение величины электрического заряда эритроцита представляется непростой задачей ввиду сложной геометрии его поверхности, необходимости высокоточного оборудования с приемлемым уровнем погрешности измерения. Отрицательно заряженные эритроциты в кровотоке испытывают взаимное действие кулоновских сил электроотталкивания, благодаря чему не соприкасаются друг с другом. Минимальное значение заряда эритроцита,

по расчетным данным, необходимое для обеспечения агрегационной устойчивости в кровотоке, составляет 22тыс. элементарных зарядов. [59, 71]

Электрический заряд мембраны эритроцита может варьировать в определенных границах, вследствие происходящих в организме процессов. Показано, что адсорбция различных молекул на мембране, например, антигенов, может изменять величину ее электрического заряда. Усиление агрегации эритроцитов при снижении рН окружающей среды также, вероятно, связано со снижением электрического заряда мембраны. [22, 69, 151]

Опыты с пропусканием гальванического тока через кровь человека и животных показали повышение свертываемости крови, рост агрегации тромбоцитов и образование агрегатов на аноде и катоде. Как полагали авторы, в основе наблюдаемого эффекта лежит нарушение ионной атмосферы клеток крови, а также нарушение проницаемости мембран по отношению к агрегирующим факторам. [31]

Наличие у эритроцитов постоянного электрического заряда послужило основой для проведения разнообразных электрокинетических экспериментов с участием клеток крови, а также практическим методам диагностики заболеваний. Наиболее ранними следует считать опыты по электрофоретической подвижности эритроцитов.

Кровь и форменные элементы, содержащиеся в ней, можно рассматривать как коллоидную систему, с соответствующими физико-химическими взаимодействиями. Отрицательно заряженная внешняя поверхность эритроцита провоцирует образование вокруг клетки своеобразной ионной атмосферы, по типу двойного слоя, состоящего из ионов плазмы. Группа положительно заряженных ионов, сосредоточенная вблизи поверхности эритроцита, образует т.н. адсорбционный слой, другая же, отрицательно заряженная, расположенная дистальнее, составляет диффузный слой. Противоионы обоих слоев находятся в динамическом равновесии.

Электростатические силы стремятся сосредоточить возможно большее количество противоионов вблизи заряженной поверхности клетки, а

молекулярное тепловое движение способствует их равномерному распределению во всем объеме суспензирующей среды. В результате действия этих двух противоположно направленных сил вокруг частицы или клетки ионы статически распределяются так, что вблизи поверхности клетки число противоположно заряженных ионов в среднем во времени будет больше, а число одноименно заряженных - меньше, чем в окружающей среде, в которой их концентрации равны.

Наиболее высокая плотность электрического заряда двойного слоя вблизи поверхности клетки, при удалении от нее в глубину раствора плотность заряда постепенно уменьшается до нуля.

Электрокинетический потенциал, возникающий между адсорбционной и диффузной частями диэлектрического слоя, называют дзета-потенциалом. Поскольку дзета-потенциал пропорционален заряду мембраны эритроцита, то устойчивость последнего к агрегации посредством сил электростатического взаимодействия пропорциональна его величине. [2, 91, 95, 108, 133]

$$Z = f \left[ \sigma, \frac{1}{D}, \frac{1}{\sqrt{D\mu}} \right]$$

Дзета-потенциал выражается посредством данного уравнения, и зависит от электрического заряда эритроцита  $[\sigma]$ , диэлектрической проницаемости среды  $[D]$ , и ионной силы раствора  $[\mu]$ .

Помещение заряженных частиц в электрическое поле вызывает их движение к противоположно заряженным электродам. Для клеточного электрофореза используют электроды различной формы, для создания неоднородного электрического поля. Эритроцит и плазма различны по проводимости и диэлектрической константе, поэтому на границе раздела двух фаз скапливаются наведенные электрические заряды, которые стремятся уменьшить различия в электрических характеристиках частицы и среды. Такая вынужденная

поляризация придает эритроциту свойства электрического диполя. Его величина очень большая в сравнении с таковой обычных диполей, образующихся на молекулах разных видов. Это объясняется большим расстоянием между противоположно заряженными концами клетки. Даже если разделенный заряд невелик, дипольный момент достигает огромных величин. Например, если разделенный заряд  $q$  эквивалентен всего лишь заряду одного электрона ( $1,6022 \times 10^{-19}$  Кл), тогда для клетки с диаметром 5 микрон дипольный момент будет около  $2,5 \times 10^5$  дебай (для сравнения молекула воды имеет всего 1,84 дебай). Эта особенность делает клеточный электрофорез очень быстрым, что позволяет наблюдать электрокинетические эффекты в световой микроскоп. Клетка в неоднородном электрическом поле ведет себя по-разному, в зависимости от своих электрических характеристик. Так, мертвая клетка или имеющая меньшее емкостное сопротивление мембраны (при ее повреждении), двигается в направлении большей напряженности электрического поля. Живая клетка будет двигаться в область с меньшей напряженностью электрического поля, против направления силовых линий. [36]

Как было показано в ряде исследований, скорость движения клеток в растворе электролита под воздействием электрического поля зависит от многих факторов, среди которых: величина рН, ионная сила раствора, структура мембраны клетки, в том числе расположенные на ней вещества, температура среды и пр. От размеров, формы эритроцита, скорость его движения в электрическом поле не зависит. [70, 72]

Электрофоретическая подвижность эритроцита ( $V$ ) имеет размерность (внесистемную)  $\text{мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . Расчет электрофоретической подвижности производится по формуле:

$$V = (L/t)/E$$

Где  $L$  – расстояние, проходимое клеткой во время измерения (мкм),  $t$  – время прохождения (сек),  $E$  – напряженность электрического поля (в/см).

В среднем, электрофоретическая подвижность эритроцитов человека равна  $1,128 \pm 0,2 \text{ мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ .

Основным параметром, благодаря которому эритроцит способен перемещаться в электрическом поле следует считать отрицательный заряд его мембраны. Опыты с удалением части молекул сиаловой кислоты с поверхности эритроцита (посредством бактериальных или синтетических ферментов), демонстрировали уменьшение электрофоретической подвижности, невзирая на сохранность прочих структур мембраны. [26, 144]

### 1.3.1 Вариабельность электрофоретической подвижности эритроцитов

Изменение электрофоретической подвижности эритроцитов изучалось значительным числом независимых исследователей, с целью четко определить факторы, влияющие на ее изменение. Сравнение электрофоретической подвижности молодых и старых эритроцитов, показало значительное различие между этими двумя группами клеток. Так, скорость движения в электрическом поле молодых эритроцитов колебалась в пределах  $1,47 - 1,25 \text{ мкм см в}^{-1} \text{ с}^{-1}$ , в то время как в популяции старых клеток электрофоретическая подвижность составляла  $1,0 - 0,855 \text{ мкм см в}^{-1} \text{ с}^{-1}$ . Снижение электрофоретической подвижности эритроцитов отмечается уже спустя несколько часов после взятия крови, что связано, скорее всего, с наступающим дефицитом АТФ. Наступающее в результате дефицита АТФ нарушение работы ионных насосов клетки ведет к нарушению мембранного потенциала. [75, 159]

В эксперименте, эритроциты недавней генерации, лишённые сиаловой кислоты, после обработки нейраминидазой, по скорости электрофоретической подвижности мало отличались от старых клеток. Сохранение остаточной электрофоретической подвижности эритроцитов, после полного удаления сиаловой кислоты с поверхности, авторы связывают с существованием отрицательно заряженных химических групп и у других молекул, адсорбированных на мембране эритроцита. [124, 130]

На фоне снижения электрического заряда мембраны эритроцита отмечалось изменение способности клеток к деформации и образованию агрегатов.

Существует теория, согласно которой снижение поверхностного заряда эритроцита служит одним из маркеров старения клетки. Это позволяет макрофагам ретикулоэндотелиальной системы выявлять и уничтожать такие эритроциты. Основным маркером для макрофагов в данной ситуации выступают галактозильные остатки на поверхности эритроцита, образующиеся после отщепления сиаловой кислоты. [81, 88, 107]

Изменение электрофоретической подвижности эритроцитов часто сопряжено с различными заболеваниями, причем, как правило, происходит снижение данного параметра. Подобная взаимосвязь объясняется изменением характеристик внутренней среды организма, повреждением мембраны эритроцита за счет токсинов, адсорбцией дополнительных молекул. [26, 140]

### **1.3.2 Индуцированная агрегация эритроцитов**

В ходе изучения электрических свойств эритроцитов исследователями использовался т.н. метод индуцированной агрегации.

В кровотоке, электростатическое взаимодействие эритроцитов протекает таким образом, что наиболее энергетически выгодным является расположение их обращенными друг к другу плоскостями. В условиях *in vitro* и при замедлении кровотока это проявляется образованием т.н. "монетных столбиков".

Известно, что агрегация эритроцитов состоит из трех последовательных стадий: сближение клеток, появление белковых «мостиков» между клетками и образование сфероидных агрегатов за счет конформационных изменений связующей белковой молекулы. Все эти процессы, начиная с формирования «монетных столбиков» и заканчивая сфероидными агрегатами, протекают по принципу минимизации свободной энергии. Белковые молекулы, которые обладают способностью участвовать в агрегации эритроцитов должны обладать значительной молекулярной массой. Так, альбумины не принимают участия в данном процессе, в противоположность глобулинам и фибриногену. Здесь стоит учесть и относительно положительный заряд глобулинов и фибриногена, также

играющий роль в облегчении агрегации клеток. Молекула белка соединяется на поверхности мембраны с рецепторами анионного транспорта, блокируя его. Величина заряда эритроцитов имеет прямое влияние на скорость и вероятность их агрегации. [94, 115, 148, 146]

В экспериментах *in vitro* было показано, что макромолекулы, такие как декстран, увеличивают диэлектрическую проницаемость среды, что приводит к снижению дзета-потенциала и сближению клеток. [76, 77]

Получение нестойких агрегатов эритроцитов возможно и в среде, содержащей только электролиты. Это осуществимо посредством добавления в дисперсионную среду крупных, положительно заряженных частиц, например, ионов тяжелых металлов. Агрегаты при этом образуются разнородные по величине и стабильности, причем положительные ионы вступают во взаимодействие не с рецепторами анионного транспорта, а с карбоксильной группой сиаловых кислот, расположенных на мембране, инактивируя, таким образом, их отрицательный заряд. Подобный вариант агрегации маловероятен в условиях кровотока, но применим в экспериментах *in vitro*. Описываемый эффект проявлялся отчетливее у эритроцитов, предварительно обработанных нейраминидазой, т.е. со сниженным электрическим зарядом. [63, 83, 121, 122, 123]

В исследованиях, посвященных изучению агрегации эритроцитов, часто использовалась фиксация расположенных на мембране эритроцита молекулярных структур с помощью глутарового, или муравьиного альдегидов.

Данный метод не лишен недостатков, поскольку альдегиды, соединяясь с белками мембраны, способствуют возрастанию электрического заряда эритроцита примерно на 10%. Также, использование стабилизаторов мембран приводит к постепенной потере гемоглобина и калия эритроцитом. В отношении разных альдегидов, скорость данных процессов различна, но значимые изменения метаболизма и структуры клетки начинаются не позднее нескольких часов после обработки. [96, 153]

Другими исследованиями, однако, было показано, что глутаровый альдегид в низких (0,25%) концентрациях не изменяет электрический заряд эритроцитов.

Однако обработка эритроцитов глутаровым альдегидом даже в концентрациях 0,1% вызывала снижение их агрегации, что, вероятно, связано с механизмом действия глутарового альдегида, нарушающего способность эритроцитов к деформации. [64, 145]

### **1.7 Понятие о группах крови системы АВО**

Групповая принадлежность крови человека, системы АВО, определяется его генотипом и передается по наследству согласно законам наследования признаков.

Антигенные детерминанты, определяющие специфичность групповой принадлежности крови, формируются за счет специфических ферментов – гликозилтрансфераз. Существует три гена: А, В и О, отвечающих за выработку гликозилтрансфераз, причем гены А и В кодируют одноименные антигены, а ген О не кодирует ничего. Гены А и В являются доминантными по отношению к гену О и кодоминантными по отношению друг к другу.

Типоспецифичные антигены эритроцитов человека являются структурными образованиями, расположенными на внешней стороне мембраны эритроцитов. Антигены эритроцитов могут быть протеинами (Резус, Кидд, Диего, Колтон), гликопротеинами (MNS, Гебрих, Лютеран) или гликолипидами (АВО, Н, Le, I). Все антигены эритроцитов могут вызвать выработку антител, но кроме этого, их функциями являются:

- участие в переносе веществ в клетку
- роль рецептора для экзогенных лигандов
- участие в адгезии различных молекул
- роль энзимов
- поддержка структуры мембраны эритроцитов

Антигены системы АВО экспрессируются, в частности, не только на эритроцитах, но и в других тканях. Кроме того антигенов А и В, на эритроцитах присутствует антиген Н, который является предшественником антигенов А и В, а также обнаруживается в большом количестве на поверхности эритроцитов,



принадлежащих к группе крови О. На мембране одного эритроцита человека может содержаться до миллиона А и В антигенных детерминант. Три детерминанты (А, В, Н) в основном, имеют один и тот же химический состав. Отличия в серологической специфичности определяются терминальными сахарами, прикрепленными к основной цепи. Они различны у трех антигенов: L-фукоза для антигена Н, N-ацетил-D-галактозамин для антигена А, D-галактоза для антигена В. От прочих систем групп крови, АВО отличается наличием в плазме крови антител против антигенов А и В. Данные антитела возникают в течение жизни вследствие антигенной стимуляции. Групповая принадлежность крови, таким образом, определяется по наличию на эритроцитах антигенов А или В и антител в сыворотке крови анти-А и анти-В.[33, 42]

### **1.8 Ассоциация групповой принадлежности крови с заболеваниями**

Результатом многих научных исследований была установлена ассоциация групповой принадлежности крови с различными заболеваниями и патологическими состояниями. Так, люди с первой группой крови более восприимчивы к заболеванию холерой, поскольку не имеют специфических антигенов, препятствующих адгезии токсинов на поверхности эпителиальных клеток. [67]

Заболевания зубов и пародонта чаще бывают ассоциированы с групповыми антигенами А и В, являющимися рецепторами для микроорганизмов полости рта. Люди с группами крови О и АВ обладают более здоровыми зубами. [135]

Установлена положительная корреляция между группами крови В и АВ и риском развития легочного туберкулеза. Подобная взаимосвязь прослеживается в отношении А группы крови, но ассоциированной с положительным резус-фактором. [138]

Заболеваемость сахарным диабетом, по результатам сравнительного исследования, не зависит от групповой принадлежности крови. [117]

У людей со второй группой крови чаще развивается рак желудка, слюнных желез, злокачественная анемия. Среди людей с А группой крови чаще возникает рак легких, в том числе среди не достигших 50 летнего возраста. Риск развития рака яичников выше у женщин со второй группой крови. Некоторые виды злокачественных опухолей экспрессируют антигены, похожие на типоспецифичный антиген А. Таким образом, снижается интенсивность иммунного ответа организма, в то время как носители других групп крови имеют анти-А антитела. Также, носители антигена А чаще встречались среди людей, оперированных по поводу ревматического порока сердца. [68, 73, 106, 127]

По данным сравнительного исследования, болезнь Паркинсона достоверно чаще встречалась среди людей-носителей антигена В. [116]

Не исключен тот факт, что принадлежность человека к той или иной группе крови системы АВО влияет на параметры свертывания крови, так, например, амплитуда ретракции и фибринолиза у больных с группой крови А(II) Rh<sup>-</sup> в 3-5 раз превышает таковые у больных с иными группами крови 0(I)Rh<sup>+</sup>, А(II)Rh<sup>+</sup> и В(III)Rh<sup>+</sup>. Причем наиболее уязвимы, по итогам проведенного исследования, противосвертывающие механизмы у людей с группой крови А(II)Rh<sup>+</sup>. [62]

Риск развития тромбозов и венозной тромбоэмболии среди беременных и женщин, употреблявших оральные контрацептивы, менее всего ассоциирован с первой группой крови. [108]

Принадлежность крови человека к определенной группе крови системы АВО может явиться возможным фактором риска возникновения ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии. По данным проведенных исследований, среди пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца, процент лиц с А(II) группой был больше, а с В(III), достоверно меньше, чем в контроле. [17, 32, 44]

Наименьший риск развития сердечно-сосудистых заболеваний был отмечен среди людей с О группой крови, в сравнении с прочими. Вариабельность риска развития подобных заболеваний находится в пределах 5-23%. [105]

Не исключено, что повышенный риск развития сердечно-сосудистых заболеваний у людей с А группой крови может быть обусловлен изначально повышенным содержанием холестерина в крови. Существует точка зрения, что данный факт не является непосредственно предрасполагающим к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, но должен учитываться как аргумент в пользу соблюдения такими людьми диеты и здорового образа жизни. [98]

Рядом исследований установлено, что у носителей первой группы крови уровень фактора Виллебрандта и VIII фактора в крови низкий, относительно прочих групп крови. Эти два фактора связаны друг с другом и принимают участие в процессах свертывания крови совместно, провоцируя образование тромбов в поврежденных сосудах. Кроме того, фактор Виллебранда отвечает за агрегацию тромбоцитов в случае повреждения эндотелия. Снижение содержания данных факторов в кровотоке уменьшает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Установлен механизм взаимосвязи групповой принадлежности крови и концентрации факторов свертывания. При синтезе фактора Виллебрандта, у людей со второй и третьей группами крови, в аппарате Гольджи эндотелиальных клеток, за счет специфических гликотрансфераз, данный фактор модифицируется: на углеводный конец цепи достраивается аналог А или В антигенов групп крови. Данная модификация может влиять на активность фактора и его расщепление специфическими протеазами, которые более активны у людей с группой крови О. [97, 161]

Исследование частоты встречаемости различных групповых антигенов крови у больных с ишемическим инсультом в Казахстане выявило повышенную частоту встречаемости антигенов M, Le, Kell, C. [61]

Как упоминалось выше, немаловажное значение в процессах агрегации форменных элементов, в свою очередь играющих роль в тромбообразовании, имеет электрический заряд. Образование и величина электрического заряда эритроцитов тесно связаны с наличием на поверхности мембраны молекул сиаловой кислоты.

Сиаловые кислоты на мембране клеток связаны с гликопротеидами (96% случаев) или базируются на липидах (4%). Заслуживает внимания тот факт, что содержание гликопротеид-связанных сиаловых кислот на эритроцитах разных групп системы АВО различается несущественно, а количество липид-связанных сиаловых кислот значительно варьирует: от 0,33% для А группы, до 3,67% для О группы крови. [79]

Распределение нейраминовых кислот на мембранах эритроцитов, принадлежащих к разным группам крови неодинаково и по плотности. На мембранах эритроцитов, искусственно лишенных типоспецифичных антигенов, либо принадлежащих к первой группе крови, сиаловые кислоты располагаются диффузно, не образуя четких скоплений. В то же время, на поверхности эритроцитов второй и третьей групп крови, сиаловые кислоты располагаются в виде т.н. «кластеров», с групповым антигеном на периферии или в центре «кластера», соответственно. Предполагается, что «кластеры» формируются при участии групповых антигенов и последние играют стабилизирующую роль для молекул сиаловой кислоты, что, несомненно, играет важную роль в патофизиологических процессах. [86]

Заслуживает упоминания факт частичного сохранения электрофоретической подвижности эритроцитами после удаления сиаловых кислот. Не исключено участие в формировании электрического заряда мембраны эритроцита иных, помимо сиаловых кислот, молекул гликокаликса, в том числе групповых антигенов АВО.

Учитывая вышеизложенное, можно полагать, что различия в химической структуре групповых антигенов по системе АВО могут играть определенную роль в патогенезе тромбообразования, и, как следствие, в патогенезе развития острого нарушения мозгового кровообращения.

## 1.9 Резюме

В данной работе планировалось повторить, с внесением модификаций, ранее проведенные эксперименты по индуцированной агрегации эритроцитов хлористым лантаном, электрофоретической подвижности эритроцитов, клинической оценке встречаемости различных групп крови у пациентов, перенесших ишемический инсульт. Существенным отличием экспериментов с электрокинетическими свойствами эритроцитов от ранее выполненных исследований является сравнение полученных результатов между эритроцитами разных групп крови, соблюдение четкой экспозиции крови после забора, для предупреждения ложных значений вследствие потери эритроцитами со временем электрического заряда.

Ожидаемый результат от проводимого исследования:

– выявление статистически достоверного различия в электрофоретической подвижности эритроцитов разных групп крови, что может свидетельствовать о различной величине электрического заряда их мембран.

