

## КЛИНИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ ОЦЕНКИ РЕТРАКЦИИ ТРОМБА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПОКРЫТИЯ

Садыков Р.А., Джумаева Н.Э., Ким О. В., Юсупов М.М.

## БИОҚОПЛАНИШНИ ШАКЛЛАНТИРИШДА ТРОМБ РЕТРАКЦИЯСИНИ БАҲОЛАШ УЧУН КЛИНИК СИНОВЛАР

Садыков Р.А., Джумаева Н.Э., Ким О.В., Юсупов М.М.

## CLINICAL TESTS TO EVALUATE THROMBUS RETRACTION TO FORM A BIOSCOATING

Sadykov R.A., Jumaeva N.E., Kim O.V., Yusupov M.M.

Республиканский специализированный научно-практический  
медицинский центр хирургии им. акад. В. Вахидова

**Мақсад:** Яллиғланишга қарши настероид дори воситалари (ЯҚНДВ) қабул қиладиган соғлом инсон ва беморларда тромб зичлигини баҳолашда бевосита ва билвосита клиник тестлар ёрдамида қоннинг қуйқлашиш ретракцияси динамикасини ўрганиш. **Материал ва усуллар:** тажриба 29 беморда ўтказилди, улардан 14 таси соматик патология белгиларисиз ( 8 эркак ва 6 аёл), ва 15 таси ( 8 эркак ва 7 аёл) ЯҚНДВ қабул қилувчи юрак ишемик касаллиги бор беморлар. **Натижа:** биринчи гуруҳдаги соғлом инсонларда Ли-Уайт бўйича қоннинг қуйқлашиш вақти  $10,35 \pm 0,41$ , иккинчи гуруҳда  $12,3 \pm 2,3$  ( $p > 0,05$ ). 90 дақиқадан сўнг тромб зичлигининг ошиши, 120 дақиқагача янада кўтарилиши кузатилди. Соғлом инсонларда тромб зичлиги: 30 дақиқада –  $1502,4 \pm 32,6$ ; 60 дақиқада –  $1829,3 \pm 48,7$ ; 90 дақиқада –  $2254,4 \pm 74,1$ ; 120 дақиқада –  $2972,6 \pm 50,3$  ( $P < 0,05$ ). Иккинчи гуруҳдаги олинган натижалар тромб зичлиги кўрсаткичини кўтарилишини кўрсатди.: 30 дақиқада –  $896 \pm 28,3$ ; 60 дақиқада –  $1483,7 \pm 32,5$ ; 90 дақиқада –  $1960 \pm 80,6$ ; 120 дақиқада –  $2548 \pm 74,2$  ( $p < 0,05$ ). **Хулоса:** тромб ретракциясини аниқлашдаги билвосита усуллар, қон қуйқлашиш жараёнида суюқлик ажралиши тромб зичлигининг тўлиқ факторини, қаттиқлигини бермайди. Шунинг ҳам билан олган ҳолда, бевосита усуллар орқали унинг физик-механик таркибини ўзгаришини аниқлаш мумкин. Бундай усуллар қоннинг қуйқлашиш системасини тўғри баҳолаш ва операциядан кейинги асоратларни олдини олиш имконини беради. **Калит сўзлар:** қоннинг қуйқлашиши, тромб ретракцияси, бевосита ва билвосита усуллар, тромб зичлиги.

