Тромбоз Гемостаз Реология

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Выпускается один раз в квартал
Основан в 2000 г.

Quaterly
Since 2000

№ 3

Октябрь 2006 г.

Научное общество **«Клиническая гемостазиология»**
Научное общество **«Клиническая гемореология»**

Учредитель: Е.В.Ройтман
Издатель: ООО «Гемостаз и реология» лиц. ИД № 05534
Журнал зарегистрирован Министерством печати и информации РФ
Свидетельство о регистрации ПИ №779636
Тираж 1500 экз.

Цена свободная
Подписной индекс Роспечать «Журналы России»
для организаций — 18363
для индивидуальных подписчиков — 18362

Информационная поддержка: Интернет-сайт «Гемостаз и реология» *www.hemostas.ru*

Контактный адрес: *Е.В.Ройтман* — РНЦХ РАМН, Россия, 119992, Москва, Абрикосовский пер. 2;
Тел./факс: (495)248-0662, 8 903 144-4634, e-mail: **hemostas@aha.ru**

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОБЗОРЫ

Вертикальный круговой кровоток в дуге аорты и инициирующие факторы атеросклероза

Ф. И. Тодуа, М. В. Берая
Институт Медицинской Радиологии, Тбилиси, Грузия

Vertical blood flow circle in aortic arch and initiating factors of atherosclerosis

F. I. Todua, M. V. Beraya
Institute of Medical Radiology, Tbilisi, Georgia

ВВЕДЕНИЕ

Клиническими и патофизиологическими наблюдениями подтверждено, что одним из патогенетических механизмов атеросклероза является генерализованное или хроническое воспаление, однако вопрос об этиологическом факторе остается открытым [1]. Гипотетическим фактором является обнажение или дисфункция эндотелия. Возможными причинами эндотелиальной дисфункции, способствующими атеросклеротическим поражениям сосудов, могут быть: модифицирование липопротеинов низкой плотности, образование свободных радикалов при курении, артериальная гипертензия, сахарный диабет, генетические нарушения, повышение концентрации плазматического гомоцистеина, инфекционные микроорганизмы или комбинации этих факторов. Независимо от фактора эндотелиальной дисфункции, атеросклеротические поражения сосудов проявляются в определенных участках крупных артерий и обусловлены низким уровнем напряжения сдвига, рециркуляторными зонами кровотока, увеличением времени межклеточных взаимодействий [2, 3, 4, 5].

Целью исследования явилось изучение особенности потока крови в дуге аорты как прототипа циркулярного потока артериальных разветвлений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гемодинамические параметры в восходящей части аорты, дуге и нисходящей части аорты были изучены у 35 практически здоровых мужчин в возрасте от 15 до 45 лет. Частота сердечных сокращений составляла 68±7, артериальное давление — 125/75±10 мм рт. ст. Всем обследуемым было проведено комплексное клиническое обследование, биохимический анализ крови, ЭКГ, трансторакальная эхокардиография и магнитно-резонансная ангиография (РС) на аппарате Siemens-Avanto.

Все МРА изображения были получены при задержке дыхания триггерированием на ЭКГ. Изучали среднюю и пиковую скорость, средний и истинный поток. Измерение параметров проводили на 11 разных уровнях противоположных стенок аорты от синусов Вальсальвы до дистальной части грудной аорты на участках площадью ≈0,7см^2 (**рис. 1**). Вычисляли напряжение сдвига по формуле: $\vec{\tau}=2\alpha\mu\vec{v}/d$ (1), где α — частотный параметр Уомерсли; μ — кажущаяся вязкость; v — скорость и d — диаметр потока.

Рис. 1. Участки измерения кровотока в дуге аорты (А) у разных стенок аорты (В).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая технические трудности получения точных гемодинамических параметров при МРА в больших артериях, аорта была выбрана в качестве объекта исследования из-за характерных для всех крупных ар-

Таблица 1.