- выявление статистически достоверного различия в индуцированной хлористым лантаном агрегации эритроцитов, принадлежащих к разным группам крови, что позволит судить о склонности к агрегации эритроцитов *in vivo* в условиях нарушения нормального функционирования системы гемостаза и функций эндотелия, что угрожает развитием тромбоза и ишемии тканей.

- уточнение превалирующего пути свертывания крови при развитии ишемического инсульта.

- посредством клинического выявления частоты встречаемости разных групповых антигенов у пациентов с ишемическим атеротромботическим инсультом подтвердить или опровергнуть ранее сделанные выводы о различиях в электрическом заряде эритроцитов разных групп крови и влиянии этого различия на риск развития ишемического инсульта.

## Материалы и методы

### Общие аспекты подготовки эритроцитов

В ходе изучения электрических свойств эритроцитов, принадлежащих к разным группам крови системы АВО, намеренно не использовались распространенные методики фиксации клеток и получения эритроцитарной взвеси. Повреждение эритроцитов в результате центрифугирования снижает достоверность определения различий в их электрическом заряде. Ранее, в подобных опытах применялись стабилизаторы мембран, например, глутаровый альдегид. В данном случае подобная методика не использовалась. В ряде работ отмечалось влияние альдегидов на электрический заряд клетки, что делает нецелесообразным его использование для сравнительного анализа электрических свойств эритроцитов различных групп крови АВО. [64, 96, 145]

Обработка эритроцитов нейраминидазой, также носит неоднозначный характер в плане изучения электрических свойств, поскольку после отщепления нейраминидазой сиаловой кислоты, на мембране клетки остается углеводный фрагмент, преимущественно, D-галактоза. Как известно, подобный углеводный остаток является типоспецифичным для В группы крови и рецептором для макрофагов, участвующих в элиминации старых и поврежденных эритроцитов из кровотока. Если сравнивать электрический заряд N-ацетил-галактозамина (антиген А группы крови) и D-галактозы, то сравнение окажется не в пользу последней. Поскольку мы не можем с уверенностью утверждать, что количество сиаловых кислот на эритроцитах всех групп крови АВО одинаково, то не представляется возможным сравнивать электрические свойства эритроцитов с измененным типоспецифичным антигеном, который, не несет электрического заряда. Таким образом, можно сказать, что все этапы подготовки эритроцитов и исполнения экспериментальных методик производились в максимально щадящих условиях, для обеспечения целостности эритроцита и структур его гликокаликса.

## 1.0 Индуцированная агрегация эритроцитов

Посредством индуцированной агрегации эритроцитов хлористым лантаном возможно провести сравнительный анализ устойчивости к агрегации эритроцитов разных групп крови.

Положительно заряженные ионы лантана, обладают способностью связываться с карбоксильными группами сиаловых кислот, расположенных на мембране, инактивируя, таким образом, их отрицательный заряд. Потеря заряда эритроцитами приводит к более плотному их взаиморасположению в растворе, и последующей нестойкой агрегации. [63, 83, 121, 122]

Согласно данным ранее проводимых экспериментов, сквозь мембрану эритроцита ионы лантана не проникают. Обнаружение ионов лантана внутри клетки, находящейся в растворе хлористого лантана, без использования стабилизаторов мембран, было отмечено лишь для кардиомиоцитов, за счет микропиноцитоза. [156]

Допускается, что проникновение лантана внутрь эритроцита возможно, но при высоких концентрациях рабочего раствора – 330М и выше. В данном опыте использовались значительно меньшие концентрации раствора хлористого лантана, поэтому эффект ионов лантана на взвесь эритроцитов можно считать обусловленным исключительно связыванием их с сиаловыми кислотами. [65, 63, 64]

Предполагается, что количество ионов лантана, и, соответственно, объем раствора хлористого лантана, необходимое для появления стойкой агрегации, будет зависеть от изначального электрического заряда поверхности эритроцита. Принимая во внимание, что сиаловые кислоты гликокаликса эритроцита могут не являться облигатным источником электрического заряда, судить о их количестве по результатам данного опыта будет некорректно.

На метод индуцированной агрегации эритроцитов хлористым лантаном ранее был получен патент.[50] В данном исследовании использовалась модифицированная методика патента: осаждение эритроцитов достигалось путем

отстаивания, не центрифугирования, во избежание повреждения клеток, и не использовались стабилизаторы мембран.

### **1.1 Используемое оборудование**

Для забора крови использовались стандартные вакуумные пробирки Vacuette, объемом 5,0мл, содержащие 3,8% раствор цитрата натрия. Дифференциация крови по группам системы АВО производилась с помощью стандартного набора цоликлонов, производства ООО «Медиклон. Для проводимого исследования также использовались: микроизмерительные весы, микроскоп Levenhuk 40L, секундомер, пробирки, капилляры разного объема, планшеты для определения группы крови, стеклянные палочки. Выполнение рабочих манипуляций производилось в условиях лицензированной клинической медицинской лаборатории ОГАУЗ «Санаторий Юбилейный».

### **1.2 Забор материала**

В работе использовались образцы крови здоровых доноров, полученные с Братской станции переливания крови. для работы использовались группы крови О, А, В, АВ не содержащие антигенов систем Резус и Kell. Все доноры были предупреждены о характере и целях использования крови, получено необходимое согласие.

### **1.3 Подготовка эритроцитов**

Взятая кровь консервировалась посредством 3,8% раствора цитрата натрия. После отстаивания, со дна пробирки производился забор 1,0 мл эритроцитарной массы с помощью стеклянного капилляра. Полученная таким образом эритроцитарная масса была дважды отмыта, по мере отстаивания, десятикратным объемом 0,9% раствора хлорида натрия.



Кровь и препарат крови хранилась при температуре 4-5°C. Опыт производился при комнатной температуре, на третий день после взятия крови у донора. Препарат крови для проведения опыта приготавливался путем разведения взвеси отмытых эритроцитов 0,9% раствором хлорида натрия в соотношении 1:20.

#### **1.4 Подготовка раствора хлористого лантана**

В работе использовался реактив  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , производства ООО «Нева-реактив» г. Санкт-Петербург. На основе математических расчетов определено необходимое количество хлористого лантана для приготовления т.н. «базового» раствора в 1800мкМ. Разведение производилось 0,9% раствором хлорида натрия. В дальнейшем, на основе раствора данной концентрации, путем дальнейшего разведения, приготавливались рабочие среды, с концентрацией хлористого лантана: 20, 40, 60, 80, 100, 120мкМ.

#### **1.5 Техника исследования**

На предметное стекло помещалась капля препарата крови, объемом 0,01мл, затем добавлялся раствор хлористого лантана, в объеме, необходимом для получения рассчитанной опытной концентрации после смешивания с препаратом крови. Смешивание препарата крови на предметном стекле с раствором хлористого лантана происходило одновременно с началом отсчета времени на секундомере.

Оценка результатов индуцированной агрегации эритроцитов производилась по различию во времени, необходимом для отчетливой агрегации в повышающихся концентрациях раствора хлорида лантана, для разных групп крови. Пороговым значением концентрации хлористого лантана считалась та концентрация, при использовании которой агрегация эритроцитов наступала в течение 5 (пяти) секунд. Агрегация эритроцитов верифицировалась визуально, с помощью микроскопа. В целях повышения достоверности измерений, каждый

конкретный опыт производился дважды. Критерием достоверности считалось совпадение результатов обоих проводимых опытов в серии.

В качестве дополнительного наблюдения, в раствор, содержащий эритроциты и хлористый лантан, в субпороговой для наступления агрегации эритроцитов концентрации, определенной опытным путем, вносились интактные эритроциты для оценки взаимодействия между клетками с пониженным электрическим зарядом, и интактными.

## **1.6 Оценка результатов**

Пороговое значение концентрации хлорида лантана для каждого образца группы крови заносилось в таблицу. Далее, оценивалась достоверность полученных различий с использованием критерия Манна-Уитни. Предпочтение данному статистическому методу было отдано вследствие хорошей чувствительности критерия Манна-Уитни для малых выборок.

## **2.0 Электрофоретическая подвижность эритроцитов**

Предполагается, что вследствие различной величины электрического заряда мембран эритроцитов, различных групп крови системы АВО, их электрофоретическая подвижность также будет различной.

### **2.1 Используемое оборудование**

#### **2.1.1 Общее оборудование**

Для забора крови использовались вакуумные пробирки Vacuette, объемом 5,0мл, содержащие 3,8% раствор цитрата натрия. Дифференциация крови по группам системы АВО производилась с помощью стандартного набора цоликлонов, производства ООО «Медиклон». В ходе проводимого исследования также использовались: пробирки, капилляры разного объема, планшеты для

определения группы крови, стеклянные палочки, микроскоп Levenhuk 40L, видеоокуляр Levenhuk C310, лицензированное программное обеспечение от изготовителя микроскопа ScopePhoto. Выполнение рабочих манипуляций производилось в условиях лицензированной клинической медицинской лаборатории ОГАУЗ «Санаторий Юбилейный».

### **2.1.2 Электрофоретическая ячейка**

В качестве электрофоретической ячейки использовалась приспособленная для данной задачи камера Горяева (по аналогии с методикой Голубева О.А, 1976г). Ячейка состояла из дна камеры, половин парацентральных каналов, площадки, покровного стекла. Опытным путем было достигнуто значение рабочего объема ячейки 0,0005мл. Стальные проводники, диаметром – 0,2мм располагались в парацентральных каналах. Наблюдение электрофоретической подвижности производилось на плоскости срединной площадки камеры Горяева. Конструкция электрофоретической ячейки и способ регистрации подвижности эритроцитов обоснованы действующим патентом. [49]

### **2.1.3 Электрическая схема**

В качестве источника электрического поля использовалась схема, состоящая из источника постоянного тока, напряжением 10В, стабилизатора на 4,2В, стальных проводников, резистора 1К5И. Благодаря использованию стабилизатора напряжение тока в области электрофоретической ячейки поддерживалось на стабильном уровне в 4,2В.

В составлении электрической схемы использована ранее патентованная схема устройства стабилизатора. [34] Выбранное значение напряжения тока определено опытным путем, как оптимальное в отношении скоростей движения эритроцитов и диссоциации электролита.

### **2.1.4 Фиксация результатов**

Регистрация подвижности эритроцитов производилась с помощью микроскопа Levenhuk 40L, видеоокуляра Levenhuk C310. Используемое оптическое увеличение 1:400. Фокус выставлялся на линии сетки площадки камеры Горяева.

Обработка полученных результатов, подсчет проходимого эритроцитами расстояния производился с помощью лицензированной программы для работы с микроскопом, поставляемой в комплекте.

## **2.2 Забор крови**

В работе использовались образцы крови здоровых доноров, полученные с Братской станции переливания крови. для работы использовались группы крови O, A, B, AB не содержащие антигенов систем Резус и Kell. Все доноры были предупреждены о характере и целях использования крови, получено необходимое согласие.

## **2.3 Подготовка эритроцитов**

Взятая кровь консервировалась посредством 3,8% раствора цитрата натрия. Кровь хранилась при температуре 4-5°C. Опыт производился при комнатной температуре, на следующий день после забора крови. После отстаивания крови, со дна пробирки производился отбор 0,01 мл эритроцитарной массы, с помощью стеклянного капилляра, разводившейся 0,9% раствором хлорида натрия в соотношении 1:4000.

## 2.4 Техника опыта

Полученный препарат крови, объемом 0,0005мл помещался в электрофоретическую ячейку. Фокус поля зрения микроскопа выставлялся на линии сетки площадки камеры Горяева. Таким образом, отчетливо видимые эритроциты принимались находящимися в непосредственной близости от дна камеры. В отношении данной группы клеток производить оценку подвижности в электрическом поле нецелесообразно, поэтому в качестве опытных эритроцитов использовались клетки с размытыми контурами. Ввиду малого объема камеры, оседание клеток в ней происходило в течение минуты, поэтому участие водного тока в процессе измерения можно считать несущественным.

После подключения к электрофоретической ячейке электрической схемы и ее включения, активировалась запись изображения, с помощью видеоокуляра, в файл компьютера.

Для повышения достоверности, измерение в отношении каждого образца производилось пять раз.

## 2.5 Оценка результатов

Измерение пройденного эритроцитом расстояния производилось путем сравнения положения искомой клетки на двух кадрах, выделенных из записанного видеофайла с интервалом в 10 секунд. Непосредственное измерение расстояния производилось с помощью входящей в комплектацию микроскопа программы для обработки изображений, счета форменных элементов - ScopePhoto. Подсчет проводился по аналогии с методикой счета эритроцитов в лабораторных исследованиях: в больших квадратах, каждого из пяти измерений. Всего произведено измерение скорости 400 эритроцитов для каждой группы крови.

Полученные результаты заносились в таблицу. Скорость движения эритроцитов вычислялась согласно общепринятой формуле. Достоверность

различий между величиной электрофоретической подвижности эритроцитов разных групп крови оценивалась с использованием Т-критерия Стьюдента.

### **3.0 Исследование частоты встречаемости разных групп крови у пациентов, перенесших ишемический инсульт**

#### **3.1 Подбор пациентов**

В группу опыта вошли 76 пациентов, проходивших лечение в неврологическом отделении ГБ №5 г. Братска с диагнозом: ишемический атеротромботический инсульт. Критериями постановки диагноза являлись: характерная клиническая картина заболевания, подтвержденная инструментальными методами обследования (компьютерная томография головного мозга, эхо-кардиография, УЗДГ сосудов шеи), или данными секции.

У всех пациентов опытной группы определялись умеренные или выраженные атеросклеротические изменения сосудов головы и шеи, с различной степенью сужения просвета сосудов и их извитости. Все участвующие в проводимом исследовании лица были предупреждены о целях и характере исследования, получено необходимое согласие на использование крови.

В контрольную группу вошло 464 человека, выбранных случайным образом, посредством анализа историй болезни травматологического отделения ГБ №1 г. Братск.

#### **3.2 Используемое оборудование**

Анализ групповой принадлежности крови проводился с помощью стандартных цоликлонов Анти-А, анти-В, Анти-Д производства ООО «Медиклон», г.Москва.

Выполнение рабочих манипуляций производилось в условиях лицензированной клинической медицинской лаборатории МАУЗ БГБ №5.

### **3.3 Оценка результатов**

Все полученные результаты групповой принадлежности пациентов опытной и контрольной групп заносились в таблицу, достоверность выявленных различий оценивалась с помощью Т-критерия Стьюдента.

## **4.0 Изучение параметров гемостаза у пациентов, перенесших ишемический инсульт**

### **4.1. Подбор пациентов**

В качестве обследуемых были выбраны пациенты неврологического отделения ГБ №5, г.Братск. Все обследуемые предупреждены о характере проводимого исследования, получено необходимое согласие.

В данной работе не принимался во внимание подтип ишемического инсульта, условиями выборки являлись ишемический характер нарушения мозгового кровообращения и отсутствие в анамнезе назначения антикоагулянтов пациентам. Также, исключались из проводимого исследования лица с повторными ишемическими церебральными атаками.

В исследовании принимало участие 50 человек, перенесших ишемический церебральный инсульт, или транзиторную ишемическую атаку, ретроспективно, в течение месяца.

### **4.2. Использованное оборудование, материалы**

Анализ групповой принадлежности крови проводился с помощью стандартных цоликлонов Анти-А, анти-В, Анти-Д производства ООО «Медиклон», г.Москва в условиях лицензированной клинической лаборатории ОГАУЗ «Санаторий Юбилейный».

Определение значений ПТВ, АЧТВ, МНО проводилось штатными лаборантами БГБ№5 в плановом порядке, при поступлении пациента в стационар, в условиях лицензированной клинической медицинской лаборатории БГБ №5

### **4.3. Оценка результатов**

Полученные результаты распределения групповой принадлежности крови, ПТВ, АЧТВ, МНО для большей наглядности отображались в форме графиков, в сравнении с распределением Гаусса. Использовались встроенные функции программы Microsoft Excel. Соответствие полученных распределений указанных параметров нормальному оценивалось с помощью критерия Шапиро-Уилка.



## Результаты и обсуждение

Групповая принадлежность крови, как было показано в ряде независимых исследований, оказывает определенное влияние на развитие и протекание разнообразных заболеваний и патологических состояний. В том числе, групповая принадлежность крови может являться фактором риска в отношении развития цереброваскулярных заболеваний.

В первой части настоящей работы был проведен сравнительный анализ встречаемости групп крови АВО среди лиц, перенесших ишемический инсульт в городе Братск и Братском районе. Отличительным признаком данного исследования является строгая дифференцировка подтипа ишемического нарушения мозгового кровообращения у исследуемых лиц. Принимая во внимание различный патогенез подтипов ишемического инсульта, нецелесообразно производить оценку встречаемости групповых антигенов для всех без исключения пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения. Для проведения исследования был выбран атеротромботический вариант развития острого нарушения мозгового кровообращения, как наиболее часто встречающийся, в особенности, в старшей возрастной группе. [12, 51]

Характерными признаками данного подтипа ишемического инсульта является атеросклероз экстракраниальных сосудов, длительный анамнез артериальной гипертензии, отсутствие стойких нарушений сердечного ритма. Известно, что атеросклеротическое поражение сосудов головного мозга, и степень его выраженности, являются значимыми факторами риска развития ишемического инсульта. [18]

В настоящем исследовании, у всех пациентов опытной группы также выполнялось исследование кровотока в экстракраниальных сосудах, для верификации имеющихся изменений.

Немалое внимание было уделено формированию группы контроля. Контингент лиц, составлявших данную группу, различался по возрасту, полу и

роду занятий. Объединяющим признаком служило отсутствие в анамнезе кардио- и цереброваскулярных заболеваний, а также терапии антиагрегантами. Формирование контрольной группы производилось посредством случайной выборки из имеющегося массива лиц с известной группой крови АВО. Следование вышеуказанным критериям позволило достичь примерного соответствия распределения типоспецифичных антигенов АВО в контрольной группе среднему в популяции.

Особо стоит отметить аспект пренебрежения возрастом лиц, в контрольной группе. Ряд заболеваний и патологических состояний, для развития и прогноза которых может иметь значение групповая принадлежность крови, могут исказить картину распределения групп крови в популяции, за счет летальности. Логично полагать, что с возрастанием среднего возраста контрольной группы, данное искажение также возрастает. Иными словами, если проводить сравнение между лицами сходного возраста, картина распределения групп крови в популяции может быть неверна вследствие накопления статистически значимых изменений.

Полученные результаты и значение t-критерия Стьюдента приведены в **таблице 1**

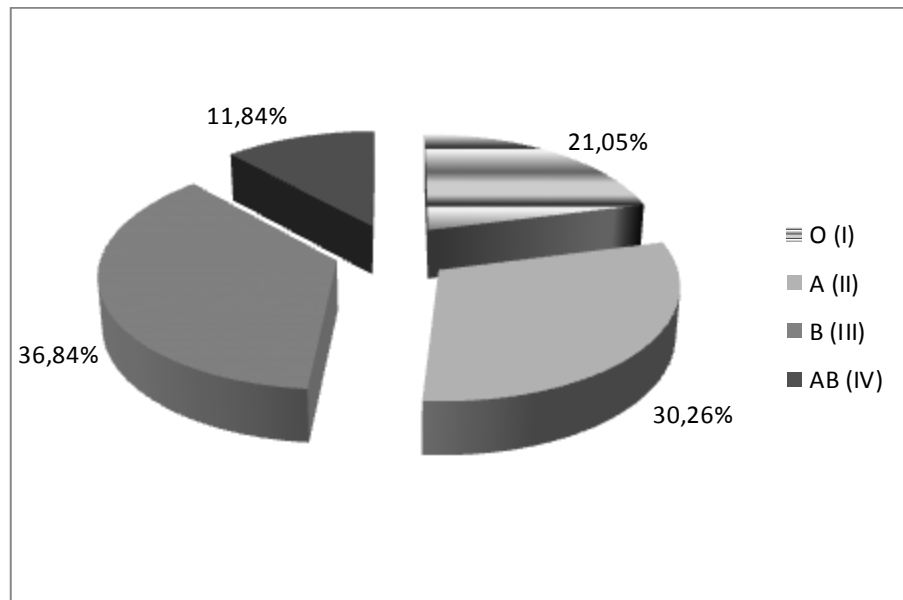
**Таблица 1** Сравнительная частота встречаемости групп крови АВО среди пациентов с ишемическим инсультом и здоровых лиц

Опытная группа			Контрольная группа			t
Группа крови	Количество человек	%	Группа крови	Количество человек	%	
О (I)	16	21,05	О (I)	151	32,54	2,23
А (II)	23	30,26	А (II)	181	39,01	1,52
В (III)	28	36,84	В (III)	104	22,41	2,5
АВ (IV)	9	11,84	АВ (IV)	28	6,03	1,55

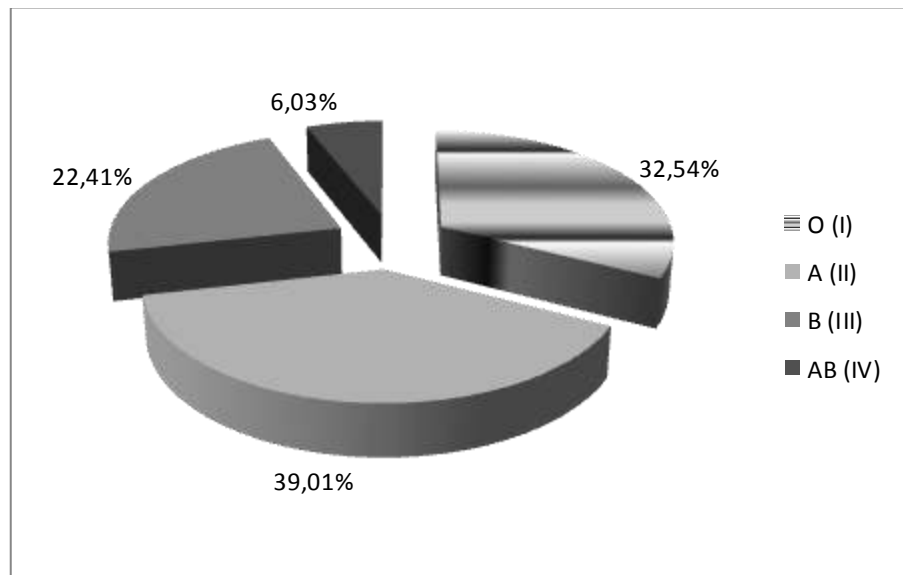
Критическое значение критерия Стьюдента (таб) — 2,44 (для  $p < 0,05$ , при числе степеней свободы  $n=6$ ).