**Objective:** To study comparative dynamics of blood clot retraction using an indirect clinical test in with the results of a direct assessment of thrombus density in healthy donors and patients taking NSAIDs. **Materials and methods:** Studies were conducted in 29 patients, of whom 14 (8 men and 6 women) were without signs of somatic pathology and 15 (8 men and 7 women) with coronary heart disease taking NSAIDs. **Results:** In the healthy patients, the Lee-White coagulation time was  $10.35 \pm 0.41$  seconds, in the second group,  $12.3 \pm 2.3$  ( $p > 0.05$ ). After 90 minutes, a significant increase of density was observed, followed by its growth to 120 minutes. Thrombus density in healthy donors: 30 min –  $1502.4 \pm 32.6$ ; 60 min –  $1829.3 \pm 48.7$ ; 90 min –  $2254.4 \pm 74.1$ ; 120 min –  $2972.6 \pm 50.3$  ( $p < 0.05$ ). The results of the second group showed a clear increase in blood clot density: 30 min –  $896 \pm 28.3$ ; 60 min –  $1483.7 \pm 32.5$ ; 90 min –  $1960 \pm 80.6$ ; 120 min –  $2548 \pm 74.2$  ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** More informative and promising are the methods that allow to directly assess the changes in its physical and mechanical properties. Such methods can be used in the clinic and will allow a better assessment of the blood coagulation system and predict possible postoperative complications.

**Key words:** bloodcoagulation, thrombus retraction, indirect and direct methods, thrombus density.

В норме свертывание крови представляет собой процесс, сохраняющий баланс между кровотечением и тромбообразованием. Нарушения свертывания крови связаны с риском кровотечения либо формирования тромба у пациентов с инфарктом, инсультом, глубоким венозным тромбозом, тромбоэмболией легочной артерии и т.д. [6]. Возможность раннего выявления гемостатического профиля играет важную роль в своевременном назначении соответствующих препаратов, что позволяет избежать осложнения. Необходимость такой диагностики возникает в ряде случаев: мониторинг гемостатической активности в предоперационном периоде [7], трансфузионная терапия, лечение гематологических заболеваний, политравмы, сепсиса и другие острые состояния [1].

Ретракция кровяного сгустка (РКС) – исследование основано на изучении способности тромбоцитов формировать сжимающуюся сеть из фибриновых волокон, в которой заключены форменные элементы крови. В процессе образования сгустка крови отделяется жидкая часть – сыворотка. Чем плотнее тромб, тем в большей степени отделяется сыворотка. В клинической практике используются прямые [3] и непрямые [4] методы оценки РКС. Прямые методы основаны на измерении силы ретракции в процессе формирования тромба. К ним можно отнести различные методики и гемоанализаторы, которые позволяют оценить силу сокращения нитей фибрина, а также эластичность тромба [1].

Оценка РКС цельных образцов крови дает более полную картину гемостаза по сравнению с рутинны-

ми клиническими исследованиями (протромбиновое время, АЧТВ, число тромбоцитов и т.п.) [9].

В клинической практике наибольшее распространение получили непрямые методы, которые заключаются в измерении объема сыворотки, выделяемой из сгустка крови при его ретракции или в оценке степени уменьшения объема сгустка разведенной плазмы со стандартным содержанием тромбоцитов. Оценка РКС цельных образцов крови дает более полную картину гемостаза по сравнению с рутинными клиническими исследованиями (протромбиновое время, АЧТВ, количество тромбоцитов и т.п.) [9]. Независимо от метода исследований на процесс ретракции могут влиять многие факторы, такие как гематокрит, содержание эритроцитов, количество тромбоцитов и их функциональное состояние, а также количество фибриногена. Согласно результатам последних исследований, непрямые методы не в полной мере отражают состояние свертывающей системы крови, недостаточно чувствительны и способны отражать лишь грубые нарушения гемостаза [4].

В одном из исследований РКС оценивалась изменение вязкоэластических сил с применением математической модели. Теоретически было высказано предположение, что тромб представляет собой биополимер с полуфиксированной полимерной сетью, представленной нитями фибрина, в которую включаются эритроциты, тромбоциты [8]. Образец цельной крови был размещен между двумя пластинами, между которыми проводились замеры расстояния в процессе формирования сгустка [5].

В современной практике нашли применение биокомпоненты механизма свертывания крови, позволяющие добиться стойкого гемостаза, которые могут быть использованы в качестве биопокрытий. К таковым можно отнести тромбин, фибриноген, на основе которого разработан и используется фибриноновый клей, а также коллаген [2].