Гемодинамические параметры в аорте

Место измерения	Пиковая систолическая и протодиастолическая скорость (ретроградная и антеградная см/сек)		Систолическое и протодиастолическое ускорение (ретроградное и антеградное см/сек^2)		Скорость кровотока в области плоского потока в протодиастоле (см/сек)
	Наружная стенка	Внутренняя стенка	Наружная стенка	Внутренняя стенка	
Вход в восходящую аорту	84,5 ±2,1 *22,3 ± 0,7* 49,5 ± 1,5	71,7 ± 1,7 *– 48,5 ± 0,5* 20,3 ± 0,3	563,7 ± 11,2 *– 467,2 ± 9,4*	476,5 ± 9,3 – 1112,1 ± 26,8 518,8 ± 10,3	19,0 ± 1,3
Начало дуги аорты	46,7 ± 1,5 *– 44,8* ± 1,0 25,3 ± 1,5	56,9 ± 2,1 *– 13,3* ± 0,7 15,5 ± 0,6	375,8 ± 8,4 *– 375,8* ± 7,8 127,9 ± 12,3	308,7 ± 9,1 *– 308,7* ± 7,8 53,6 ± 1,1	0 ± 0,2
Центральная часть дуги аорты	47,8 ± 0,4 *– 55,3 ± 0,7* 30,1 ± 0,4	59,3 ± 1,8 *– 13,3 ± 0,3* – 10,1 ± 0,2	315,4 ± 7,2 *– 953,2 ± 17,3* **1666,6 ± 35,4**	375,8 ± 8,9 *– 392,5 ± 7,2*	5,3 ± 1,2
Перешеек	60,1 ± 1,2 *– 142,6* ± 10,2 128,7 ± 9,9	74,7 ± 2,5 *– 10,4* ± 0,6 20,5 ± 0,5	402,6 ± 10,1 **– 1887,8± 41,5** **2523,3 ± 47,8**	496,6 ± 8,9 *– 362,4* ± 7,8 52,2 ± 0,7	**0 ± 0,1**
Вход в грудную аорту	68,5 ± 1,9 *– 12,7 ± 0,3* 17,5 ± 0,5	68,2 ± 1,5 *– 127,6 ± 10,3* 133,8 ± 12,7	456,3 ± 9,3 *– 397,2* 576,8 ± 9,3	456,3 ± 7,4 – 1763,8 ± 37,5 **3611,1 ± 77,8**	10,7 ± 1,8
Центральная часть грудной аорты	58,4 ± 1,3 *– 18,7 ± 0,7*	54,9 ± 1,3 *– 122,4 ± 15,4* 40,7 ± 0,7	389,2 ± 9,2 *– 389,2 ± 8,5*	389,2 ± 9,4 – 2309,8 ± 49,9 **2253,5 ± 47,8**	18,6 ± 2,2

терий зон потока и напряжения сдвига. Результаты приведены в **таблице 1**.

Результаты МРА в области восходящей аорты: диаметр d=0,025 м, пиковая систолическая скорость V_{sys}=0,84 м/сек. Считая, что пиковое значение α=20, μ=0,004 Н. сек/м^2, получаем пиковое значение напряжения сдвига τ_{sys}=5,38 Н/м^2. На наружной стенке центральной части дуги аорты пиковое систолическое напряжение сдвига составляло τ_{sys}=307 Н/м^2, протодиастолическое напряжение сдвига — τ_{pr}=7,04 Н/м^2; пиковая систолическая скорость на наружной стенке области перешейки аорты (наиболее частое место образования жировых полосок и расслаивающих аневризм) — V_{sys}=0,60 м/сек (оно ниже, чем на внутренней стене — V_{sys}=0,75 м/сек). Систолическое напряжение сдвига составляло τ_{sys}=3,85 с/м^2, в то время как протодиастолическая скорость — V_{pr}=1,42 м/сек, а протодиастолическое напряжение сдвига — τ_{pr}=18,18 Н/м^2.

При круговом движении крови и наличии дополнительной центробежной силы на противоположных стенках сосуда формируются различные скорости потока [8, 9] (**рис. 5а**). При входе в аорту систолическая скорость больше у наружной стенки (**рис. 2**). В дуге аорты систолическая скорость увеличена на внутренней стенке (**рис. 3**). При круговом движении направление вектора скорости всегда тангенционально по отношению к траектории движения, и дистальнее перешейка круговое дви-

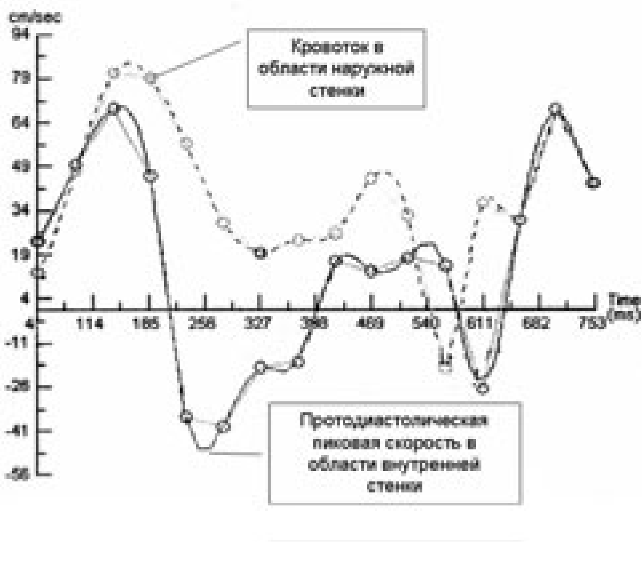

Рис. 2. График пиковой систолической скорости в области начала восходящей и грудной аорты (пунктирная линия — наружная стенка). Ретроградный кровоток продлен до 400 мсек. Ускорение кровотока на внутренней стенке 3 раза выше, чем на наружной (закрытие аортальных клапанов на 256 мсекунде).