В графическом представлении, распределение групповой принадлежности крови у лиц, перенесших ишемический инсульт, и здоровых показано на рисунках 1 и 2.

**Рисунок 1** Распределение групп крови среди лиц, перенесших ишемический инсульт



**Рисунок 2** Распределение групп крови среди здоровых лиц



Как можно видеть из приведенных данных, исследование встречаемости фенотипов АВО среди пациентов, перенесших ишемический инсульт, атеротромботического генеза, показало статистически достоверное преобладание

В группы крови. Так, частота встречаемости данного фенотипа составила 36,84% в исследуемой группе, в сравнении с 22,41% в группе контроля ( $p \leq 0,05$ ).

Частота встречаемости АВ группы крови среди пациентов с ишемическим инсультом почти вдвое превышает таковую в группе контроля – 11,84% и 6,03%, соответственно. Тем не менее, за счет малого числа наблюдений, которое закономерным образом следует из малой встречаемости данной группы крови в популяции, полученное различие не выглядит достоверным, если использовать для статистической обработки t-критерий Стьюдента. Поэтому, оценка значимости различий для АВ группы крови производилась с применением вспомогательной переменной Фишера:  $\phi = 2 \arcsin \sqrt{P}$

Благодаря использованию данной методики расчета, становится возможным утверждать, что с вероятностью 95% частота встречаемости АВ группы крови у больных ишемическим инсультом будет находиться в пределах от 5,57% до 19,84%. Таким образом, полностью исключить повышенный риск развития ишемического атеротромботического инсульта у людей с АВ группой крови нельзя.

Достоверных различий в частоте встречаемости О и А групп крови среди пациентов, перенесших ишемический инсульт, и в группе контроля, выявить не удалось. Данный факт не позволяет судить о повышенном риске развития ишемического инсульта у человека, обладающего одной из этих групп крови. Тем не менее, можно полагать, что наличие О или А групп крови, как минимум, не является защитным фактором в отношении развития ишемического инсульта. В противном случае, можно было бы наблюдать преобладание данного фенотипа в группе контроля, среди здоровых лиц.

Таким образом, по результатам первой части работы был сделан вывод о преобладании В группы крови среди лиц, перенесших атеротромботический ишемический инсульт. Здесь стоит отметить, что подобный анализ, проведенный без учета подтипа инсульта, вполне может показать иные результаты.

В изученной литературе, посвященной взаимосвязи ишемического инсульта с групповой принадлежностью крови, ряд исследователей сходятся во мнении о

наличии ассоциация фенотипа и генотипа АВО с активностью факторов свертывания крови. Так, установлена вариабельность активности факторов Виллебранда, VIII и XIII у людей с разными группами крови АВО. В частности, повышенный риск развития ишемического инсульта тромботического и кардиоэмболического подтипов признается более высоким для лиц с АВ группой крови. Данные исследования, несомненно, являются важным вкладом в понимание патогенеза ишемического инсульта. В целом, риск развития ишемического инсульта высок для А, В, АВ групп крови, в сравнении с О группой крови. [157, 160, 161]

Существует альтернативная точки зрения на взаимосвязь фенотипа и генотипа АВО с риском развития ишемического инсульта. Шведские исследователи проводили сравнительный анализ встречаемости типоспецифичных антигенов АВО среди 600 пациентов с ишемическим инсультом и не обнаружили убедительных доказательств повышенной частоты встречаемости какого-либо из них. Стоит заметить, что в данной работе анализ проводился включительно для всех подтипов ишемических нарушений церебрального кровообращения, без дифференцировки. [104]

В настоящей работе было решено рассмотреть патогенез ишемического инсульта с позиции электростатических взаимодействий клеток и молекул. В качестве вероятной причины влияния групповой принадлежности крови АВО на риск развития ишемического инсульта, была выдвинута версия о неодинаковости электрического заряда эритроцитов, принадлежащих к разным группам крови АВО. Отличие в величине электрического заряда может приводить к вариабельности процессов агрегации и адгезии форменных элементов и молекул крови, что будет влиять на процесс тромбообразования.

Чтобы проверить данное предположение, необходимо было провести сравнение электрических свойств эритроцитов разных групп крови АВО. Данная задача выполнялась в двух направлениях: изучение агрегации эритроцитов разных групп крови и измерение электрофоретической подвижности эритроцитов.

Агрегация эритроцитов занимает важное место в процессе тромбообразования, наряду с агрегацией тромбоцитов. В кровотоке, несоприкасаемость эритроцитов обеспечивает отрицательный электрический заряд их мембран. Основным источником отрицательного заряда принято считать расположенные на поверхности клеток молекулы сиаловой кислоты. Лишение эритроцитов сиаловых кислот, например, посредством обработки нейраминидазой, приводило к их самопроизвольной агрегации. [59, 71, 83]

Вопросу индуцированной агрегации эритроцитов в научной литературе было посвящено немало работ. Чаще всего для выполнения подобного опыта использовались соли лантана. Известно, что ионы лантана схожи по диаметру с ионами кальция, что позволяет замещать последние в гликопротеинах клеточной мембраны. Связывание малых количеств ионов лантана с мембраной приводит к уменьшению ее отрицательного электрического заряда и следующей за этим агрегацией клеток. Если концентрация лантана в растворе высока (выше 330М), его ионы могут проникать внутрь клетки, связываясь с внутренней поверхностью мембраны и изменяя ее структуру, по типу «стоматоцита». Проведенные исследования убедительно показали зависимость процесса индуцированной агрегации от концентрации хлористого лантана в растворе и содержания АТФ в эритроцитах. [63, 64]

В данной работе сравнивалась индуцированная лантаном агрегация эритроцитов, принадлежащих к разным группам системы АВО, с целью установления возможных различий. Индуцированную агрегацию эритроцитов хлористым лантаном предпочтительнее проводить не в цельной крови, а в препарате отмытых эритроцитов, во избежание влияния на реакцию белков плазмы.

От центрифугирования крови при приготовлении отмытых эритроцитов, которое применялось другими исследователями, решено было отказаться. Дело в том, что подобный процесс приводит к неизбежному повреждению клеток, которое может исказить конечные результаты исследования. Поэтому отмывка эритроцитов производилась после их отстаивания. Также не применялись

стабилизаторы мембран, например, глутаровый альдегид, для исключения любого влияния на ход проводимого исследования. Используемые в настоящей работе концентрации хлористого лантана достаточно малы, чтобы проникать внутрь клетки, поэтому в стабилизаторах мембран нет необходимости.

Ранее было показано, что наиболее чувствительны к действию ионов лантана эритроциты со сниженным содержанием АТФ. Уменьшение энергетических запасов клетки закономерным образом происходит по мере ее экспозиции вне организма, после взятия крови. Также, пониженным запасом АТФ обладают старые эритроциты. С учетом данного факта, для индуцированной агрегации эритроцитов использовались клетки, прошедшие одинаковый период инкубации после взятия образца крови.

Минимальная концентрация хлористого лантана, при которой в течение минуты наступала агрегация эритроцитов всех групп крови, в ряде предварительных тестов была определена как 60М. Максимальная концентрация хлористого лантана, вызывавшая немедленную агрегацию во всех без исключения образцах крови, составила 120М. Титрование производилось с шагом в 20М, как наиболее доступным с технической точки зрения. Микроскопия исследуемых эритроцитов, после добавления опытных концентраций хлористого лантана показала образование эхиноцитов, не стоматоцитов, что подтверждает взаимодействие ионов лантана преимущественно с поверхностью эритроцитов.

Результаты индуцированной агрегации эритроцитов различных групп крови приведены в **таблице 2**.

Статистическая обработка производилась в программе STATISTICA, с расчетом критерия достоверности Манна-Уитни. Полученные результаты отражены в **таблицах 2.1-2.6**.

Таблица 2 Пороговые концентрации хлористого лантана для разных групп крови

<b>Группа крови O(I)</b>		<b>Группа крови A(II)</b>	
	Пороговая концентрация La, мкМ		Пороговая концентрация La, мкМ
	60		80
	60		80
	60		80
	60		80
	60		80
	60		80
	80		80
	80		80
	100		
<b>Группа крови B(III)</b>		<b>Группа крови AB(IV)</b>	
	Пороговая концентрация La, мкМ		Пороговая концентрация La, мкМ
	60		80
	80		100
	80		100
	80		100
	100		100
	100		
	100		
	120		
	120		



Таблица 2.1 Сравнение О (I) и А (II) групп

Сум.ранг О	Сум.ранг А	U	Z	р-уров.	Z скорр.	р-уров.	N набл. О	N набл. А	2-х стор точный р
61,0	92,0	16,0	-1,92450	0,054293	-2,21500	0,026761	9	8	0,059235

Таблица 2.2 Сравнение О (I) и В (III) групп

Сум.ранг О	Сум.ранг В	U	Z	р-уров.	Z скорр.	р-уров.	N набл. О	N набл. В	2-х стор точный р
58,5	112,5	13,5	-2,38416	0,017119	-2,49898	0,012456	9	9	0,014192

Таблица 2.3 Сравнение О (I) и АВ (IV) групп

Сум.ранг О	Сум.ранг АВ	U	Z	р-уров.	Z скорр.	р-уров.	N набл. О	N набл. АВ	2-х стор точный р
49,0	56,0	4,0	-2,46667	0,013638	-2,64404	0,008193	9	5	0,011988

Таблица 2.4 Сравнение А (II) и В (III) групп

Сум.ранг А	Сум.ранг В	U	Z	р-уров.	Z скорр.	р-уров.	N набл. А	N набл. В	2-х стор точный р
56,0	97,0	20,0	-1,53960	0,123659	-1,80909	0,070438	8	9	0,138791

Таблица 2.5 Сравнение А (II) и АВ (IV) групп

Сум.ранг А	Сум.ранг АВ	U	Z	р-уров.	Z скорр.	р-уров.	N набл. А	N набл. АВ	2-х стор точный р
40,0	51,0	4,0	-2,34216	0,019173	-2,92119	0,003487	8	5	0,018648

Таблица 2.6 Сравнение В (III) и АВ (IV) групп

Сум.ранг В	Сум.ранг АВ	U	Z	р-уров.	Z скорр.	р-уров.	N набл. В	N набл. АВ	2-х стор точный р
65,5	39,5	20,5	-0,266667	0,789726	-0,288774	0,772754	9	5	0,797203

Как выяснилось, исходя из полученных результатов индуцированной хлористым лантаном агрегации эритроцитов, существуют определенные различия в этом процессе между разными группами крови. Сравнение производилось попарно, между разными группами крови.

Так, статистически достоверным являются полученные различия между А и АВ группами крови: эритроциты последней подвергались агрегации при значительно большей концентрации хлористого лантана. Аналогично, для

достижения агрегации эритроцитов В группы крови требовалась большая концентрация хлористого лантана, чем для О группы крови.

Достоверных различий между В и АВ группами крови в отношении необходимой для наступления агрегации концентрации хлористого лантана выявлено не было. Также, не обнаружилось различий при сравнении пары О и А групп крови.

Снижение электрического заряда эритроцитов в результате взаимодействия с ионами лантана демонстрирует небольшое наблюдение, сделанное в ходе проведения основного опыта. Все образцы крови, всех групп, показали сходную реакцию на добавление в опытный раствор, содержащий эритроциты и хлористый лантан в недостаточной для развития агрегации концентрации, интактных эритроцитов соответствующей группы крови. Смешивание двух растворов не производилось, интактные эритроциты вносились в опытный раствор по кромке жидкости, так, чтобы образовалась четкая линия границы двух растворов. На границе раздела сред наблюдалась отчетливая агрегация эритроцитов. Подобное наблюдение дополнительно иллюстрирует снижение заряда опытных эритроцитов, за счет воздействия ионов лантана, что приводит к их агрегации с интактными, сохранившими прежний заряд клетками.

Исходя из известного механизма влияния ионов лантана на эритроциты, можно сделать вывод о неодинаковом электрическом заряде эритроцитов различных групп крови. Для инактивации поверхностного заряда клеток, в результате чего происходит их агрегация, требуется определенное количество ионов хлористого лантана. Соответственно, необходимая концентрация раствора хлористого лантана, будет зависеть от поверхностного заряда эритроцитов.

Как известно, отрицательный электрический заряд эритроцитов формируется за счет расположенных на поверхности клетки молекул сиаловой кислоты. Установлено, что расположение типоспецифичных антигенов АВО относительно молекул сиаловой кислоты, и подтипы сиалогликопротеидов зависят от групповой принадлежности крови. Предполагается, что структурные особенности взаиморасположения сиаловых кислот и групповых антигенов АВО

могут влиять на стабильность молекул сиаловой кислоты. Таким образом, полученное в ходе сравнения индуцированной агрегации эритроцитов различие может быть объяснено особенностями конфигурации гликокаликса эритроцитов, либо разницей в абсолютной величине электрического заряда. [59, 71, 86]

Для уточнения характера электрических свойств эритроцитов было произведено сравнение электрофоретической подвижности эритроцитов, принадлежащих к разным группам крови АВО. Как известно, заряженные частицы в растворе электролита обладают способностью перемещаться под влиянием внешнего электрического поля. Эритроциты, имеющие отрицательный поверхностный заряд, окруженные ионным бислоем, также способны к электрофоретической подвижности. Данный феномен не зависит от взаиморасположения молекул сиаловой кислоты и типоспецифических антигенов на поверхности эритроцита, поскольку изучаемым аспектом является величина электрического заряда клетки. Электрическое поле заряженной частицы, являющееся основным агентом электростатических взаимодействий невозможно экранировать каким-либо образом в данных условиях. От формы и размеров эритроцита процесс электрофоретической подвижности также не зависит. Различными авторами, экспериментальным путем, был установлен диапазон скоростей электрофоретической подвижности эритроцитов и средние значения. Немало исследований было посвящено изучению изменений электрофоретической подвижности эритроцитов под влиянием различных патологических состояний организма человека. [2, 26, 36, 72]

В описании опытов с электрофоретической подвижностью эритроцитов, приведенных в научной литературе, не удалось обнаружить дифференцировки используемых препаратов крови по групповой принадлежности. Между тем, если допустить, что электрический заряд эритроцитов разных групп крови неодинаков по величине, можно ожидать ошибки в проводимых расчетах по изменению электрофоретической подвижности эритроцитов при патологических состояниях организма.

Наблюдения за работой электрической схемы прибора, предназначенного для определения электрофоретической подвижности эритроцитов, показали значительные колебания напряжения тока в зоне электрофоретической ячейки. Данный феномен обусловлен разложением электролита под действием электрического тока и закономерными изменениями его сопротивления. Несомненно, что нестабильность напряжения тока в электрической схеме также приведет к ошибкам измерений электрофоретической подвижности эритроцитов. С целью нивелирования подобного эффекта были внесены следующие модификации в электрическую схему: введение в электрическую цепь стабилитрона, служащего для выравнивания напряжения, и использование минимально возможного напряжения тока. Проведенные модификации методики регистрации электрофоретической подвижности основывались на патентованных разработках. [34, 49, 50]

Слабый раствор хлорида натрия в воде подвергается гидролизу при напряжении тока примерно в 2,3В, но при столь малых значениях напряжения тока практически не происходит заметной электрофоретической подвижности клеток. Опытным путем было определено значение напряжения тока в используемой электрической цепи – 4,2В, что позволяло наблюдать и фиксировать электрофоретическую подвижность эритроцитов, и в то же время, ограничивало скорость разложения электролита. Разведение цельной крови составило 1:4000, время инкубации не более суток с момента забора, одинаковое для всех образцов крови. Регистрация подвижности эритроцитов производилась посредством видеосъемки, что позволило в дальнейшем обработать данные в специальной программе и точно определить пройденное эритроцитами расстояние за наблюдаемый промежуток времени.

Поскольку основной задачей данного опыта было установление имеющихся различий в электрофоретической подвижности эритроцитов разных групп крови АВО, наиболее удобным представлялось разбить все полученные значения скорости на интервалы, с последующим сравнением количества эритроцитов той или иной группы крови в конкретном интервале.

Определение скорости движения эритроцитов в электрическом поле производилось посредством анализа отдельных последовательных кадров видеозаписи, сделанной в процессе опыта. В программе ScopePhoto 3.0, поставляемой в комплекте с видеоокуляром Levenhuk C310 для микроскопа, представляется возможным разделить полученную видеозапись на отдельные кадры. Временной интервал между двумя сравниваемыми кадрами составлял 10 (десять) секунд. Также, данная программа позволяет производить измерения размеров рассматриваемого объекта после предварительной калибровки. В данном случае калибровка производилась по сторонам малых квадратов камеры Горяева, длина которых, как известно, составляет 50мкм. На приведенных ниже **рисунках 3 и 4**, показан процесс расчета пройденного эритроцитом расстояния за известный промежуток времени.