#### Цель исследования

Сравнительное изучение результатов непрямого клинического теста и прямой оценки плотности тромба у пациентов в норме и на фоне приема НПВС.

#### Материал и методы

Исследования проведены у 29 пациентов. У 14 больных (8 мужчин и 6 женщин) признаки соматической патологии отсутствовали, 15 (8 мужчин и 7 женщин) больных с ишемической болезнью сердца принимали НПВС. Возраст пациентов – от 37 до 67 лет (средний возраст 41,4 года). Для исследований кровь из локтевой вены в количестве 20 мл брали утром натощак. Кровь разливали в 4 чистых цилиндрических пробирки по 3 мл. Процесс свертывания крови прослеживали в термостате при температуре 37°C. Исследования проводили через 30, 60, 90 и 120 мин после начала инкубации. В указанные промежутки времени из очередной пробирки сливалась сыворотка, и замерялось ее количество. Проводился перерасчет для определения относительного объема сформированного тромба.

Для прямой оценки плотности образовавшийся в пробирке тромб вынимали. Как правило, тромб

формировался в виде цилиндрического столбика по форме пробирки. Плотность тромба определяли с помощью специального устройства (рис. 1).

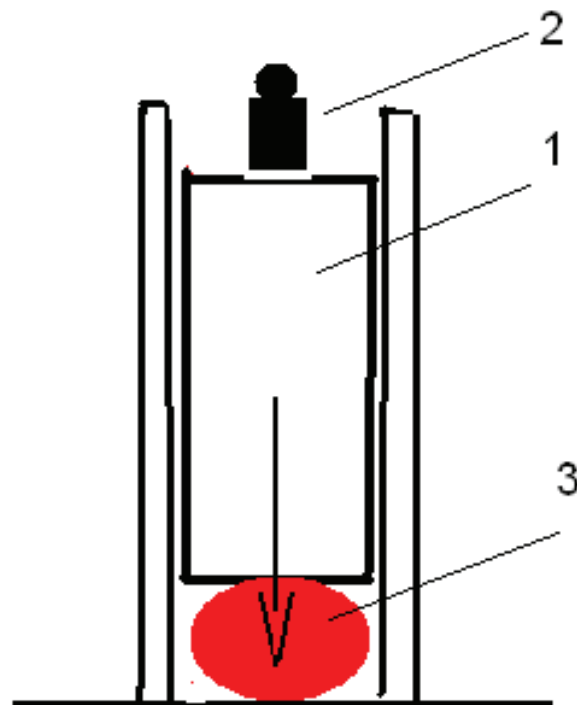


Рис. 1. Схема устройства для измерения плотности тромба.

Гильотину прибора (1) с площадью контакта с исследуемым веществом 0,04 см<sup>2</sup> устанавливали на поверхность тромба (3). Путем наращивания груза на верхней площадке (2) гильотины определяли момент раздавливания тромба. Вычисляли силу, при которой происходил процесс разрушения тромба по формуле:

$$F = \frac{P \cdot 9,8 \times 10}{S}$$

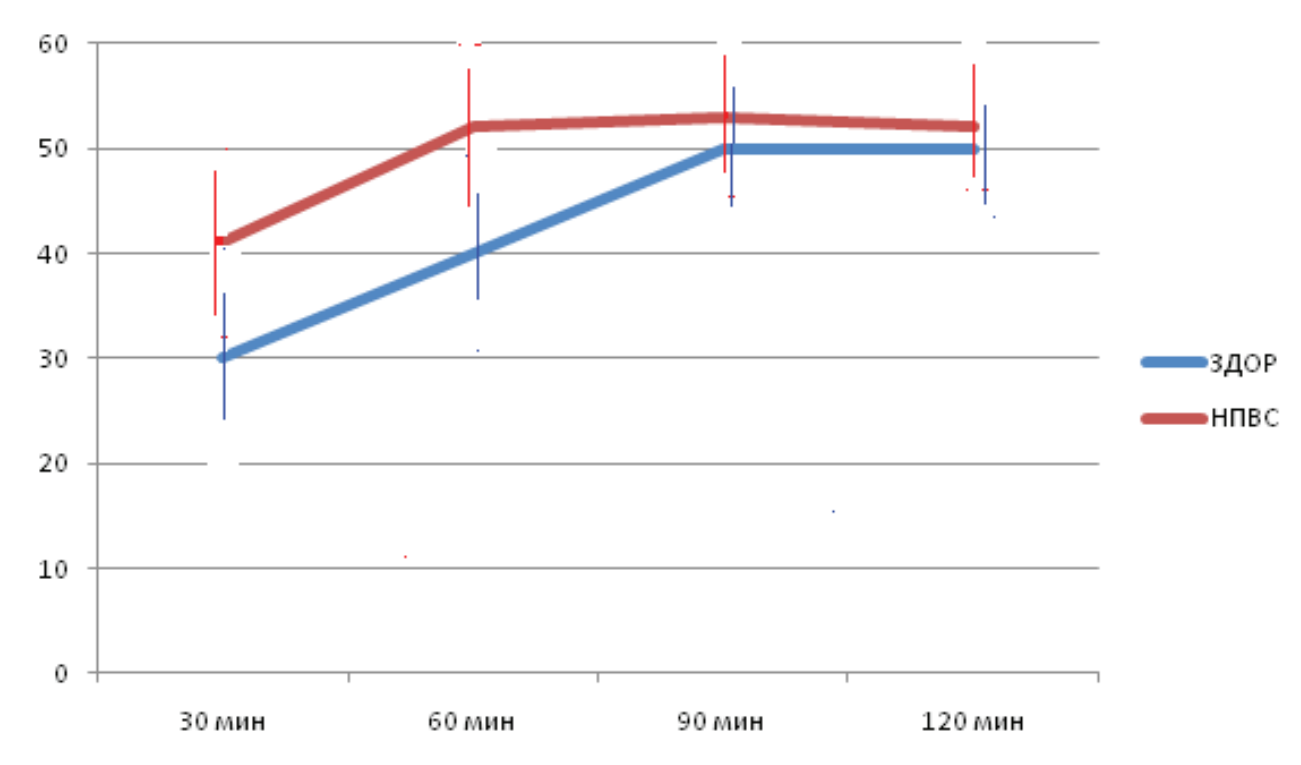
где: P – масса гильотины + масса грузиков (г); S – площадь контакта (см<sup>2</sup>); F – сила в Паскалях (Па/см<sup>2</sup>).

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке методом вариационной статистики по Стьюденту.

#### Результаты и обсуждение

При выполнении исследований определяющим критерием служил фактор приема НПВС согласно рекомендациям врача. Пациенты обеих групп жалоб не предъявляли, клинических признаков нарушения свертывающей системы крови не наблюдалось. У здоровых лиц (1-я гр.) время свертывания крови по Ли – Уайту составило 10,35±0,41, у пациентов 2-й группы – 12,3±2,3 (p>0,05).

Результаты исследования ретракции тромба непрямым методом представлены на рис. 2.



**Рис. 2. Зависимость относительного объема тромба (%) от времени инкубации у здоровых лиц и пациентов, принимающих НПВС.**

Исследование ретракции непрямым клиническим способом дает возможность оценить ее степень в период 120 минут после начала свертывания крови. Согласно полученным нами результатам, этот показатель у обследованных лиц составил  $47,4 \pm 5,8\%$ . Прослеживается слабый рост показателя: 30 мин –  $30,2 \pm 5,4$ , 60 мин –  $38,4 \pm 5,2$ , 90 мин –  $48,1 \pm 7,5$ , 120 мин –  $47,4 \pm 5,8$  ( $p > 0,05$ ). Наиболее значимый рост регистрировался в период между 30 и 60 мин. Через 90 и 120 минут имела место лишь тенденция к роста показателя, однако достоверно значимой она не была. Динамичный рост показателей ретракции установлен лишь у 4 пациентов, тогда как у 10 через 60 минут наблюдались значительные колебания значений, а в ряде случаев – резкое снижение показателей. Логично предположить, что процесс формирования и уплотнения тромба не может иметь столь скачкообразный характер и должен нести в определенной степени нарастание физических характеристик тромба.