Рисунок 3 Первый кадр

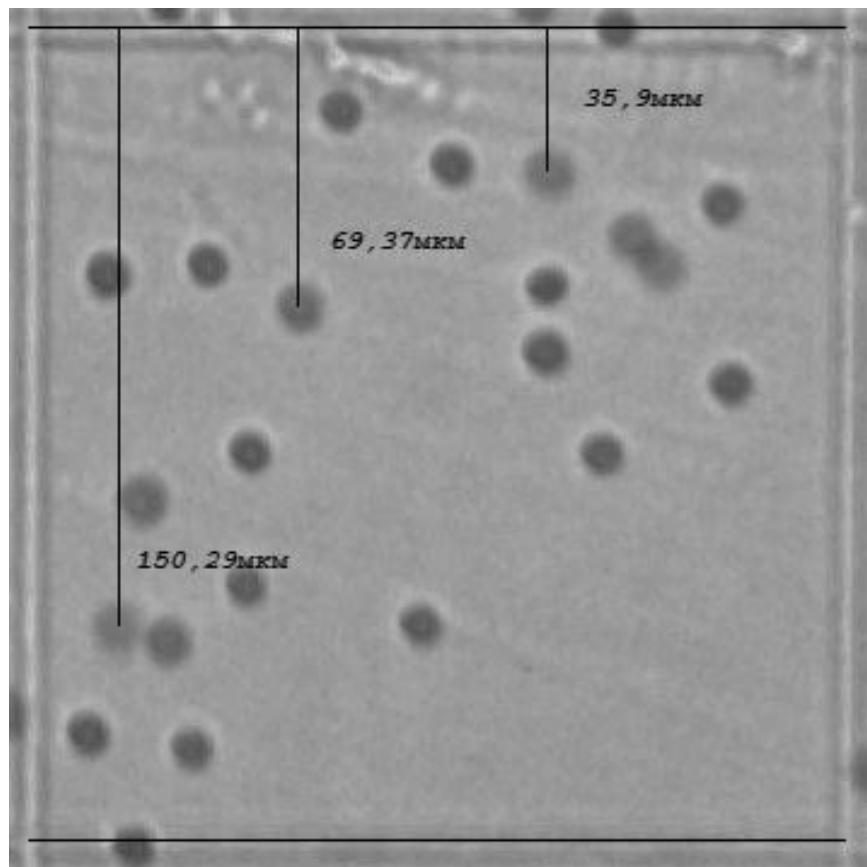
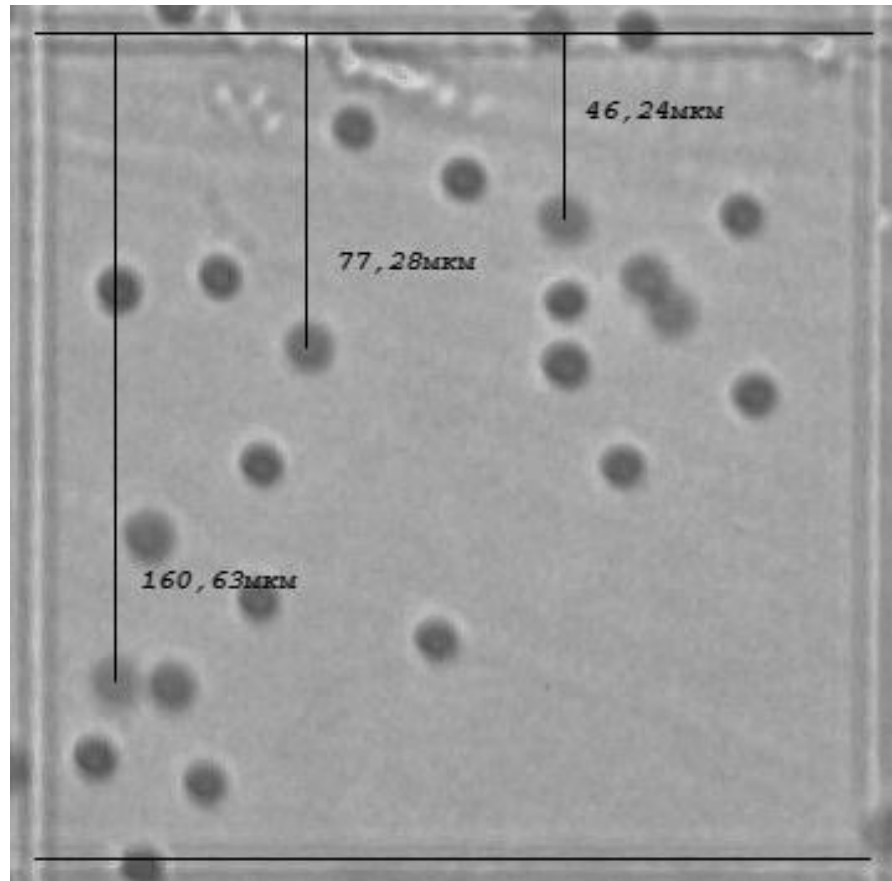


Рисунок 4 Второй кадр, спустя 10 секунд



Как можно заметить, на эритроциты на рисунках имеют разную четкость. Фокус микроскопа устанавливался на линии сетки камеры Горяева, поэтому наиболее четкими выглядят эритроциты, находящиеся ближе к дну камеры. Данная группа состоит из уже осевших клеток, которые практически не перемещаются под действием электрического поля используемой напряженности, вероятнее всего за счет сил трения. Высота камеры Горяева в области площадки с нанесенной сеткой составляет 0,1мм. Нормальная скорость оседания эритроцитов составляет 2-15мм/ч для женщин и 1-10мм/ч для мужчин. Данные значения рассчитаны для цельной крови, а в препарате отмытых эритроцитов клетки оседают быстрее за счет отсутствия белков. Даже если принять скорость оседания эритроцитов в используемом препарате крови за 10мм/ч, в рабочем объеме камеры данный процесс займет порядка 30-40 секунд. Данное обстоятельство обуславливало определенную оперативность в исполнении опыта и максимально доступное время видеозаписи. Эритроциты, контуры которых выглядят

размытыми – основная опытная группа. Данные клетки располагаются в слое раствора между дном камеры и покровным стеклом, и способны перемещаться под действием электрического поля, неизбежно оседая, спустя непродолжительное время.

Полученные значения скорости эритроцитов распределялись по интервалам, в количественном и процентном соотношении от общего количества измерений для каждой группы крови. Переходные значения скорости распределялись согласно правилу: включительно, соответственно нижнему пределу интервала. Данные распределения приведены в **таблицах 3 и 4**

**Таблица 3** Распределение значения ЭФП эритроцитов разных групп крови по интервалам (в % от общего числа)

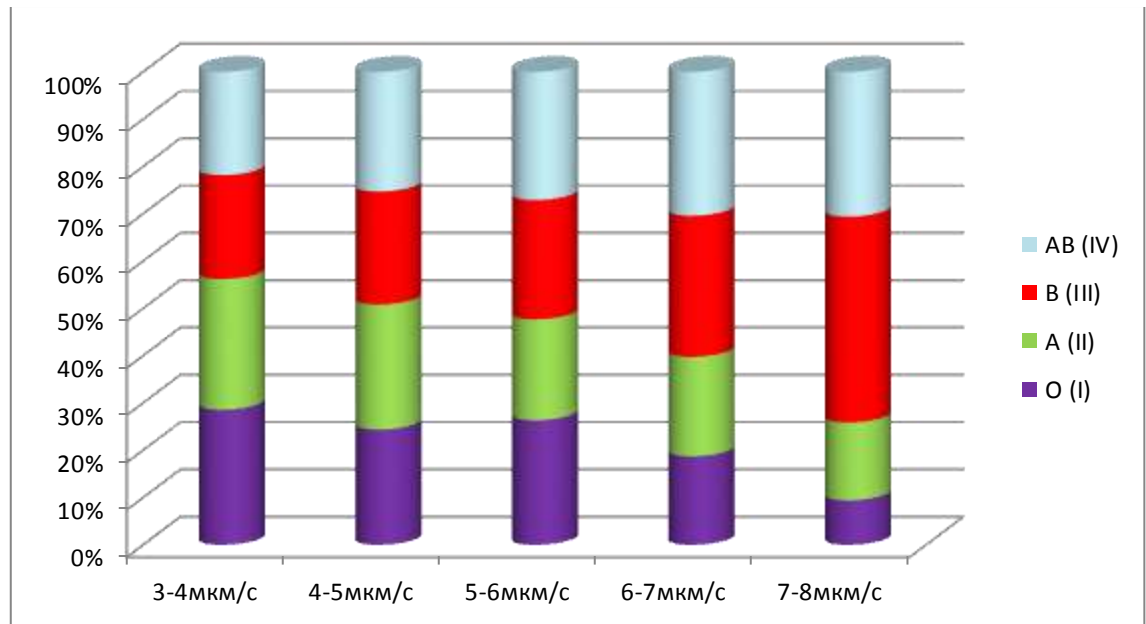
	3-4мкм/с	4-5мкм/с	5-6мкм/с	6-7мкм/с	7-8мкм/с
О (I)	46,50%	26,25%	17,25%	8%	2%
А (II)	45%	28,50%	14%	9%	3,50%
В (III)	35,75%	25,75%	16,50%	12,75%	9,25%
АВ (IV)	35,50%	27,25%	17,75%	13%	6,50%

**Таблица 4** Распределение ЭФП эритроцитов разных групп крови по интервалам (абсолютное количество)

	3-4мкм/с	4-5мкм/с	5-6мкм/с	6-7мкм/с	7-8мкм/с
О (I)	186	105	69	32	8
А (II)	180	114	56	36	14
В (III)	143	103	66	51	37
АВ (IV)	142	109	71	52	26

Для большей наглядности, распределение эритроцитов по интервалам скоростей, представлено в графическом виде, на **рисунке 5**.

Рисунок 5 Распределение ЭФП эритроцитов по интервалам скоростей



Средние значения скорости электрофоретической подвижности эритроцитов разных групп крови системы АВО составили:  $4,43 \pm 0,26$  мкм/с (О группа крови),  $4,48 \pm 0,28$  мкм/с (А группа крови),  $4,91 \pm 0,38$  мкм/с (В группа крови),  $4,78 \pm 0,31$  мкм/с (АВ группа крови).

Достоверность различий между величиной электрофоретической подвижности эритроцитов разных групп крови оценивалась попарно, с использованием t-критерия Стьюдента для  $p < 0,05$ .

Здесь:  $n$  - число степеней свободы ( $n = 8$ )

$m$  – ошибка средней величины

$t$  – значение критерия Стьюдента ( $t_{кр} = 2,3$ )

С целью выявить имеющиеся различия в скоростях электрофоретической подвижности эритроцитов разных групп крови, сравнение производилось для каждого интервала скоростей, причем группы крови сравнивались попарно. Иными словами, сравнивалось количество эритроцитов каждой группы крови, достигнувших за время наблюдения определенной скорости в электрическом поле

Статистический анализ приведен в **таблице 5**



Таблица 5 Статистический анализ различий скоростей электрофоретической подвижности эритроцитов

	Интервалы скоростей электрофоретической подвижности				
	3-4мкм/с	4-5мкм/с	5-6мкм/с	6-7мкм/с	7-8мкм/с
<b>m (O)</b>	2,49	2,20	1,89	1,36	0,70
<b>m (AB)</b>	2,39	2,23	1,91	1,68	1,23
<b>t</b>	<b>3,18*</b>	0,31	0,18	<b>2,31*</b>	<b>3,17*</b>
<b>m (O)</b>	2,49	2,20	1,89	1,36	0,70
<b>m (B)</b>	2,40	2,19	1,86	1,67	1,45
<b>t</b>	<b>3,1*</b>	0,16	0,28	2,2	<b>4,5*</b>
<b>m (O)</b>	2,49	2,20	1,89	1,36	0,70
<b>m (A)</b>	2,49	2,26	1,73	1,43	0,92
<b>t</b>	0,42	0,71	1,26	0,5	1,29
<b>m (A)</b>	2,49	2,26	1,73	1,43	0,92
<b>m (AB)</b>	2,39	2,23	1,91	1,68	1,23
<b>t</b>	<b>2,75*</b>	0,39	1,45	1,81	1,95
<b>m (A)</b>	2,49	2,26	1,73	1,43	0,92
<b>m (B)</b>	2,40	2,19	1,86	1,67	1,45
<b>t</b>	<b>2,67*</b>	0,87	0,98	1,7	<b>3,34*</b>
<b>m (B)</b>	2,40	2,19	1,86	1,67	1,45
<b>m (AB)</b>	2,39	2,23	1,91	1,68	1,23
<b>t</b>	0,07	0,47	0,46	0,1	1,44

Распределение скоростей движения эритроцитов в электрическом поле оказалось неоднородным как при сравнении разных групп крови, так и в пределах одной группы крови. Последнее, вероятнее всего, обусловлено различиями в возрасте клеток, а также неодинаковым удалением эритроцитов от источника электрического поля. Скорость движения эритроцитов варьировала от 3 до 8 мкм в секунду, или, в пересчете на внесистемную единицу измерения (ЭФП): от 0,71 до 1,9 мкм\*см\*В<sup>-1</sup>\*с<sup>-1</sup>.

Стоит отметить, что хотя разброс полученных значений электрофоретической подвижности оказался весьма высок: от 0,71 до 1,9 мкм\*см\*В<sup>-1</sup>\*с<sup>-1</sup>, среднее значение электрофоретической подвижности эритроцитов, без дифференциации по группам крови, составило 1,19 мкм\*см\*В<sup>-1</sup>\*с<sup>-1</sup>, что примерно соответствует литературным данным. Таким образом, изучение вариабельности электрофоретической подвижности без дифференцировки по группам крови может привести к искаженным результатам, за счет неодинакового изменения этой величины у разных эритроцитов.

Способность эритроцитов В и АВ групп крови перемещаться со скоростью выше 7 мкм/с достоверно выше, чем у эритроцитов О группы крови (t=4,5 и t=3,17, соответственно). Также, среди эритроцитов В группы крови, достоверно чаще встречались способные перемещаться со скоростью более 7 мкм/с, в сравнении с эритроцитами А группы крови (t=3,34).

В интервале скоростей 3-4 мкм/с, отмечается преобладание частоты встречаемости эритроцитов О группы крови, в сравнении с В и АВ группами крови (t=3,1 и t=3,18, соответственно), что выглядит логичным, и дополнительно подтверждает полученную закономерность.

Аналогично, частота встречаемости эритроцитов А группы крови в интервале скоростей 3-4 мкм/с, превалирует над таковой у эритроцитов В и АВ групп крови (t=2,67 и t=2,75, соответственно).

Статистически достоверных различий в электрофоретической подвижности между эритроцитами В и АВ групп крови, а также, между эритроцитами О и А групп выявлено не было.

Корреляционный анализ производился с использованием критерия корреляции Пирсона, и для всех сравниваемых пар значений находился в интервале  $0,9 < r < 1$ .

Известно, что частицы, обладающие более высоким зарядом, покажут наибольшую скорость движения в электрическом поле. Полученные в ходе эксперимента результаты свидетельствуют об относительно более высоком электрическом заряде эритроцитов В и АВ групп крови, по сравнению с остальными, что соотносится с результатами эксперимента индуцированной агрегации эритроцитов. Как уже упоминалось, от взаиморасположения различных молекул на поверхности эритроцита, от его формы и размеров, данный результат не зависит.

Таким образом, в ходе двух сравнительных исследований, удалось установить различие в электрическом заряде эритроцитов разных групп крови АВО. Наибольшим электрическим зарядом обладают эритроциты В и АВ групп крови, а наименьшим – О группы крови.

Как можно было бы ожидать, исходя из существования т.н. электрического распора между эритроцитами, за счет кулоновских сил, лица-носители антигенов В и АВ должны обладать большей устойчивостью к агрегации эритроцитов и нарушениям кровообращения ишемического характера. Однако, практические наблюдения не соответствуют подобному предположению. Обобщая результаты настоящего исследования, и ранее выполнявшихся работ, наличие у человека В и АВ групп крови определенно служит фактором риска развития кардио- и цереброваскулярных заболеваний.

Для разрешения возникшего противоречия необходимо обратиться к некоторым аспектам патофизиологии инсультов.

Как известно, ишемический атеротромботический инсульт в основе своего патогенеза имеет тромбоз церебральных артерий на фоне атеросклеротического поражения. Здесь одновременно участвуют несколько патологических факторов, представляющих определенную степень риска развития тромбоза. Среди подобных факторов стоит отметить изменение функционирования системы

гемостаза в силу различных причин, повреждение эндотелия сосудов вследствие атеросклероза, сдвиг метаболических параметров организма за счет приобретенных заболеваний, нарушение агрегации форменных элементов крови.

[11, 56]

Поражение атеросклерозом участка сосуда приводит к нарушению структуры интимы, потере эластичности сосудистой стенкой, изменениям вязкости крови на данном отрезке сосудистого русла за счет механического препятствия току крови, локального воспалительного процесса. Данные патологические изменения способны инициировать тромбообразование в любой момент, однако, защитные противосвертывающие механизмы способны противостоять развитию тромбоза достаточно долгое время. Тем не менее, любое, даже кратковременное, дестабилизирующее влияние, внешнего или внутреннего генеза, может привести к нарушению компенсации и развитию тромбоза поврежденного участка сосуда. Среди возможных дестабилизирующих факторов можно отметить психо-эмоциональный стресс, обезвоживание, в том числе вследствие употребления алкоголя, резкое изменение осмотических параметров крови, значительное повышение артериального давления. [1]

В первой части настоящего исследования, параллельно с определением встречаемости различных групп крови АВО среди лиц, перенесших ишемический инсульт, был проведен анализ показателей свертывания крови. Изучались результаты коагулограммы, выполненной пациентам с ишемическим инсультом, при поступлении в неврологическое отделение. Известно, что в подобных случаях отмечается повышение вязкости крови, усиление агрегации форменных элементов и иные девиации в функционировании системы гемостаза, сохраняющиеся определенное время после наступления ишемического инсульта. Для сравнительного анализа избраны три показателя: МНО и ПТВ, как отражающие функционирование внешнего пути свертывания крови, и АПТВ, соответственно, для внутреннего пути свертывания крови. Сравнение проводилось графическим образом, с нормальным распределением.

Поскольку в данном случае наиболее актуальным являлся вопрос функционирования системы гемостаза у пациентов, перенесших ишемический инсульт, выборка по подтипу ишемического нарушения мозгового кровообращения не проводилась. В связи с этим, распределение групповой принадлежности крови в опытной группе носит своеобразный характер, впрочем, можно отметить преобладание В группы в опытной группе, в сравнении с контролем. В качестве контрольной группы использовались ранее отобранные лица, участвовавшие в первой части настоящей работы.

**Таблица 6** Распределение групп крови среди пациентов, перенесших нарушение мозгового кровообращения ишемического характера и здоровых лиц

Контрольная группа			Опытная группа		
Группа крови	Количество человек	%	Группа крови	Количество человек	%
О (I)	151	32,54	О (I)	13	26,0
А (II)	181	39,01	А (II)	17	34,0
В (III)	104	22,41	В (III)	15	30,0
АВ (IV)	28	6,03	АВ (IV)	5	10,0

Полученные значения МНО, ПТВ, АПТВ в графическом представлении сравнивались с распределением Гаусса. Согласно существующим критериям, в качестве «нормы» были приняты следующие значения: МНО (0,85-1,25), ПТВ (10-14с), АПТВ (30-40с). Полученные значения распределялись по интервалам, для удобства последующей оценки. Графическое отображение распределения значений ПТВ, МНО и АПТВ приведены на **рисунках 6,7 и 8**.

Рисунок 6 Распределение ПТВ

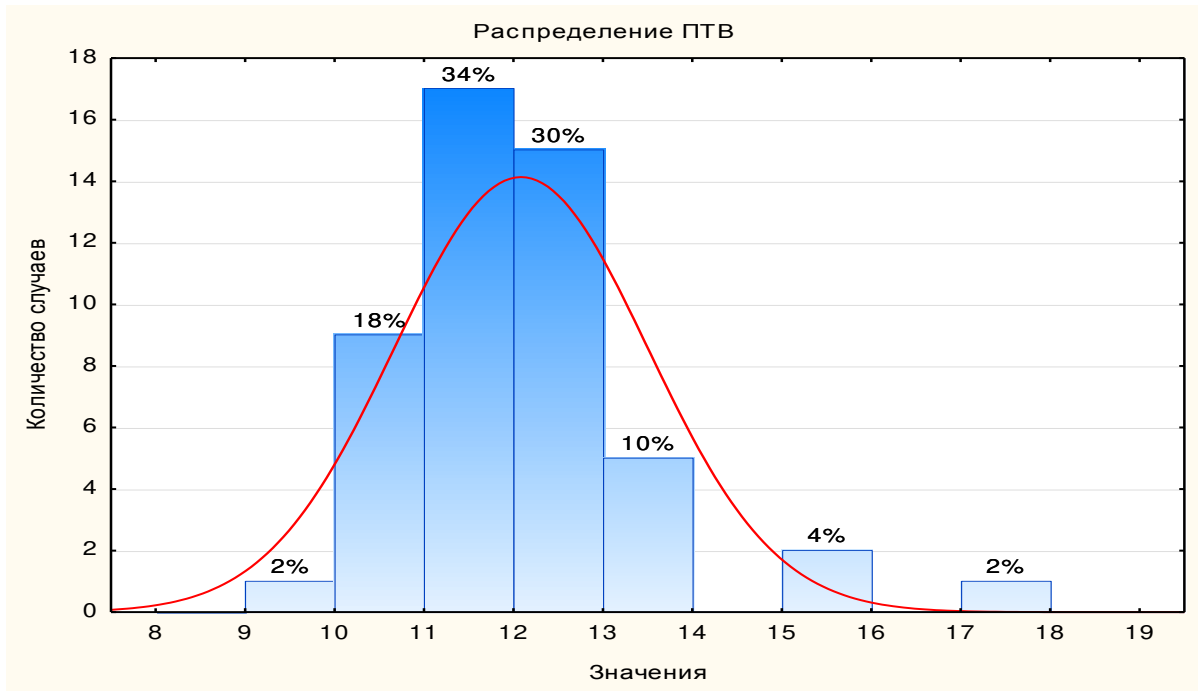


Рисунок 7 Распределение МНО

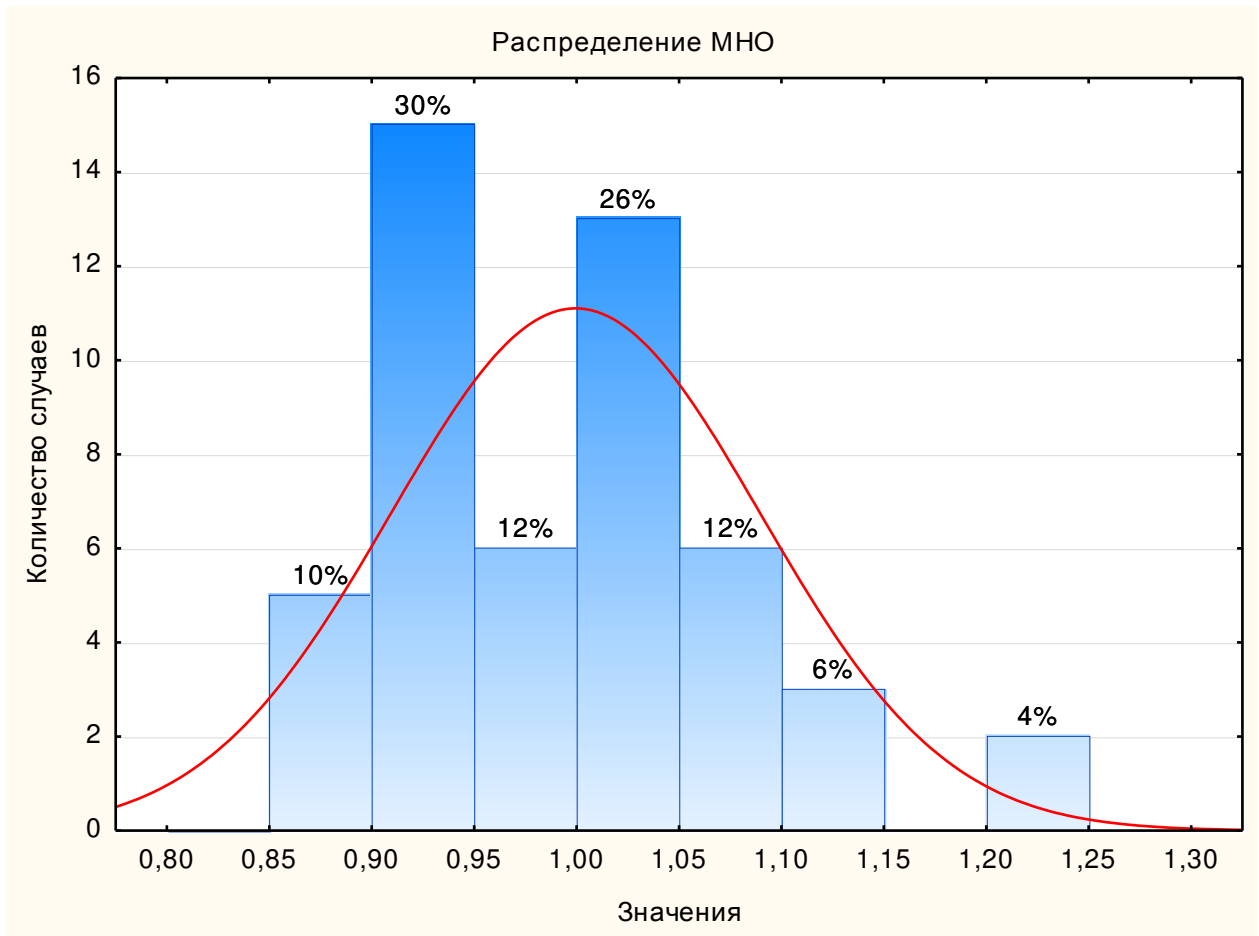
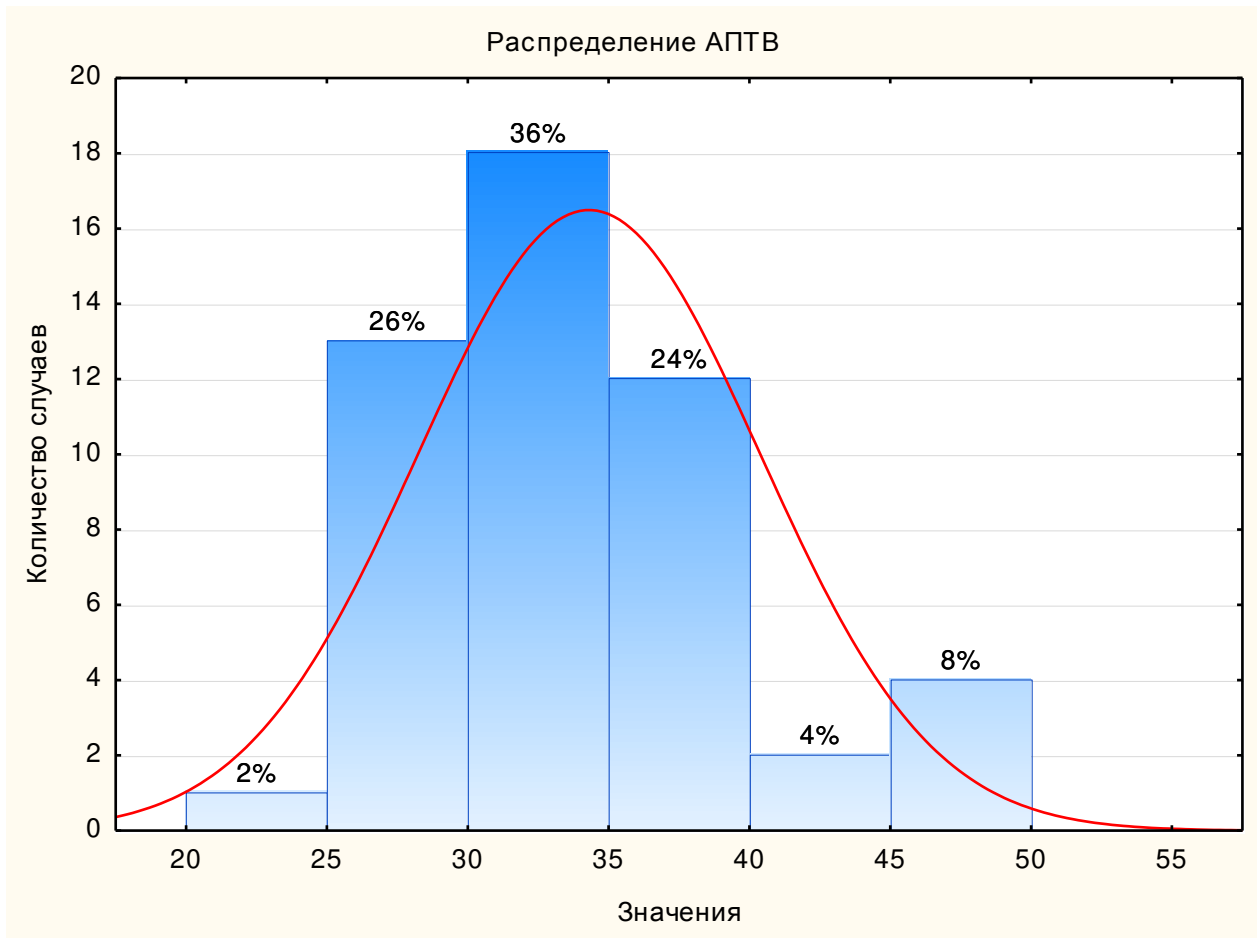


Рисунок 8 Распределение АПТВ



Как можно видеть из представленных диаграмм, а также результатов оценки по критерию Шапиро-Уилкса, все три исследуемых параметра не отличаются от нормального распределения. При известном значении  $W_{\text{таб}} = 0,0035$  для данных  $n$  (50) и  $k$  (25), значения статистики  $W$  составляют: 0,8776 (ПТВ), 0,9177 (АПТВ) и 0,9349 (МНО).

Между тем, значения АПТВ значительно выходят за пределы нижней границы среднего нормативного интервала (30-40с), т.е. соответствуют гиперкоагуляции.

Здесь надо отметить, что ПТВ и МНО отражают внешний путь свертывания крови, в то время как АПТВ – внутренний. Как известно, внутренний путь свертывания крови не требует для своей реализации тканевого фактора, поэтому значимого острого повреждения сосудистой стенки при ишемическом инсульте, по-видимому, не происходит. Данный путь свертывания крови считается более

медленным, за счет участия в процессе большего количества факторов свертывания.

В полученных результатах наблюдался отчетливый сдвиг значений АПТВ в сторону гиперкоагуляции, при значениях МНО и ПТВ не выходящих за границы медицинской нормы. Определенно, в изученных случаях, образование тромба в ходе развития инсульта, происходило по внутреннему пути, т.е. с необязательным участием тканевого фактора, невзирая на то, что в тканях головного мозга тканевой фактор представлен в значительном количестве. В известной степени, данное наблюдение позволяет исключить из пусковых причин развития ишемического инсульта альтерацию эндотелия, в том числе за счет повышения напряжения сдвига в атеросклеротически измененных участках сосудов.

Как упоминалось ранее, существует зависимость между активностью факторов свертывания крови и генотипом АВО. В ходе сравнительных исследований отмечалось повышенное количество фактора Виллебранда, за счет специфического гликозилирования, у всех людей, кроме носителей О группы крови. Также, у лиц с группами крови А, В, АВ повышена активность VIII фактора и XIII факторов, где последний отвечает за стабильность фибринового сгустка. В этом отношении также показательны результаты исследования свертывания крови у пациентов с облитерирующим атеросклерозом, где амплитуда ретракции и фибринолиза уменьшена у людей со А, и, вероятно, АВ группами крови. [62]

Логично допустить, что в условиях патологически измененной сосудистой стенки, нарушения локального кровотока с изменением напряжения сдвига, создаются значимые предпосылки для агрегации форменных элементов крови с последующим развитием тромбоза. В подобных условиях любые возможные отклонения в активности факторов свертывания крови могут оказаться результирующими в отношении развития острого тромбоза пораженной артерии.

Тем не менее, анализируя данную точку зрения, нельзя не задать закономерный вопрос: как еще может проявить себя повышенная активность факторов свертывания крови, до наступления ишемического инсульта? Здесь



следует принять во внимание, что синтез факторов свертывания генетически обусловлен, и более-менее равномерен в течение жизни человека. Соответственно, повышенная активность фактора Виллебранда, например, вполне может проявить себя не только в отношении повышенного риска развития ишемического инсульта.

Существует ряд работ, где производился сравнительный анализ встречаемости групп крови АВО среди пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В результатах проведенных исследований также отмечается более частая встречаемость групп крови А, В и АВ среди пациентов, перенесших инфаркт миокарда или страдающих ишемической болезнью сердца. [32, 105, 161]

Средний возраст лиц с сердечно-сосудистыми заболеваниями определенно меньше, чем с цереброваскулярными, в том числе перенесших ишемический инсульт. Между тем, показатели летальности острого инфаркта миокарда достаточно высоки, особенно если он развивается в относительно молодом возрасте. Рассуждая логически, можно предполагать, что генетически обусловленная повышенная активность факторов свертывания могла бы привести к массовым тромбозам в разных сосудистых бассейнах в более раннем относительно среднего для ишемического инсульта возрасте. Не исключается высокая частота повторений ишемических атак. Подобное развитие событие могло бы иметь место, если бы речь шла о серьезной модификации системы гемостаза, обусловленной генетически. В реальности, подобной картины не наблюдается. В ситуации с кардио- и цереброваскулярными заболеваниями, групповая принадлежность крови, как фактор риска, по-видимому, участвует лишь в связи с прочими факторами риска. В случаях перенесенной ишемической атаки, кардиальной или церебральной локализации, относительно редкая повторяемость подобного состояния может быть обусловлена компенсаторной активацией противосвертывающей системы, неоваскуляризации и повышения устойчивости тканей к гипоксии. Не менее вероятен иной вариант: лица, страдающие сердечно-сосудистой патологией, в том числе перенесшие острый инфаркт миокарда, как правило, принимают по назначению врача антиагреганты.

Характерным представителем данной группы препаратов является ацетилсалициловая кислота, блокирующая ЦОГ-2 в тромбоцитах, и, следовательно, препятствующая образованию тромбоксана А<sub>2</sub> – одному из активаторов агрегации тромбоцитов.

Между тем, в изученной литературе, посвященной вопросам встречаемости различных фенотипов АВО среди лиц, страдающих кардио- и цереброваскулярными заболеваниями, не удалось обнаружить контроля приема антиагрегантов среди обследуемых людей. Если не уделить внимания изучению анамнеза пациента с ишемическим инсультом, принимаемым им лекарственным препаратам, то неизбежны ошибки при расчетах частоты встречаемости различных групп крови при ишемическом инсульте. Соответственно, возможно искажение соотношения групп крови в популяции, прогрессирующее с увеличением возраста обследуемых лиц. Данная аберрация может зависеть от нескольких факторов: увеличения в популяции доли лиц, принимающих антиагреганты, и уменьшение в популяции доли лиц, страдающих кардиоваскулярными заболеваниями, за счет летальности.

Как упоминалось выше, принцип формирования группы контроля в первой части настоящего исследования предусматривал все вышеописанные аспекты. Именно поэтому группа контроля набиралась из людей различного возраста, и без известных кардио- или цереброваскулярных заболеваний.

Несомненно, что повышенная активность факторов свертывания крови у всех людей, кроме лиц-обладателей О группы крови, играет важную роль в риске развития сосудистых тромбозов, однако в полной мере эта роль проявляется, по-видимому, в сочетании с прочими патологическими факторами.

По итогам данного исследования сделаны выводы, в отношении нарушений электростатического взаимодействия клеток и молекул крови, что может служить дополнительным фактором повышенного риска развития инсульта у людей с В и АВ группами крови. Как известно, процесс свертывания крови включает в себя агрегацию форменных элементов, с участием электростатического взаимодействия, как неотъемлемого механизма развития тромба. Здесь нужно

учитывать, что электростатические взаимодействия клеток и тканей, как и прочие физиологические ассоциации претерпевают значительные изменения в патологических условиях.

Процессы атеро- и атеросклероза, особенно в сочетании с артериальной гипертензией, закономерным образом приводят к повышению ригидности сосудистой стенки, извитости сосуда, и нарушению функционирования эндотелия. Вследствие неспособности сосуда расширяться в ответ на увеличение объема проходящей крови возрастает напряжение сдвига кровотока. Это, в свою очередь, ведет к ускорению тромбоцитарного дрейфа на периферию потока крови, выделению тромбопластина эндотелиоцитами. Благодаря скоплению тромбоцитов поблизости от люминального слоя интимы становится возможным тромбообразование, которое на относительно прямых участках сосудов носит характер пристеночного, мало влияющего на просвет сосуда, а на извитых – сосредоточено по внутренним полуокружностям изгибов. Последний вариант протекает с возможностью значимого сужения просвета сосуда.

Атеросклеротическое поражение сосудистой стенки с развитием стеноза приводят к нарушению местного кровотока, образованию тромба. Замедление кровотока в пораженных участках сосуда позволяет тромбоцитам с большей вероятностью контактировать с интегральным белком тканевого фактора эндотелия, что приводит к активации свертывающей системы в условиях нарушений защитных функций эндотелия. В отсутствие стеноза тромботические массы равномерно покрывают поврежденную поверхность сосуда, в противном же случае тромб распространяется по ходу течения крови, увеличиваясь в размерах, в том числе растет число активированных тромбоцитов.

Присутствие эритроцитов в зоне образования тромба ограничивает его вертикальный рост за счет механического воздействия. Так, сформировавшийся в присутствии эритроцитов первичный тромбоцитарный тромб обладает меньшими вертикальными размерами. [4, 43, 113, 132]

Вследствие прогрессирования процессов атеросклероза и пристеночного тромбообразования, нарушается нормальный обмен веществ между сосудистым

руслом и тканью мозга, преимущественно, в отношении поступления кислорода. В прямых участках сосуда гипоксия развивается за счет повышенной скорости кровотока, в извитых — вследствие сужения просвета сосуда и стаза форменных элементов. Хроническая ишемия головного мозга, развивающаяся вследствие атеросклероза сосудов и снижения мозговой перфузии, приводит к компенсаторной активации анаэробного гликолиза в пораженных зонах. Этот процесс постепенно приводит к накоплению молочной кислоты и ионов водорода, что влечет за собой развитие тканевого ацидоза. [11]

В различных экспериментах, добавление кислоты к суспензии эритроцитов приводит их в состояние изоэлектрической точки. Необходимое количество кислоты зависит, прежде всего, от времени экспозиции. Проведенные исследования поведения коллоидных частиц в суспензии показали, что наибольшая устойчивость перед агрегацией наблюдается в растворах с щелочной реакцией, против кислой. В нейтральной же среде, называемой изоэлектрической точкой (когда заряд частицы равен нулю), устойчивость суспензии минимальна. [69, 125]

В условиях хронической гипоксии и ацидоза возникает дефицит АТФ, увеличивается проницаемость биологических мембран за счет структурных переходов в белках и липидах и процессов перекисного окисления липидов. В большом количестве образуются свободные радикалы и токсичные перекисные соединения. Окислительный стресс приводит к прогрессирующему повреждению эндотелия, мембран тромбоцитов, эритроцитов за счет повышения концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , истощения запасов АТФ, нарушения вязкостно-эластических свойств мембран. Нарушается деформируемость эритроцита, и прочность его мембраны. За счет локального увеличения ионной силы плазмы крови и изменения соотношения ионов во внешней и внутренней среде клеток, происходит снижение отрицательного электрического заряда внешней поверхности мембраны эритроцита, с последующим уменьшением расстояния между эритроцитами. [3, 35]

В физиологических условиях, отрицательный электрический заряд поверхности эндотелиальных клеток препятствует адгезии и агрегации форменных элементов крови. Данный механизм, разумеется, функционирует в неразрывной связи с секретируемыми эндотелиоцитами антикоагулянтами, например, простациклином. В то же время, за счет дегенеративных процессов в сосудистой стенке, происходит снижение ее электрического заряда, что в условиях повышенной ионной силы плазмы крови на локальном отрезке сосудистого русла также может привести к снижению электрического распора между форменными элементами и эндотелием, повышенной агрегации и адгезии, дальнейшему замедлению кровотока.

В случае повреждения эндотелия и последующей активации тромбоцитов, запускается каскад реакций гемостаза, протекающих на поверхности эндотелия или активированных тромбоцитов. В литературе описана важность отрицательного электрического заряда эндотелия, микровезикул для связывания и активации факторов свертывания крови в присутствии ионов кальция. Здесь стоит различать роли электрического поля и отдельных заряженных молекул. Так, электрическое поле может существовать и без непосредственного контакта заряженных молекул с плазмой крови или факторами свертывания. Необходимая для существования электрического распора между клетками разность потенциалов – функция электрического поля, а образование активной зоны (кластера) для прикрепления и активации факторов свертывания – функция отдельных отрицательно заряженных молекул. В данном случае, баланс между двумя электродинамическими процессами обеспечивается исходной величиной электрического поля клетки и степенью повреждения эндотелия, например. [28, 53]

Эритроциты, ввиду своей многочисленности, являются ключевым звеном в поддержании реологических свойств крови, обеспечении нормальной оксигенации тканей.

Отрицательный заряд эритроцитов, несомненно, также служит важным фактором предупреждения спонтанной агрегации. Неизбежным признается

снижение величины поверхностного заряда в ходе возрастных изменений отдельных клеток и организма в целом. На величину электрического заряда эритроцитов, помимо возрастных и групповых особенностей, влияет ряд других факторов. Так, изменение заряда может быть спровоцировано осаждением на поверхность эритроцитов различных веществ – эндогенного и экзогенного происхождения. Нельзя исключить влияние на электрические характеристики эритроцитов колебаний внешнего магнитного и электрического полей, что может быть следствием солнечной активности. Уменьшение заряда эритроцита происходит также при сдвиге рН плазмы крови в кислую сторону.