У пациентов, которые принимали НПВС, ретракция тромба, согласно полученным результатам, через 120 мин составляла  $51,3 \pm 6,4\%$ . Этот показатель был несколько выше, чем у здоровых лиц ( $47,4 \pm 5,8\%$ ), однако без статистически значимых различий. Изучение процесса ретракции непрямым методом в динамике продемонстрировало значительные колебания. К началу исследования на 30 мин имело место расхождение показателей от 10 до 70%, что снижает возможность проведения сравнительных статистических исследований. Динамика усредненных показателей при приеме НПВС на 30-й мин составила  $42,7 \pm 8,3$ , на 60-й

мин –  $54,1 \pm 4,5$ , на 90-й мин –  $58,2 \pm 6,6$ , на 120-й мин –  $51,3 \pm 6,4$  ( $p > 0,05$ ). Тем не менее, в большинстве случаев имеется тенденция к росту показателей к 60 мин исследования. В последующие сроки подобная тенденция исчезает и не несет статистически значимых значений.

Сравнение абсолютных значений, а также динамики изменений показателей ретракции известным способом у больных двух групп не выявило статистически значимой разницы. В связи с этим нами поставлена задача изучить динамику изменения плотности формирующегося тромба.

Плотность тромба оценивали по результатам оценки той силы, которая понадобилась для механического раздавливания тромба. Для создания идентичных условий для оценки плотности был использован тромб, полученный при проведении непрямого теста (рис. 3). Установлено, что в динамике исследований плотность тромба у всех обследованных возрастает.

Через 90 мин прослеживается достоверное повышение плотности тромба с последующим его ростом к 120-й мин. Плотность тромба у здоровых лиц: к 30-й мин составляла  $1502,4 \pm 32,6$ , к 60-й мин –  $1829,3 \pm 48,7$ , к 90-й мин –  $2254,4 \pm 74,1$ , к 120 мин-й –  $2972,6 \pm 50,3$  ( $p < 0,05$ ).

Аналогичные исследования проведены также у больных, которые принимали НПВС. Полученные результаты продемонстрировали отчетливый рост показателей плотности тромба: 30 мин –  $896 \pm 28,3$ , 60 мин –  $1483,7 \pm 32,5$ , 90 мин –  $1960 \pm 80,6$ , 120 мин –  $2548 \pm 74,2$  ( $p < 0,05$ ). Обращает на себя внимание тот факт, что у пациентов на фоне приема лекарственных

препаратов в первые 30 мин исследования происходит статистически значимое снижение плотности тромба ( $p < 0,05$ ). Через 60 мин от начала процесса свертывания крови все еще определяется разница в показате-

лях плотности тромба, однако она не столь выражена как в первые 30 мин. В последующие сроки исследований тенденция к более низким значениям плотности тромба у лиц, получающих НПВС, сохраняется.