Как упоминалось ранее, заряженная частица в растворе электролита, привлекает ионы противоположного знака, образующие адсорбционный слой близ поверхности, обладающей зарядом. В свою очередь, к адсорбционному слою привлекаются ионы, одноименного заряда с исходной частицей. Эта группа ионов составляет так называемый диффузный слой. Получившаяся электрокинетическая система носит название двойного электрического слоя. Гидродинамические и вандерваальсовы силы стремятся сблизить два эритроцита, в то время как кулоновские силы противодействуют этому. В то же время, кулоновские силы могут привести к сближению и агрегации даже одноименно заряженных частиц, если различие в величине их заряда будет значительным. Применительно к эритроцитам, было замечено, что дистанция между ними увеличивается при снижении концентрации электролита в растворе, поскольку силы отталкивания возрастают с понижением ионной силы раствора, в то время как вандерваальсовы силы остаются неизменными. В условиях возрастания ионной силы раствора, которое может произойти, например, вследствие увеличения вязкости исходного, диффузный электрический слой уплотняется, расстояние между заряженными частицами уменьшается. В итоге, данный процесс может привести к агрегации заряженных частиц. [9, 40, 84]

Уменьшение содержания сиаловых кислот на поверхности эритроцитов, вкупе с повышением содержания в крови свободного фибриногена и сиаловых кислот приводит к усилению агрегации эритроцитов, что является характерным

предиктором острого нарушения коронарного или церебрального кровотока, а также может отражать интенсивность атеросклеротического процесса. Снижение содержания сиаловой кислоты на поверхности эритроцита, с одновременным повышением ее концентрации в плазме крови приводит к усилению влияния фибриногена на агрегацию эритроцитов. Повышение содержания сиаловой кислоты в плазме крови коррелирует с уровнем холестерина и сиализированного фибриногена, а также других факторов свертывания крови. Исследователями установлено, что взаимное притяжение эритроцитов, обусловленное адсорбцией фибриногена, существенно превышает отталкивающий эффект, создаваемый сиаловой кислотой. Для фибриногена также характерно изменение активности в зависимости от количества сиаловых кислот, расположенных на концах четырех углеводных цепей молекулы белка. Отщепление остатка сиаловой кислоты в данном случае приводит к ускорению полимеризации фибриногена. Структурные особенности расположения сиаловой кислоты на поверхности эритроцитов, в зависимости от групповой принадлежности крови могут влиять на ее стабильность. [53, 86, 103, 114, 128, 134, 154, 155]

Силы электроотталкивания даже между одинаково заряженными частицами возрастают с увеличением расстояния, а в условиях сближения клеток, особенно при имеющихся различиях в величине электрического заряда, начинают превалировать силы взаимного электростатического притяжения. [45]

В кровотоке, электростатическое взаимодействие эритроцитов протекает таким образом, что наиболее энергетически выгодным является расположение их обращенными друг к другу плоскостями. В условиях *in vitro* и при замедлении кровотока это проявляется образованием т.н. "монетных столбиков". Однако, подобная структура неустойчива перед броуновским движением. Поэтому эритроциты не формируют монетные столбики в растворе, содержащем только электролиты. Для формирования монетных столбиков требуется макромолекула, причем достаточной длины, например, фибриноген. Молекула должна быть заряжена отрицательно, или быть электрически нейтральной. Опыты показали, что такая макромолекула прикрепляется к рецепторам анионного транспорта

клетки. После образования монетных столбиков, последние формируют сферы одинакового диаметра. Движущей силой, в данном случае, является стремление к уменьшению поверхностной энергии. Если макромолекула имеет положительный заряд, то на поверхности клетки она связывается с сиаловой кислотой, формируя в итоге аморфные агрегаты. Величина заряда эритроцитов имеет прямое влияние на скорость и вероятность их агрегации, за счет поляризации ДЭС. [9, 40, 94, 115, 148]

Надо отметить, что электрический заряд различных компонентов крови (альбумины, глобулины, эритроциты, фибриноген) не является одинаковым по величине. Взаимное притяжение заряженных объектов наиболее четко проявляется в условиях вакуума, а в диэлектрической среде, какой является, например, плазма крови, данный процесс малозаметен. Однако, при значительной разнице в величине электрического заряда вполне возможно наблюдать притяжение одноименно заряженных объектов. В качестве примера подобного взаимодействия можно привести оседание белка фибриногена на поверхности эритроцита. Оба компонента крови имеют отрицательный заряд, однако величина заряда фибриногена значительно меньше, чем у эритроцита, вследствие чего взаимодействие между ними происходит так, как будто у фибриногена электрический заряд противоположного знака. Оседание молекул фибриногена на поверхности эритроцита, в свою очередь, уменьшает его электрический заряд. Подобным действием обладают и иные частицы, возникающие при патологических процессах в организме. Значение имеет не столько абсолютная величина поверхностного электрического заряда, сколько соотношение между зарядами двух различных клеток или молекул. [60]

Помимо фибриногена, осаждаться на поверхность эритроцита могут продукты его распада, инициированного плазмином. Данный процесс пропорционален концентрации данных белков в крови и не зависит от содержания ионов кальция, прочих белков плазмы и температуры. Отмечено определенное влияние на процесс адсорбции фибриногена значений рН и ионной силы раствора. Адсорбция фибриногена и продуктов его распада на эритроцитах



приводит к повышению агрегации эритроцитов и нарушает их способность к деформации. [19, 137]

В присутствии фибриногена, который связывается с эритроцитами, реализуется механизм агрегации эритроцитов с формированием «монетных столбиков», что приводит к дальнейшему нарушению вязкости крови. Не исключено, что активность процесса связывания фибриногена с поверхностью эритроцита зависит от величины электрического заряда последней. То есть, адсорбция фибриногена на поверхность эритроцитов В и АВ групп будет выше при прочих равных условиях, чем для эритроцитов других групп крови.

Таким образом, в общем виде процесс развития ишемического инсульта с точки зрения электростатических взаимодействий, может выглядеть следующим образом. Атеросклеротическое поражение сосуда, особенно в совокупности с артериальной гипертензией, реализует такие предпосылки для возникновения тромбоза, как повреждение сосудистой стенки, изменение величины просвета сосуда и возникновение извитости. Повышается жесткость сосудистой стенки, нарушение функциональной деятельности эндотелия в отношении секреции вазодилатирующих веществ.

Уменьшение просвета сосуда вкупе с возрастанием его жесткости приводит к ускорению тока крови на относительно прямых участках сосудистого русла. Нарастающее напряжение сдвига, в свою очередь, приводит к увеличению тромбоцитарного дрейфа из середины кровеносного потока, на периферию, что увеличивает риск развития пристеночного тромба. В то же время, повышенное напряжение сдвига приводит к экспрессии клетками эндотелия тканевого фактора. Особенно выражен данный процесс в условиях нарушения вазодилатирующей функции эндотелия, служащей компенсаторным механизмом. В условиях высокого напряжения сдвига происходит активация фактора Виллебранда, с последующей активацией тромбоцитов и лейкоцитов.

Ускорение кровотока закономерно ухудшает транспорт кислорода и глюкозы в ткани, что служит причиной развития хронической ишемии с последующим тканевым ацидозом. В то же время, извитость кровеносных

сосудов, и наличие тромботических отложений на стенках, приводит к нарушению ламинарного тока крови и провоцирует увеличение величины имеющегося пристеночного тромба.

Изменение рН окружающей среды, возникающее за счет гипоксического ацидоза, приводит к снижению мембранного потенциала эритроцитов. Данный процесс влечет за собой снижение дзета-потенциала, и, соответственно, уменьшение электрического распора между клетками, что увеличивает число соударений, особенно в местах сужения сосудов и повышения плотности форменных элементов. Также, изменяется пластичность мембраны, что выражается изменением формы эритроцита (эхиноцит) и затруднением его пассажа через капилляры малого калибра

Нарушение деформируемости эритроцитарной мембраны увеличивает риск разрушения клетки в условиях повышенной плотности форменных элементов и капилляров малого диаметра. Известно, что в процессе разрушения эритроцита выделяется ряд веществ, например, АДФ, служащей активатором для тромбоцитов, но и в том числе активаторов фибринолиза. Однако, как отмечалось выше, хорошим средством в отношении адгезии к поверхности эритроцита обладает как сам фибриноген, так и продукты его лизиса плазмином. Процесс адсорбции белковых молекул на поверхность эритроцитов существенно усиливается вследствие повреждения мембраны последних. Осаждение молекул на поверхность эритроцита уменьшает его электрический заряд, уменьшая величину сил электроотталкивания, соответственно, увеличивая число клеточных контактов в условиях патологически измененного кровотока. На локальном отрезке сосудистого русла, при наличии извитости с замедлением кровотока, создается область с повышенной концентрацией биологически активных веществ, различных ионов, тканевого детрита и пр. В подобных условиях неизбежно дальнейшее падение электрического заряда эритроцитов, причем стоит уточнить, что выявленные в ходе настоящего исследования различия в величине электрического заряда у эритроцитов, принадлежащих к разным группам крови АВО, являются *средней* величиной. То есть в кровотоке у каждого отдельно

взятого человека присутствуют эритроциты с различным поверхностным зарядом, вследствие вышеуказанных причин: адсорбция различных молекул, возрастные изменения и пр. Таким образом, агрегация принципиально возможна между двумя эритроцитами с разными сроками генерации, например. Разрушение эритроцитов в зоне хронической ишемии, вследствие изменения пластичности их мембраны, приводит к развитию адаптивной реакции с выходом в кровоток значительного количества молодых эритроцитов. Вероятно, более высокий верхний предел электрического заряда у эритроцитов В и АВ групп крови может приводить к возникновению большей разницы между старыми и молодыми эритроцитами, а также между клетками, находящимися в описанных выше неблагоприятных условиях, и относительно сохранных, поступающих с током крови в патологический очаг. Не исключена агрегация эритроцитов с более высоким зарядом с теми, которые длительно находятся на участке сосуда со сниженной скоростью кровотока и изменой средой плазмы.

Определенным подтверждением такой вероятности может служить наблюдавшийся в данной работе феномен агрегации интактных эритроцитов с эритроцитами, чей заряд был снижен под влиянием ионов лантана. Данное наблюдение было сделано в ходе изучения индуцированной агрегации эритроцитов ионами лантана. Во взвесь эритроцитов, куда предварительно был добавлен хлористый лантана в субпороговой концентрации (менее 60М), добавлялась взвесь интактных эритроцитов той же группы крови. Отчетливо прослеживалась граница соприкосновения двух растворов, с развитием агрегации эритроцитов в приграничной зоне.

Ионы лантана не полностью инактивировали электрический заряд эритроцитов, и при добавлении в опытный раствор интактных, то есть, сохранивших свой электрический заряд клеток возникла агрегация. Для сохранивших свой электрический заряд эритроцитов, обработанные лантаном соответствовали заряженным положительно, вследствие смещения их изоэлектрической точки.

Не исключено, что абсолютных различий в величине электрического заряда между эритроцитами разных групп крови нет. Речь может идти о стабильности сиаловой кислоты на поверхности клетки, что будет предупреждать потерю заряда эритроцитом при старении и воздействии неблагоприятных факторов. Это предположение может оказаться справедливым в отношении В и АВ групп крови. Дело в том, что макрофаги РААС распознают старые эритроциты по галактозильным остаткам в гликокаликсе, возникающим после отщепления молекулы сиаловой кислоты. Такие эритроциты захватываются макрофагами и уничтожаются. В случае эритроцитов В и АВ групп крови подобное событие становится весьма вероятным, поскольку типоспецифичный антиген представляет собой D-галактозу. Несомненно, что сиаловые кислоты эритроцитов данных групп крови должны иметь большую стабильность, для предотвращения преждевременного разрушения эритроцитов. [81, 88]

Таким образом, эритроциты В и АВ групп крови, с более стабильной сиаловой кислотой меньше теряют свой заряд в неблагоприятных условиях. Не исключена возможность более частого обновления эритроцитов данных групп крови за счет макрофагальной элиминации, связанной с большей доступностью галактозильных остатков в гликокаликсе. Подобный процесс может приводить к преобладанию в кровотоке лиц с В и АВ группами крови эритроцитов преимущественно свежей генерации, с сохранным электрическим зарядом. Однако, за счет озвученных факторов увеличивается и осаждение молекул фибриногена на поверхности клетки, посредством кулоновского взаимодействия. Данный процесс нарушает способность эритроцита к деформации и снижает его заряд. В то же время клетки с меньшим зарядом могут избежать осаждения фибриногена в патологически измененной среде, за счет малой разницы в заряде, что будет являться своеобразным регуляторным механизмом.

Как было показано ранее, спонтанная агрегация выше у эритроцитов О группы крови, вероятно, за счет изначально более низкого электрического заряда. Однако естественные противосвертывающие механизмы у лиц с О группой крови также функционируют лучше. В том числе, фактор Виллебранда,

обеспечивающий адгезию тромбоцитов к поврежденному участку эндотелия менее активен у лиц с О группой крови. Вероятно, в совокупности факторов: повышенная адгезия фибриногена, модификация фактора Виллебранда, придающая ему устойчивость в кровотоке, более мощные силы электростатического взаимодействия при снижении электрического заряда отдельных компонентов крови, лежит причина снижения защитных противосвертывающих механизмов у лиц с прочими, кроме О, группы крови. Причем ослабление этих механизмов находится в прямой зависимости с возрастанием величины электрического заряда поверхности эритроцита, т.е. будет более выражено у эритроцитов В и АВ групп крови.

Вероятно, данное состояние может продолжаться достаточно долго, за счет компенсаторных механизмов организма: буферные системы крови, активность противосвертывающей системы. Реализующим фактором, как уже упоминалось, обычно служат психо-эмоциональный стресс, употребление алкоголя, переедание, резкое повышение артериального давления, метаболические сдвиги. Озвученные факторы приводят к разнообразным биологическим эффектам: выброс катехоламинов при стрессе, обезвоживание при употреблении алкоголя и жирной пищи, спазму сосудов при повышении артериального давления и т.д. В условиях существующих реологических нарушений на локальном отрезке сосудистого русла данные изменения гомеостаза вполне вероятно могут привести к декомпенсации патологического состояния. Известно, что достаточная большая доля ишемических инсультов развивается ранним утром, когда происходит наибольшее выделение в кровь гормонов надпочечников, втч. кортизола.

Такой результат возможен за счет значительного разрушения эритроцитов в неблагоприятных условиях, с высвобождением факторов свертывания, уменьшения просвета сосуда за счет различных причин, дальнейшего увеличения вязкости крови, например, за счет гиповолемии. Опираясь на результаты наблюдения взаимодействия интактных и обработанных хлористым лантаном эритроцитов, можно допустить, что поступление свежей порции эритроцитов в проблемный участок сосудистого русла будет только усугублять нарушение

реологии крови. Связана данная ситуация с относительно высоким поверхностным электрическим зарядом вновь поступающих в очаг ишемии эритроцитов, что будет приводить к более интенсивной взаимной агрегации. С учетом кратковременного и непредсказуемого действия многих реализующих факторов ишемического инсульта, не исключено запаздывание компенсаторной реакции систем гомеостаза. Таким образом, в развитии ишемического атеротромботического инсульта, вероятнее всего превалирующее влияние имеют местные реологические и биохимические параметры, в пределах участка сосуда, мало зависящие от состояния системной гемодинамики и функционирования свертывающей системы крови.

При обширном и длительно существующем повреждении эндотелия, за счет процессов атеро- и атеросклероза, прогрессирующих нарушениях реологии крови на локальном отрезке сосудистого русла, происходит нарушение электрических свойств клеток и тканей. С учетом общего снижения реактивности организма с возрастом, снижения продукции факторов противосвертывающей системы, резко возрастает риск острого тромбоза, вследствие кратковременного и внезапного внешнего или внутреннего дестабилизирующего воздействия. Несомненно, что различные факторы риска, в том числе генетически обусловленный уровень активности факторов свертывания, электрические свойства эритроцитов и пр. оказывают свое действие совместно. Принимая во внимание важную роль электрического заряда форменных элементов и молекул крови в развитии тромбоза сосудов, можно полагать, что люди, имеющие разные группы крови системы АВО, при прочих равных факторах, будут иметь разный риск развития ишемического атеротромботического инсульта.

Исследуемая проблема далека от окончательного разрешения. Для полноценного ответа на вопрос о месте групповой принадлежности крови среди факторов риска ишемического инсульта потребуются ряд дополнительных исследований. Вероятно, более обширное по выборке изучение встречаемости различных групп крови у пациентов с ишемическим инсультом, со стратификацией факторов риска, позволит оценить вклад групповой

принадлежности крови в предрасположенность к данному заболеванию. Необходимо дальнейшее уточнение роли электростатических взаимодействий в процессах свертывания крови и функционирования клеток и тканей. Для более точного, количественного, определения различий в электрическом заряде эритроцитов разных групп крови требуется разработка метода непосредственного его измерения. Ряд необходимых исследований потребует участия специалистов в различных областях знания, с привлечением достаточного объема ресурсов. В плане разработки методов профилактики и оценки прогноза качества жизни и риска развития ишемического инсульта можно и необходимо учитывать на групповую принадлежность крови. Проведенная работа подтверждает имеющуюся зависимость развития ишемического инсульта от группы крови АВО, и уточняет спектр возможных причин данного явления.

## Заключение

Ишемический инсульт представляет собой актуальную социальную и медицинскую проблему ввиду его значительной встречаемости в старшей возрастной группе, а также высоким уровнем инвалидизации и смертности в исходе. Поиск путей профилактики и лечения ишемического инсульта продолжается в настоящее время, и далек от завершения. В данной работе рассматривались аспекты влияния АВО групповой принадлежности крови на риск развития ишемического атеротромботического инсульта. Известно, что принадлежность эритроцитов к той или иной системе групп крови определяется специфичными молекулами, различной химической структуры, расположенными в гликокаликсе. Независимыми исследователями показана взаимосвязь групповой принадлежности крови с разнообразными заболеваниями и патологическими состояниями человека, что объясняется рядом патофизиологических механизмов, в числе которых характерные особенности функционирования иммунной системы, межклеточного взаимодействия и др. После изучения актуальной литературы по данному вопросу, в настоящем исследовании предпринята попытка связать частоту развития ишемического атеротромботического инсульта с групповой принадлежностью крови человека. Система групп крови АВО выбрана исходя из соображений простоты дифференциации, максимального охвата популяции, достаточной изученности структуры типоспецифичных антигенов.

Для достижения поставленной цели первоначально производилась оценка частоты встречаемости различных фенотипов АВО среди пациентов, перенесших ишемический инсульт, в сравнении со здоровыми индивидуумами. Для получения максимально точной картины различий, в качестве изучаемого подтипа ишемического инсульта был выбран атеротромботический, как наиболее часто встречающийся. Отбор контрольной группы производился с учетом анамнеза сердечно-сосудистых заболеваний и приема специфических медикаментозных препаратов, с игнорированием возрастного критерия.



Полученные результаты показали значительное преобладание В группы крови среди пациентов с ишемическим инсультом: (36,84%) в сравнении с контрольной группой (22,41%),  $p \leq 0,01$ .

Преобладание фенотипов А, В и АВ среди пациентов с ишемическим инсультом в научной литературе объясняется различной активностью факторов свертывания крови. Подобный подход, по нашему мнению не полностью отражает сложную патофизиологическую картину процесса острого нарушения церебрального кровотока и нуждается в уточнении. Одним из существенных вопросов в отношении превалирующего влияния активности факторов свертывания на риск развития ишемического инсульта является недоказанная перманентность подобного влияния. Иными словами, сдвиг амплитуды активности свертывающей системы генетически детерминирован, следовательно, развитие тромботических заболеваний преимущественно в старшей возрастной группе является следствием не исключительно прокоагулянтной активности плазмы крови, но взаимодействия данного фактора с рядом прочих. В качестве дополнительного механизма более частого развития тромбоза мозговых сосудов у людей с фенотипом В было предложено рассмотреть электростатическое взаимодействие молекул и клеток крови, различия в котором могут быть обусловлены групповой типоспецифичностью эритроцитов.

Первоначально было осуществлено сравнение индуцированной хлористым лантаном агрегации эритроцитов, принадлежащих к разным группам крови системы АВО. Известно, что положительно заряженные ионы тяжелых металлов могут адсорбироваться на поверхности эритроцита, за счет образования электрохимической связи с карбоксильной группой сиаловой кислоты. Таким образом происходит снижение электрического заряда эритроцита, что влечет за собой уменьшение сил электроотталкивания между двумя клетками, ведущее, в свою очередь, к агрегации клеток. В ходе изучения индуцированной хлористым лантаном агрегации клеток было установлено, что агрегация для эритроцитов В и АВ групп крови наступала при значительно более высоких концентрациях хлористого лантана, чем для эритроцитов О и А групп крови. Таким образом,

можно полагать, что величина электрического заряда эритроцитов В и АВ групп крови относительно выше, и требуется большее количество ионов лантана для инактивации естественного отрицательного заряда клеток.