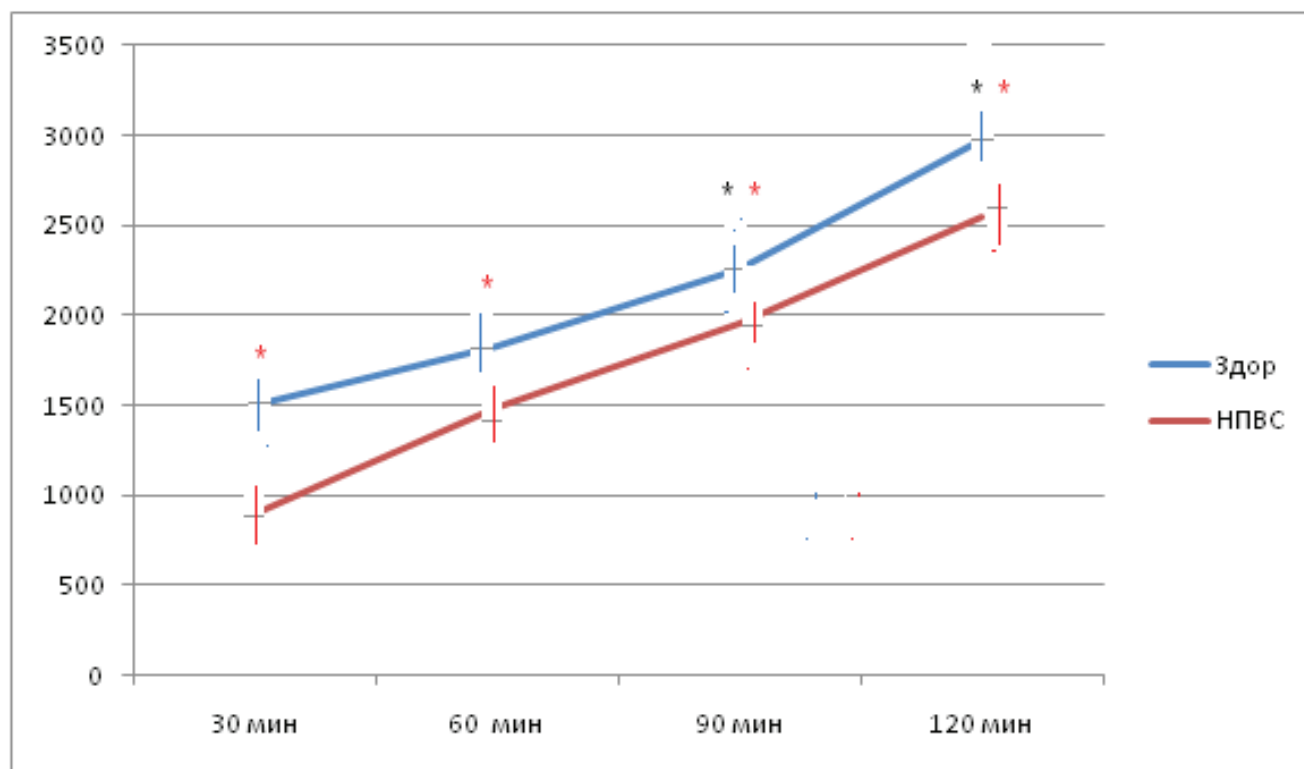


Рис. 3. Зависимость плотности тромба (Па) от времени инкубации у здоровых лиц и пациентов, принимающих НПВС.

#### Обсуждение

Согласно результатам многих клинических исследований, непрямые методы исследования системы свертывающей системы крови не в полной мере отражают нарушения в системы свертывания крови и не могут служить прогностическим критерием осложнений после хирургических вмешательств. Это относится и к результатам определения ретракции кровяного сгустка, который недостаточно чувствителен и даже при нормальных значениях не исключает риск неустойчивого гемостаза во время и после операции, а также развития тромбоэмболических осложнений [4].

В ходе наших исследований существенной разницы в показателях ретракции кровяного сгустка по данным непрямого метода в норме и на фоне лечения НПВС не обнаружено. Также не прослежено статистически значимой динамики показателей ретракции тромба до 120-й мин исследования.

В качестве объективного метода оценки процесса формирования тромба нами использовано прямое определение его плотности путем измерения силы, необходимой для раздавливания тромба. Согласно полученным результатам, способность формирования тромба нарастает в течение всего периода исследования. Динамика носит отчетливый, статистически значимый характер. У пациентов, получающих НПВС, выявлены пониженные показатели плотности тромба, начиная с 30-й мин. Эта тенденция сохраняется до 120-й минуты. В то же время динамика роста плотно-

сти тромба в процессе всего периода исследований статистически значимый характер сохраняет.