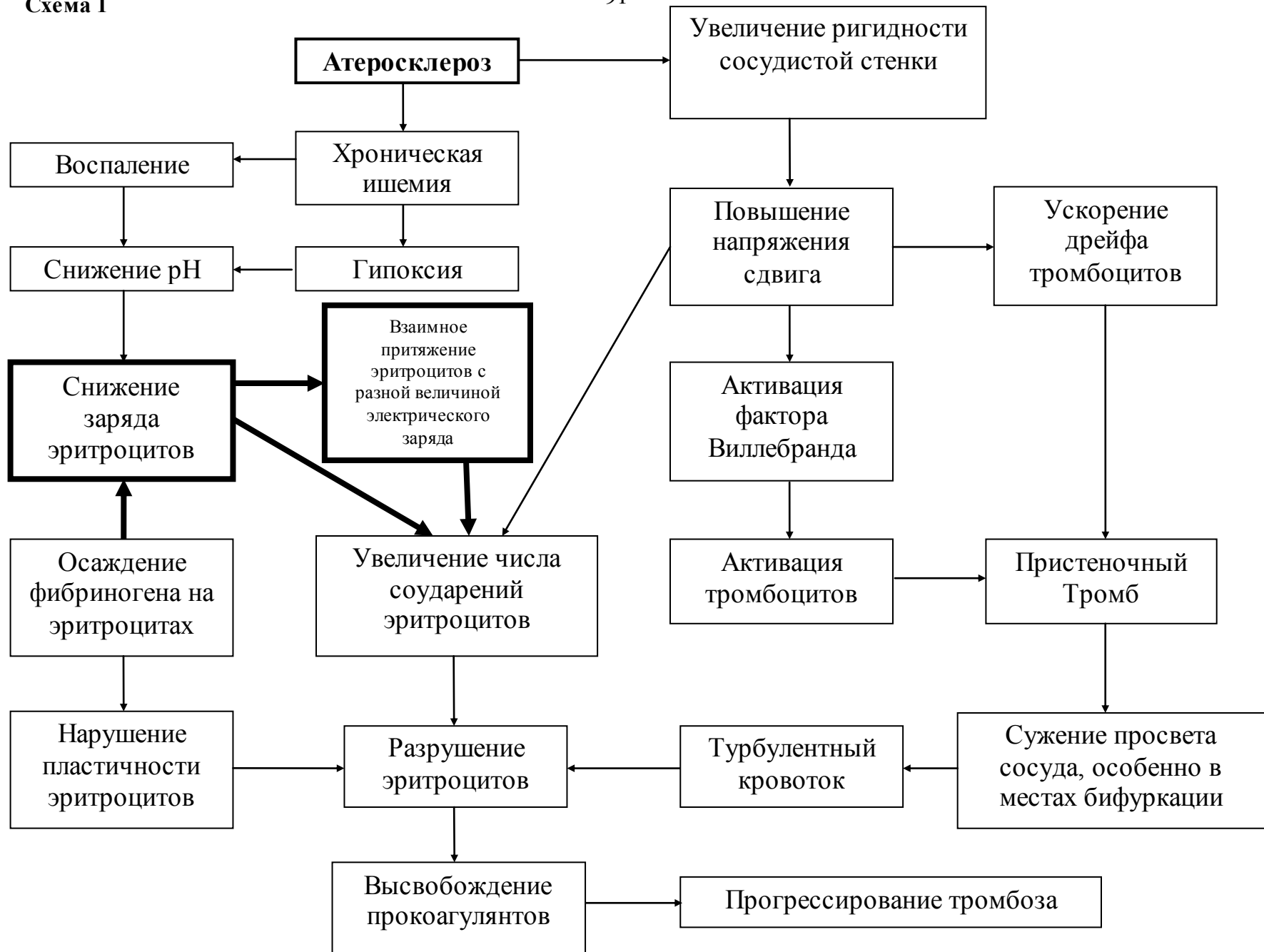
С целью проверить данное утверждение, а также исключить влияние на результат эксперимента структурных особенностей гликокаликса, было проведено сравнение электрофоретической подвижности эритроцитов с разной группой крови АВО.

Ранее установлено, что скорость электрофоретической подвижности заряженных частиц не зависит от их формы и размера. Электростатическое взаимодействие в данном случае невозможно экранировать или исказить каким-либо образом в условиях проводимого эксперимента.

Измерение ЭФПЭ производилось на основании ранее применявшейся методики (Голубев О.А., 1979г), с использованием микроскопа и последующей программной обработкой полученного изображения. Полученные результаты показали, что эритроциты В группы крови обладают наибольшей скоростью электрофоретической подвижности ( $4,91 \pm 0,38$  мкм/с), в сравнении с О группой крови ( $4,43 \pm 0,26$  мкм/с), А группой крови ( $4,48 \pm 0,28$  мкм/с), и АВ группой крови ( $4,78 \pm 0,31$  мкм/с), ( $0,9 < r < 1$ ). Исходя из результатов двух разноплановых экспериментов можно полагать, что эритроциты В группы крови обладают значительно большим электрическим зарядом, в сравнении с прочими группами крови.

Общая характеристика патофизиологических процессов, приводящих к развитию ишемического атеротромботического инсульта представлена на **схеме 1**.

Схема 1



Хроническая гипоксия тканей и воспалительный процесс, возникающие вследствие атеросклеротического поражения сосудистой стенки ведут к перманентному тканевому ацидозу. Повышение ионной силы плазмы за счет увеличения вязкости крови и воспалительного процесса, наравне со снижением рН приводят к уменьшению электрического заряда эритроцита. Немалое участие в модификации мембраны эритроцита и ее электрических свойств принимают фибриноген и продукты деградации фибрина, за счет адсорбции из плазмы. Снижение электрического заряда эритроцита приводит к повышению числа соударений клеток, что особенно актуально в условиях турбулентно измененного кровотока на извитых (в том числе за счет атеро- и артериосклероза) участках сосуда, а также в местах бифуркации. Повреждение мембраны эритроцита, за счет соударений, с одной стороны усиливает адсорбцию белков (например, фибриногена) из плазмы, а с другой - может привести к разрушению клетки, с высвобождением прокоагулянтов, и дополнительным увеличением вязкости крови за счет частиц детрита.

Атеросклеротическое поражение интимы сосуда, помимо вышеописанных изменений, приводит к нарушению эластичности сосудистой стенки, что влечет за собой повышение скорости кровотока на прямых отрезках сосудов. В подобных условиях усиливается тромбоцитарный дрейф на периферию потока крови, а также происходит спонтанная активация фактора Виллебранда. В совокупности, эти процессы способствуют образованию пристеночного тромба, с возможной частичной окклюзией сосуда в местах его изгибов, или бифуркации.

Как можно видеть, патогенез ишемического инсульта, возникающего на фоне атеросклероза церебральных артерий, кроме прочего, включает в себя изменение реактивности эндотелия и нарушение межклеточных взаимодействий в условиях измененного кровотока. Подобные изменения могут приводить к инверсии защитных механизмов гомеостаза, в том числе электрического заряда клеток и тканей. В качестве ведущей модели, дополняющей известные представления о патогенезе ишемического инсульта, предлагается повышенная склонность к образованию агрегатов у эритроцитов, обладающих электрическим

зарядом выше среднего в популяции. Данное свойство эритроцитов обуславливает повышенную адсорбцию фибриногена и продуктов деградации фибрина на поверхности эритроцита, а также более высокую вероятность взаимной агрегации эритроцитов со сниженным поверхностным электрическим зарядом. Особенно сильно данный феномен должен быть выражен в случае существенного различия в электрическом заряде взаимодействующих клеток, согласно закону Кулона. Нужно заметить, что хроническая ишемия тканей и регулярное повреждение эритроцитов в неблагоприятных условиях приводят к адаптационной реакции организма - повышенному образованию эритроцитов. Взаимный контакт эритроцитов разного срока генерации может привести к их агрегации за счет различий в величине электрического заряда. Наиболее вероятным местом подобного события будет служить участок сосуда, пораженный атеросклерозом, с нарушением скорости и характера кровотока, рН и ионной силой плазмы, в условиях повышенной активности прокоагулянтов. С данной точки зрения, эритроциты В группы крови, системы групп крови АВО, будут наиболее уязвимы для подобной агрегации, поскольку имеют наивысший базовый электрический заряд. Последнее обстоятельство значительно увеличивает возможный интервал разности потенциалов между эритроцитом и прочими взаимодействующими агентами.

Развитие ишемического инсульта является следствием сочетания нескольких неблагоприятных предрасполагающих и реализующих факторов. Выделить из них ведущий и определяющий для данного патологического синдрома, в настоящее время представляется непростой задачей.

Несомненно, что групповая принадлежность крови, системы АВО, играет важную роль в протекании различных патологических процессов, оказывая влияние на вероятность развития ишемического инсульта.

## Выводы

1. У пациентов, перенесших ишемический атеротромботический инсульт, наиболее часто встречается В группа крови (36,84%) в сравнении с контрольной группой (22,41%),  $p \leq 0,01$
2. В патогенезе ишемического инсульта большее значение имеет внутренний путь свертывания крови, чем внешний, что иллюстрируется отклонением показателей АПТВ в сторону гиперкоагуляции, в сравнении со значениями ПТВ и МНО.
3. Эритроциты В группы крови обладают наибольшей скоростью электрофоретической подвижности ( $4,91 \pm 0,38$  мкм/с), в сравнении с О группой крови ( $4,43 \pm 0,26$  мкм/с), А группой крови ( $4,48 \pm 0,28$  мкм/с), и АВ группой крови ( $4,78 \pm 0,31$  мкм/с), а, соответственно, и наибольшей величиной электрического заряда. ( $0,9 < r < 1$ ).
4. Различия в электрическом заряде эритроцитов определяют их агрегационную устойчивость в кровотоке, поскольку электростатические взаимодействия принимают участие в процессах агрегации, по механизму разности потенциалов участвующих агентов.
5. В условиях нарушения реологии крови, патологически измененной сосудистой стенки, повышенный электрический заряд эритроцитов демонстрирует инверсию физиологического дезагрегантного эффекта, провоцируя возникновение тромбоза в компрометированном участке сосуда, с развитием ишемического инсульта.

## Практические рекомендации

Результаты проведенной работы могут быть полезны другим исследователям, работающим в данном направлении, в плане научной преемственности. Используя полученные в ходе настоящего исследования данные, возможно планировать и осуществлять дальнейшее изучение электрических свойств эритроцитов, влияние групповой принадлежности крови на риск развития различных заболеваний.

При изучении патогенеза ишемического инсульта принципиально важно учитывать немалую роль локальных изменений в конкретном участке сосудистого русла. Предрасполагающие и реализующие факторы ишемического инсульта, равно как и состояние системного гемостаза могут не иметь существенного влияния на отдельном отрезке сосуда в условиях локального нарушения гемодинамики и вязкости крови.

При проведении сравнительного анализа встречаемости групповых антигенов крови у лиц с ассоциированными заболеваниями необходимо учитывать возможные aberrации в распределении фенотипа групповой принадлежности крови. Изменения в структуре распределения групп крови могут быть вызваны летальностью или медикаментозной терапией, искажающей влияние типоспецифичных антигенов на протекание патофизиологических процессов.

Основные положения данного исследования могут быть включены в методические рекомендации для практикующих врачей и студентов медицинских образовательных учреждений. С учетом относительной простоты выполнения анализа крови на групповую принадлежность, целесообразно определение данного параметра при составлении плана лечения конкретного пациента и определении прогноза развития и рецидива ишемического инсульта.

## Литература

1. Аронов Д.М., Лупанов В.П. Некоторые аспекты патогенеза атеросклероза. Атеросклероз и дислипидемии. 2011; 1: 48-56
2. Беляев А.П. Физическая и коллоидная химия: учебник. Москва. ГЭОТАР-МЕДИА, 2008
3. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах. Соросовский образовательный журнал. 2000; 6(12): 13–19
4. Волкова И.И. Ремоделирование сердца и сосудов при ишемической болезни сердца. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2010; 4: 96-98
5. Высоцкая В.Г, Лобкова Т.Н., Тхуанг Ван Хоанг. Реологические свойства крови при нарушениях мозгового кровообращения ишемического характера. Сборник «Реологические исследования в медицине» Москва. 1997
6. Гафуров Б.Г., Аликулова Н.А. Клинико-патогенетические особенности и вопросы лечебной тактики при ишемическом инсульте в пожилом и старческом возрасте. Журнал Неврологии и Психиатрии имени Корсакова. Приложение «Инсульт». 2004; 11: 44-45
7. Грицюк А.И., Амосова Е.Н., Грицюк И. А. Практическая гемостазиология. Киев: Здоровье, 1994
8. Губарев Ю.Д., Ефремова О.А., Оболонкова Н.И., Мельничук А.И. Ишемический инсульт и вопросы патогенеза атеросклероза. Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2011; 10(14):5-8
9. Гундиенков В.А., Яковленко С.И. Взаимодействия заряженных пылинок в облаках термодинамически равновесных зарядов. Электронный журнал «Исследовано в России». М., 2002; 3-4 декабря
10. Гусев Е.И, Мартынов М.Ю., Петухов Е.Б., Березов В.П., Колесникова Т.И., Ясаманова А.Н., Макаров А.Н. Вязкость крови и плазмы у больных



- с ишемическим инсультом. Журнал Неврологии и Психиатрии имени Корсакова. 2002;6 (приложение «инсульт»):41-44
11. Гусев Е.И., В.И.Скворцова. Ишемия головного мозга. Москва: Медицина, 2001.
  12. Гусев Е.И., Коновалов А.Н., Бурд Г.С. Неврология и нейрохирургия. Москва: Медицина, 2000
  13. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В. Проблема инсульта в Российской Федерации: время активных совместных действий. Журнал Неврологии и Психиатрии имени Корсакова. 2007; 8: 4-8
  14. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В., Киликовский В.В., Айриян Н.Ю. Эпидемиология инсульта в России. Consilium Medicum, 2003; 5(5)
  15. Гусев Е.И., Шимрик Г., Хаас А., Гехт А.Б., Боголепова А.Н., Дорожиева Н.Н. Результаты 3-летнего катамнестического наблюдения за больными с ишемическим инсультом. Неврологический журнал. 2002; 5: 10-11
  16. Добрынина Л.А., Калашникова Л.А., Павлова Л.Н. Ишемический инсульт в молодом возрасте. Журнал неврологии и психиатрии имени Корсакова. 2011;3:4-8
  17. Дранник Г.Н, Дизик Г.М. Генетические системы крови человека и болезни. Киев: Здоровья, 1990.
  18. Евдокименко А.Н., Гулевская Т.С. Церебральный атеросклероз и ишемический инсульт (патологоанатомическое исследование). Москва. Научный центр неврологии РАМН. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2010;10:30-32
  19. Егорихина М. Н. Действие факторов плазмы на агрегацию клеток крови в норме и патологии. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Егорихина М.Н. // Н.Новгород, 2011, 186с.
  20. Зайко Н. Н., Быць Ю.В., Атаман А.В. и др. Патологическая физиология [Учебник для студентов мед.вузов] // / К.: "Логос", 1996

21. Исмагилов М.Ф., Сайхунов М.В. Патология магистральных сосудов головы и частота некоторых факторов риска при различных формах нарушения мозгового кровообращения. Неврологический вестник. 2004;XXXVI (1-2): 5-7
22. Кабанов Д.С. Изменение поверхностных характеристик мембраны эритроцитов при встраивании липополисахаридов грамотрицательных бактерий. Диссертация на соискание ученой степени кандидат биологических наук: 03.00.04 Пушкино, 2006, 84 с. РГБ ОД, 61:07-3/256
23. Камчатнов П.Р., Алиев Л.Л., Ясманова А.Н., Кузин В.М. Система гомеостаза у больных старческого возраста с ишемическим инсультом в системе сонных артерий. Неврологический вестник. 1998; 3-4:8-10
24. Ким А.В., Джибладзе Д.Н. Церебральная эмболия у пациентов с протезированными механическими клапанами сердца. Журнал неврологии и психиатрии имени Корсакова. 2004;11(приложение «инсульт»):13
25. Кобылина О.В., Гехт А.Б., Фаворова О.О., Николаева Т.Я., Гусев Е.И. Генетические аспекты ишемического инсульта. Журнал неврологии и психиатрии имени Корсакова. 2008; 23 (приложение «инсульт»):49-57
26. Козинец Г.И., Попова О.В. и др. Электрический заряд клеток крови. Москва: Практическая медицина, 2007.
27. Кузнецова С.М. Кардиоэмболический инсульт: патогенез, клиника, терапия. Здоровье Украины. 2012; 7(284): 32-34
28. Кузник Б.И., Стуров В.Г., Максимова О.Г. Геморрагические и тромботические заболевания и синдромы у детей. Новосибирск: Наука, 2012. – 456с
29. Лобкова Т.Н., Высоцкая В.Г. Реологические свойства крови при нарушениях мозгового кровообращения у больных с ишемической болезнью сердца. Сборник «Реологические исследования в медицине» Москва. 1997

30. Максименко А.В. Турашев А.Д. Функции и состояние эндотелиального гликокаликса в норме и при патологии. Атеросклероз и дислипидемии. 2011; 2: 4-17
31. Малолеткина Л.А. Лечебные физические факторы и гемокоагуляция. Минск. 1983
32. Мешалкин Е.Н., Окунева Г.Н., Власов Ю.А. и др. Группы крови систем АВО и Rh у больных сердечно-сосудистой патологией. Кардиология. 1981; 4: 46-50
33. Минеева Н.В. Группы крови человека, основы иммуногематологии. Санкт-Петербург. 2004
34. Низковольтный стабилизатор постоянного напряжения: А.с. 613312 СССР, М.Кл<sup>2</sup> G 05F 1/58. Басов Ю.А., Константинов Р.Г. – №2077770/24-07; заявл. 25.11.74; опубл. 30.06.78, Бюл.№24 – 3с.
35. Нечипуренко Н.И., Пашковская И.Д., Мусяенко Ю.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга. РНПЦ неврологии и нейрохирургии, Белорусская медицинская академия последипломного образования. Медицинские новости. 2008; 1:7-13
36. Ошевенский Л.В., Преснухина Н.Г., Лобкаева Е.П., Елисеева Т.И., под ред. проф. Крылова В.Н. Электрофоретическая подвижность эритроцитов. Методическое пособие. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 2005.
37. Панченко Е.П. Атеротромбоз: механизмы развития и реально проводимая терапия. Атеротромбоз. 2008;1:22-26
38. Панченко Е.П., Беленков Ю.Н. Характеристика и исходы атеротромбоза у амбулаторных больных в Российской Федерации (по материалам международного регистра REACH). Кардиология. 2008; 2: 17-24
39. Петрова Е.А., Концевой В.А., Савина М.А., Назаров О.С., Скворцова В.И. Депрессивные расстройства у больных с церебральным инсультом. Журнал неврологии и психиатрии имени Корсакова. 2009; 2 (109):4-9

40. Петрянов-Соколов И.В. Коллоидная химия и научно-технический прогресс. Москва: Наука, 1988
41. Подсонная И.В., Ефремушкин Г.Г., Шумахер Г.И. Дискоагуляция как маркер фатального ишемического инсульта у больных геронтологического возраста. Алтайский ГМУ, ГУЗ «Краевой госпиталь для ветеранов войн», Барнаул. В материалах сборника: Актуальные проблемы цереброваскулярной патологии, Иркутск; 2005: 78-80
42. Прокоп О., Гёлер В. Группы крови человека. Москва: Медицина, 1991.
43. Протасов К.В., Синкевич Д.А., Федоришина О.В. Сосудистый возраст и сердечно-сосудистое ремоделирование при артериальной гипертензии. Артериальная гипертензия. 2011; 17(5): 448-453
44. Рафалович М.Б., Мазурова А.М., Минаева М.Н., Бессонова Г.А., Зильберт Н.И., Тарала Г.Т. и др. Группы крови АВО как фактор риска ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии у различных этнических популяций. Врачебное дело. 1980; 9: 72-75
45. Саранин В.А. Некоторые эффекты электростатического взаимодействия капель воды в атмосфере. Журнал технической физики. 1999; 12(69): 12-17
46. Скворцова В.И. Стаховская Л.В., Пряникова Н.А., Мешкова К.С. Вторичная профилактика инсульта. Consilium Medicum. 2006; 08(12)
47. Скворцова В.И., Лимборская С.А., Сломинский П.А., Кольцова Е.А., Шетова И.М. Роль полиморфных вариантов генов ренин-ангиотензиновой системы, эндотелиальной NO-синтазы и р53 в развитии основных факторов риска сосудистой патологии головного мозга и в формировании инфаркта мозга. Consilium Medicum. 2003; 5(05)
48. Смертина Е.Г., Прокопенко С.В., Ионова В.Г., Танашян М.М., Потылицина В.В. Состояние системы гемостаза и функции эндотелия при различных подтипах ишемического инсульта в остром и

- восстановительном периодах. Бюллетень сибирской медицины. 2009;1 (2):72-78
49. Способ микроэлектрофореза клеток крови и эпителиоцитов и устройство для его осуществления: Патент РФ №2168176: G01N33/49. Никитин Е.Н.; Соловьев А.А.; Кутявина С.В.; Голендухин А.Н. Заявитель и патентообладатель Соловьев Александр Александрович. - №99106807/14; заявл. 05.04.1999; опубл. 27.05.2001
50. Способ регистрации поверхностного заряда эритроцитов: Патент РФ №2027188: G01N33/49. Шереметьев Ю.А.; Макин Г.И.; Суслов Ф.Ю.; заявитель и патентообладатель Нижегородский сельскохозяйственный институт; Научно-исследовательский институт химии при Нижегородском университете. – № 4947820/14; заявл. 24.06.91 ;опубл. 20.01.95.
51. Суслина З.А., Верещагин Н.В., Пирадов М.А. Подтипы ишемических нарушений мозгового кровообращения: диагностика и лечение. Consilium Medicum Том 03/N 5/2001
52. Суслина З.А., Танащян М.М., Лагода О.В. Атеросклероз и ишемические нарушения мозгового кровообращения. Атеротромбоз. 2009; 2(3): 60-67
53. Ткачук В.А. Клиническая биохимия. Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 512с
54. Токарев А.А., Бутылин А.А., Атауллаханов Ф.И. Транспорт и адгезия тромбоцитов в сдвиговом потоке крови: роль эритроцитов. Компьютерные исследования и моделирования, 2012; 4 (1): 185–200
55. Торшин И.Ю., Громова О.А., Никонов А.А. Гены и цереброваскулярная патология (ассоциативные исследования). Журнал неврологии и психиатрии имени Корсакова. 2009;3(109):56-59
56. Усенко Л.В., Мальцева Л.А., Царев А.В., Черненко В.Г. Ишемический инсульт глазами анестезиолога: современные подходы к интенсивной терапии. Минздрав Украины, ДГМА, кафедра анестезиологии и реанимации. Днепропетровск. 2004

57. Фейгин В.Л. Эпидемиология мозгового инсульта в Сибири. Журнал Неврологии и Психиатрии имени Корсакова. 2001; 1: 52-56
58. Чеботарев Д.Ф., Коркушко О.В., Маньковский Н.Б., Минц А.Я. Атеросклероз и возраст. Москва: Медицина, 1982
59. Чижевский А.Л. Аэроионификация в народном хозяйстве. Москва: Стройиздат, 1989
60. Чижевский А.Л. Электрические и магнитные свойства эритроцитов. АНУКРССР. Институт физиологии им. А.А.Богомольца. Киев: Наукова Думка, 1973
61. Чиныбаева А.А. Распределение эритроцитарных антигенов у больных с церебральным инсультом. Журнал Неврологии и Психиатрии имени Корсакова. 2005;13: 55-57
62. Чубарь С.В. АВО группы крови, Rh-принадлежность и свертывание крови у больных облитерирующим атеросклерозом./Врачеб. дело. – 1980. - №9, с83-86
63. Шереметьев Ю.А. Изучение механизма агрегации эритроцитов, индуцированной  $La^{3+}$  / Ю.А. Шереметьев, А.В. Шереметьева, Г.Я. Левин // Всес. биофиз. съезд. Тез.докл. М.: 1982. - Т. 2.- С. 115
64. Шереметьев Ю.А. Морфо-физиологический анализ механизмов  $La^{3+}$ -индуцируемых агрегации и слияния эритроцитов / Ю.А.Шереметьев // диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Н.Новгород, 2007, 151с
65. Шереметьев Ю.А., Шереметьева А.В. Влияние  $La^{3+}$  на электрофоретическую подвижность и агрегацию интактных и обработанных низкими концентрациями глутарового альдегида эритроцитов человека. Биофизика. 2003; 1(48):63-67

66. Aarts P.A., Bolhuis P.A., Sakariassen K.S., Heethaar R.M., Sixma J.J. Red blood cell size is important for adherence of blood platelets to artery subendothelium. *Blood*. 1983; 62(1): 214-7
67. Abonyi S. ABO blood groups and cholera: an investigation of an infectious disease as an agent of natural selection. *NEXUS: The Canadian student journal of anthropology*. 1996; 12:1-12
68. Aird I. The implications of the association between the ABO blood groups and disease. *J. Coll. Gen. Pract.* 1959; 2: 313-322
69. Abramson H. A. The «isoelectric point» of normal and sensitized mammalian erythrocytes. *The journal of general physiology*. 1930; November 20: 163-177
70. Abramson H.A. The cataphoretic velocity of mammalian red blood cells. *The journal of general physiology*. 1929; 12(6): 711-725
71. Abramson H.A., Laurence A.D, Moyer S. The electrical charge of mammalian red blood cells. *The journal of general physiology*, 1936; 19(4): 601-607
72. Abramson H.A., Michaelis L. The influence of size, shape and conductivity of microscopically visible particles on cataphoretic mobility. *The journal of general physiology*. 1929; March 20: 587-598
73. Akhtar K., Mehdi G., Sherwani R., Sofi L. Relationship between various cancers and ABO blood groups – a Northern India experience. *The internet journal of pathology*. 2010; 13(1)
74. Aminoff D., Anderson J., Dabich L., Gathmann W.D. Sialic acid content of erythrocytes in normal individuals and patients with certain hematologic disorders. *American journal of hematology*. 1980; 9(4): 381-9
75. Angers J., Rottino A. The electrophoretic mobility of red blood cells of normal human beings. *Blood*. 1961; 17: 112-119
76. Barshtein G., Tamir I., Yedgar S. Red blood cell rouleaux formation in dextran solutions: dependence on polymer conformation. *European biophysics journal*, 1998; 27(2):177-81

77. Baxbaum K, Evans E, Brooks DE. Quantitation of surface affinities of red blood cells in dextran solutions and plasma. *Biochemistry*. 1982; 21(13): 3235-3239
78. Beamer N., Giraud G.D., Clark W., Wynn M., Coull B. Diabetes, hypertension and erythrocyte aggregation in acute stroke. *Cerebrovascular diseases*, 1997; 7(3): 144-149
79. Bulaia T., Bratosinb D., Ponsa A., Montreuil J., Zanetta J.P. Diversity of the human erythrocyte membrane sialic acids in relation with blood groups. *FEBS*. 2003; 534: 185-189
80. Cadroy Y., Hanson S.R. Effects of red blood cell concentration on hemostasis and thrombus formation in a primate model. *Blood*. 1990; 75(11): 2185-93
81. Chen X.Y., Huang Y.X., Liu W., Yuan Z. Membrane surface charge and morphological and mechanical properties of young and old erythrocytes. *Current Applied Physics*. 2007; 7(1): 94–96
82. Chesnutt J.K.W., Hai-Chao H. Effect of red blood cells on platelet activation and thrombus formation in tortuous arterioles. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2013; 1: 18
83. Chien S., Cooper G. W., Kung-mung J., Miller L. H., Howe C., Usami S., Lalezari P. N-Acetylneuraminic acid deficiency in erythrocyte membranes: biophysical and biochemical correlates. *Blood*, 1974; 43: 445-460
84. Chien S. Electrochemical interactions between erythrocyte surfaces. *Thrombosis research*. 1976; 8: 189-202
85. Chow T.W., Hellums J.D., Moake J.L., KrollShear M.H. Stress-Induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. *Blood*, 1992; 80(1): 113-12
86. Cohen M., Hurtado-Ziola N., Varki A. ABO blood group glycans modulate sialic acid recognition on erythrocytes. *Blood*, 2009; 114: 3668-3676



87. Cook G.M, Heard D.H, Seaman G.V. Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte. *Nature*. 1961; 191: 44-7
88. Danon D., Marikovsky Y., Skutelsky E. The sequestration of old red cells and extruded erythroid nuclei, (ed. Ramot B.). *Red cell structure and metabolism*. New York, Academic, 1971, pp 23-38
89. Davies P.F., Dewey C.F., Bussolari S.R., Gordon E.J., Gimbrone M.A. Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function. In vitro studies of shear stress and pinocytosis in bovine aortic endothelial cells. *Journal of clinical investigation*, 1983; 73: 1121–1129
90. Diquélou A., Dupouy D., Gaspin D., Constans J., Sié P., Boneu B., Sakariassen K.S., Cadroy Y. Relationship between endothelial tissue factor and thrombogenesis under blood flow conditions. *Thrombosis and haemostasis*, 1995; 74: 778–783
91. Donath E. Voigt A. Electrophoretic mobility of human erythrocytes. *Biophysics journal*, 1986; 49: 493-499
92. Durocher J.R. Payne R. C., Conrad M. E. Role of sialic acid in erythrocyte survival. *Blood*. 1975; 45: 11-20
93. Eylar E.H., Morton A. M., Brody O.V., Oncley J.L. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. *The journal of biological chemistry*. 1962; 237(6): 237-246
94. Fabry T. L. Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. *Blood*. 1987; 70: 1572-1576
95. Fernandes H. P., Cesar C. L., Barjas-Castro M.L. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Revista brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2011; 33(4): 297-301

96. Fozzard H.A., Dominguez G. Effect of formaldehyde and glutaraldehyde on electrical properties of car-diac purkinje fibers. *The journal of general physiology.* 1969; 53: 530-540
97. Franchini M., Capra F., Targher G., Montagnana M., Lippi G. Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: from biology to clinical implications. *Thrombosis journal* 2007; 5: 14
98. Gali R., Mamza Y., Chiroma F., Daja A. ABO blood group and total serum cholesterol among healthy individuals in a Nigerian population. *Internet journal of laboratory medicine.* 2010; 4(2):2
99. Gedde M.M., Davis D.K., Huestis W.H. Cytoplasmic pH and human erythrocyte shape. *Biophysical journal.* 1997; 72: 1234-1246
100. Grabowski, E.F., Jaffe E.A., Weksler B.B. Prostacyclin production by cultured human endothelial cells exposed to step increases in shear stress. *Journal of laboratory and clinical medicine,* 1985; 105: 36–43
101. Grabowski E.F., Weksler B.B., Jaffe E.A., Klein M.A. Effects of shear stress on prostaglandin I-2 (prostacyclin) production by cultured bovine aortic endothelial cells. *Circulation,* 1982; 66(2): 53
102. Gros M., Vrhovec S., Brumen M., Svetina S., Zeks B. Low pH induced shape changes and vesiculation of human erythrocytes. *General physiology and biophysics,* 1996; 15(2): 145-63
103. Hadengue A., Razavian S.M., Del-Pino M., Simon A., Levenson J. Influence of sialic acid on erythrocyte aggregation in hypercholesterolemia. *Thrombosis and haemostasis* 1996; 76(6): 944-9
104. Hanson E., Karlsson S., Jood K., Nilsson S., Blomstrand C., Jern C. No evidence for an association between ABO blood group and overall ischemic stroke or any of the major etiologic subtypes. *Thrombosis research.* 2012; 130(3): 339-42

105. He M., Brian W., Kathy R., Manson J. E., Rimm E., Frank B. Hu F.B., Qi L. ABO blood group and risk of coronary heart disease in two prospective cohort studies. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012; 32(9): 2314-20
106. Henderson J., Seagroatt V., Goldacre M. Ovarian cancer and ABO blood groups. *Journal of epidemiology and community health*. 1993; 47: 287-289
107. Huang Y.X., Wu Z.J., Mehrishi J., Huang B.T., Chen X.Y., Zheng X.J., Liu W.J., Luo M. Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2011; 15(12): 2634-2642
108. Hunter R.J. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. London: Academic; 1981. 386 p.
109. Ihle-Hansen H., Thommessen B., Wyller T.B., Engedal K., Fure B. Risk factors for and incidence of subtypes of ischemic stroke. *Functional neurology*, 2012; 27(1): 35-40
110. Ikeda Y., Handa M., Kawano K., Kamata T., Murata M., Araki Y., Anbo H., Kawai Y., Watanabe K., Itagaki I., et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *The journal of clinical investigation*. 1991; 87(4): 1234-1240
111. Jick H., Westerholm B., Vessey M.P., Lewis G.P., Slone D., Inman W.W., Shapiro S., Worcester J. Venous thromboembolic disease and ABO blood type. *The Lancet*. 1969; 293(7594): 539 – 542
112. Kamada H., Tsubota K., Nakamura M., Wada S., Ishikawa T., Yamaguchi T. Computational study on effect of stenosis on primary thrombus formation. *Biorheology*. 2011; 48(2): 99-114
113. Kamada H., Imai Y., Nakamura M., Ishikawa T., Yamaguchi T. Computational analysis on the mechanical interaction between a thrombus and red blood cells:

- possible causes of membrane damage of red blood cells at microvessels. *Medical Engineering and Physics*. 2012; 34(10): 1411-1420
114. Kario K., Matsuo T. Relation between sialic acid concentrations and the haemostatic system in the elderly. *BMJ*, 1993; 306: 1650-1
  115. Katchalsky A., Danon D., Nevo A. Interactions of polyelectrolytes with the red blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1959; 33(1):120-138
  116. Kak V.K., Gordon D.S. ABO blood groups and Parkinson's disease. *Ulster. Med. J.* 1970; 39(2): 132–134
  117. Koley S. The distribution of the ABO blood types in patients with diabetes mellitus. *Anthropologist*, 2008; 10(2): 129-132
  118. Konstantopoulos K., Chow T.W., Turner N.A., Hellums J.D., Moake J.L. Shear stress-induced binding of von Willebrand factor to platelets. *Biorheology*. 1997; 34(1): 57-71
  119. Kung-Ming J., Chien S. Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *The journal of general physiology*. 1973; 61: 638-654
  120. Kwon H.M., Lee Y.S., Bae H.J., Kang D.W. Homocysteine as a predictor of early neurological deterioration in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2014; 45: 871-873
  121. Lerche D. Hessel E., Donath E. Investigation of the La<sup>3+</sup> - induced aggregation of human red blood cells. *Stud, biophys.*1979; 75: 95-106
  122. Lerche D., Augsten K., Donath E. Scanning electron microscopic characterization of the La<sup>3+</sup> and concanavalin A-induced aggregation of untreated and neuraminidase- treated human erythrocytes. *Experimental pathology*. 1981; 20:156-162
  123. Lerche D., Hessel E. Aggregation studies of human erythrocytes after modification of their membrane surface. *Studia biophysica*. 1978; 74:37-38

124. Levine S., Levine M., Sharp K. A., Brooks D. E. Theory of the electrokinetic Behavior of human erythrocytes. *Biophys. J.* 1983; 42: 127-135
125. Loeb I. The origin of the electrical charges of colloidal particles and living tissues. *The Journal of general physiology.* 1922; 351-371
126. Lowe G.D, Jaap A.J, Forbes C.D. Relation of atrial fibrillation and high haematocrit to mortality in acute stroke. *Lancet.* 1983; 1(8328): 784-786
127. Macafee A. L. ABO blood groups and rheumatic heart disease. *Ann. Rheum. Dis.* 1965; 24: 392-393
128. Maeda N., Imaizumi K., Sekiya M., Shiga T. Rheological characteristics of desialylated erythrocytes in relation to fibrinogen-induced aggregation. *Biochimica et biophysica acta,* 1984; 776(1): 151-158
129. Manwani B., McCullough L.D. Sexual dimorphism in ischemic stroke: lessons from the laboratory. *Womens health,* 2011; 7(3): 319–339
130. Marikovsky Y. and Danon D. Electron microscope analysis of young and old red blood cells stained with colloidal iron for surface charge evaluation. *The journal of cell biology.* 1969; 43: 1-7
131. Momtselidze N., Mantskava M., Mchedlishvili G. Hemorheological disorders during ischemic brain infarcts in patients with and without diabetes mellitus. *Clinical hemorheology and microcirculation,* 2006; 35(1-2): 261-4
132. Mori D., Yano K., Tsubota K., Ishikawa T., Wada S., Yamaguchi T. Computational study on effect of red blood cells on primary thrombus formation. *Thrombosis research* 2008; 123(1): 114-21
133. Ni H., Amme R.C. Ion redistribution in an electric double layer. *Journal of colloid and interface science.* 2003; 260(2): 344-348
134. Nigam P.K, Narain V.S, Kumar A. Sialic acid in cardiovascular diseases. *Indian journal of clinical biochemistry.* 2006; 21(1): 54-61
135. Pai G.P., Dayakar M.M., Shaila M., Dayakar A. Correlation between "ABO" blood group phenotypes and periodontal disease: Prevalence in south Kanara

- district, Karnataka state, India. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2012; 16(4): 519-523
136. Pretorius E., Lipinski B. Thromboembolic ischemic stroke changes red blood cell morphology. *Cardiovascular pathology*, 2013; 22(3): 241-242
  137. Rampling M.W. The binding of fibrinogen and fibrinogen degradation products to the erythrocyte membrane and its relationship to haemorheology. *Acta biologica et medica Germanica*, 1981; 40(4-5): 373-378
  138. Rao B.N., Reddy V.D., Sahu P.S., Veerendra K. A., David M.A., Yugandhar P., Muralishwar R.J. ABO blood group distribution and pulmonary tuberculosis. *Journal of clinical and diagnostic research*, 2012; 6(6): 943-946
  139. Ricci S., Patoia L., Berrettini M. Fatty acid pattern of red blood cell membranes and risk of ischemic brain infarction: a case-control study. *Stroke*, 1987; 18: 575-578
  140. Rottino A. and Angers J. The electrophoretic mobility of erythrocytes in carcinoma and other diseases. *Cancer research*. 1961; 1: 1445-1449
  141. Ruggeri Z.M. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thrombosis and haemostasis*, 1993; 70: 119-123
  142. Salomon O., Steinberg D.M., Koren-Morag N., Tanne D., Seligsohn U. Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood*, 2008; 111 (8): 4113-4117
  143. Seaman G. V. F., Knox R. J., Nordt F. J., Regan D. H. Red cell agins. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes. *Blood*. 1977; 50: 1001-1011
  144. Seaman G.V. F., Heard D.H. The surface of the washed erythrocyte as a polyanion. *The journal of general physiology*. 1960; 44: 251-268
  145. Shiga T., Maeda N., Sudo T. Kinetic measurement of red cell deformability: a modified micropipette aspiration technique. *Jap. J. Physiol*. 1979; 29: 707-722

146. Schmid-Schonbein H., Gaehtgens P., Hirsch H. On the shear rate dependence of red cell aggregation in vitro. *The journal of clinical investigation*. 1968; 47: 1447-1454
147. Skalak R., Zhu C. Rheological aspects of red blood cell aggregation. *Biorheology*. 1990; 27(3-4): 309-25
148. Skalak R. Aggregation and disaggregation of red blood cells. *Biorheology*. 1984; 21:463-476
149. Slack, S.M., Cui Y., Turitto, V.T. The effects of flow on blood coagulation and thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 1993; 70: 129-134
150. Sonneveld M. A. H., Anouk C van Dijk, Evita G van den Herik etc. Relationship of Von Willebrand Factor with carotid artery and aortic arch calcification in ischemic stroke patients. *Atherosclerosis*. 2013; 230(2):210-5
151. Stoltz J.F., Donner M. Red blood cell aggregation: measurement and clinical application. *A journal of International Union of Angiology*. 1987; 6(2): 193-201
152. Turitto, V. T., Benis, A. M., Leonard E. F. Platelet diffusion in flowing blood. *Industrial & engineering chemistry fundamentals*, 1972; 11(2): 216–223
153. Vassar P. S., Hards J. M., Brooks D. E., Hagenberger B., Seaman G. V. F. Physicochemical effects of aldehydes on the human erythrocyte. *The journal of cell biology*, 1972; 58: 809-818
154. Vayá A., Falcó C., Réganon E., Vila V., Martínez-Sales V., Corella D., Contreras M.T., Aznar J. Influence of plasma and erythrocyte factors on red blood cell aggregation in survivors of acute myocardial infarction. *Thrombosis and haemostasis*, 2004; 91(2): 354-359
155. Wakabayashi I., Sakamoto K., Yoshimoto S., Masui H. Relation of serum sialic acid to lipid concentrations. *BMJ*, 1992; 305: 562-563

156. Weihe E., Hartschuh W., Metz J. and Brühl U. The use of ionic lanthanum as a diffusion tracer and as a marker of calcium binding sites. *Cell and tissue research*, 1977; 178(3): 285-302
157. Williams F.M, Carter A.M, Hysi P.G etc. Ischemic stroke is associated with the ABO locus: the EuroCLOT study. *Ann Neurol*. 2014;75(1):166-7
158. Wu K.K., Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annual review of medicine*, 1996; 47: 315-331
159. Yaari A. Mobility of human red blood cells of different age groups in an electric field. *Blood*. 1969; 33: 159-163
160. Zakai N.A, Judd S.E, Alexander K., McClure L.A, Kissela B.M, Howard G., Cushman M. ABO blood type and stroke risk: the Reasons for geographic and racial differences in stroke study. *J Thromb Haemost*. 2014; 12: 564–70.
161. Zhang H., Mooney C.J., Reilly M.P. ABO Blood groups and cardiovascular diseases. *International Journal of vascular medicine*. 2012; 2012: 641917