Известные непрямые методы определения ретракции тромба, основанные на способности отделения жидкости в процессе свертывания крови, не в полной мере отражают основные факторы, такие как плотность, твердость, упругость. Более информативными и перспективными представляются методы, позволяющие напрямую оценить изменения физико-механических свойств тромба. Эти методы могут найти применение в клинике и позволят лучше оценить систему свертывающей системы крови и прогнозировать возможные послеоперационные осложнения.

#### Литература

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. – М.: Ньюдиамед, 2001. – 286 с.
2. Хоробрых Т. В. Фибриновый клей в неотложной абдоминальной хирургии: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2005. – 56 с.
3. Bombeli T., Spahn D. Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage // Brit. J. Anaesth. – 2004. – Vol. 36. – P. 275-287.
4. Favaloro E.J., Mohammed S. Platelet function testing: auditing local practice and broader implications // Clin. Lab. Sci. – 2010. – Vol. 23. – P. 21-31.
5. Harrison P. Platelet function analysis // Blood. – 2005. – Vol. 19. – P. 111-123.

6. Janmey P.A., McCormick M. E., MacKintosh F. C. Negative normal stress in semiflexible biopolymer gels // Nat. Mater. – 2007. – Vol. 6. – P. 48-51.

7. Lisman T., Caldwell S.H., Burroughs A.K. et al. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: The ups and downs // J. Hepatol. – 2010. – Vol. 53. – P. 362.

8. McMichael M.A., Smith S.A. Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations // Veterinary Clin. Pathol. – 2011. – Vol. 40. – P. 140-146.

9. Tutwiler V., Wang H., Litvinov et al. Interplay of Platelet Contractility and Elasticity of Fibrin / Erythrocytes in Blood Clot Retraction // Biophys. J. – 2017. – Vol. 112, №4. – P. 714-723.

#### **КЛИНИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ ОЦЕНКИ РЕТРАКЦИИ ТРОМБА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПОКРЫТИЯ**

Садыхов Р.А., Джумаева Н.Э., Ким О.В., Юсупов М.М.

**Цель:** сравнительное изучение динамики ретракции кровяного сгустка с помощью непрямого клинического теста и прямой оценки плотности тромба у здоровых людей и у пациентов, принимающих НПВС. **Материал и методы:** исследования проведены у 29 пациентов, 14 (8 мужчин и 6 женщин) из них без признаков соматической патологии, 15 (8 мужчин и 7 жен-

щин) с ишемической болезнью сердца, принимающие НПВС. **Результаты:** у здоровых пациентов время свертывания крови по Ли – Уайту составило  $10,35 \pm 0,41$ , 2-й –  $12,3 \pm 2,3$  мин ( $p > 0,05$ ). Через 90 мин прослеживается достоверное повышение плотности с последующим увеличением к 120 мин. Плотность тромба у здоровых лиц: 30 мин –  $1502,4 \pm 32,6$ ; 60 мин –  $1829,3 \pm 48,7$ ; 90 мин –  $2254,4 \pm 74,1$ ; 120 мин –  $2972,6 \pm 50,3$  ( $p < 0,05$ ). Во 2-й группе наблюдается отчетливый рост показателей плотности тромба: 30 мин –  $896 \pm 28,3$ ; 60 мин –  $1483,7 \pm 32,5$ ; 90 мин –  $1960 \pm 80,6$ ; 120 мин –  $2548 \pm 74,2$  ( $p < 0,05$ ). **Выводы:** более информативными и перспективными представляются методы, позволяющие напрямую оценить изменения физико-механических свойств кровяного сгустка. Подобные методы могут найти применение в клинике и позволят лучше оценить систему свертывающей системы крови и прогнозировать возможные послеоперационные осложнения.

**Ключевые слова:** свертывание крови, ретракция тромба, непрямые и прямые методы, плотность тромба.