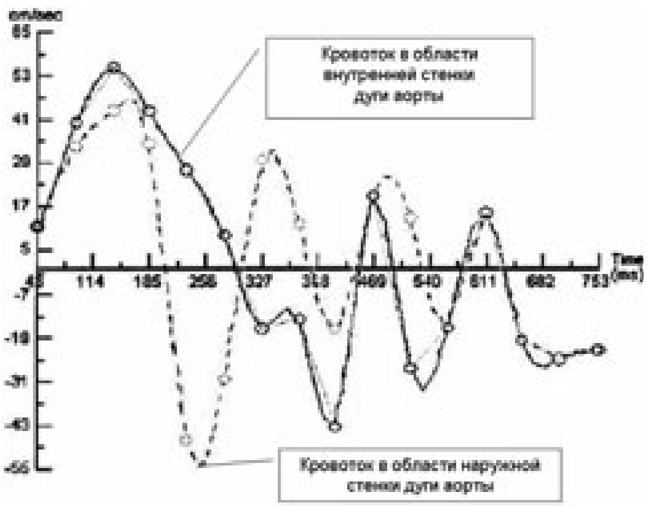

Рис. 3. График пиковой скорости в области центральной части дуги аорты (пунктирная линия — наружная стенка). Плоский профиль кровотока в области наружной стенки на 300 мсекунде; при этом скорость кровотока на внутренней стенке — 7 см/сек. Протодиастолическое ускорение кровотока в области наружной стенки 5 раз превышает систолическое. В последующие 350–700 мсекунд — кровоток маятникообразный.

Рис. 4. График пиковой скорости в области перешейка аорты (область с наиболее частыми жировыми полосками и диссекцией аорты). Пунктирная линия — наружная стенка.
На 185 мсекунде кровоток расщепляется; на 203 мсекунде потоки противоположно направлены с разными периодами колебания; на 300 мсекунде определяется задержка кровотока: линии перекрещиваются при нулевой скорости кровотока, при этом периоды колебаний выравниваются. В течение 0,3 мсекунд скорость кровотока увеличивается от 0 до 1 см/сек. Протодиастолическое ускорение кровотока в области наружной стенки в 6 раз превышает систолическое.

жение крови переходит в прямолинейное. Высокая систолическая скорость отмечалась на наружной стенке в начале грудной аорты (**рис. 4**, **табл. 1**).

При атероматозном поражении сосудов силами, воздействующими на артериальные стенки, являются: а) пристеночное напряжение сдвига с тангенциально направленным вектором (в среднем 1,5 Н/м^2) и б) растяжимое напряжение перпендикулярно направленным вектором к стенке сосуда (в среднем 150 Н/м^2). Установлено, что пристеночное напряжение сдвига, превышающее 40 Н/м^2, может повреждать эндотелиальные клетки [9].

По нашим МРА данным, в местах с низким систолическим напряжением сдвига протодиастолическое напряжение сдвига значительно выше, чем в местах с высоким систолическим напряжением. Поэтому гипотеза о возникновении атеросклероза в местах с низким напряжением сдвига, представляется невероятной. Трудно представить, что проходимость эндотелиальных клеток зависит только от низкого систолического напряжения сдвига, в то время как его пиковые значения в указанных местах в протодиастоле во много раз больше. Но при высокой протодиастолической скорости оно все-таки не достигало критического уровня для поражения стенки сосуда.

Уравнение каждого элемента движущейся жидкости определяется следующим образом: $m\vec{a} = \vec{F}_v + \vec{P} + \vec{F}$ (2), где m — масса, $\vec{a}$ — ускорение, $\vec{F}_v$ — вязкая сила (напряжение сдвига), $\vec{P}$ — массовая сила (вес), $\vec{F}$ — градиент давления. Поскольку в горизонтальном положении сосуда весом можно пренебречь, то величина ускорения пропорциональна вязким силам и градиенту давления: $m\vec{a} = \vec{F}_v + \vec{F}$ (2.1.).

Кровоток имеет пульсирующий характер. В протодиастоле в дуге аорты наружная часть потока отщепляется, меняет скорость и направление в ретроградном направлении, и после закрытия аортальных клапанов вновь становится антеградным (**рис. 2**, **3**, **4**, **5с**). В ретроградной фазе протодиастолы противоположные потоки, имея разные периоды колебания, интерферируют и не противостоят друг другу. После закрытия аортальных клапанов периоды колебания постепенно выравниваются (**рис. 3**, **4**).

При выяснении вопроса воздействия кровотока на сосудистую стенку, следует учитывать,

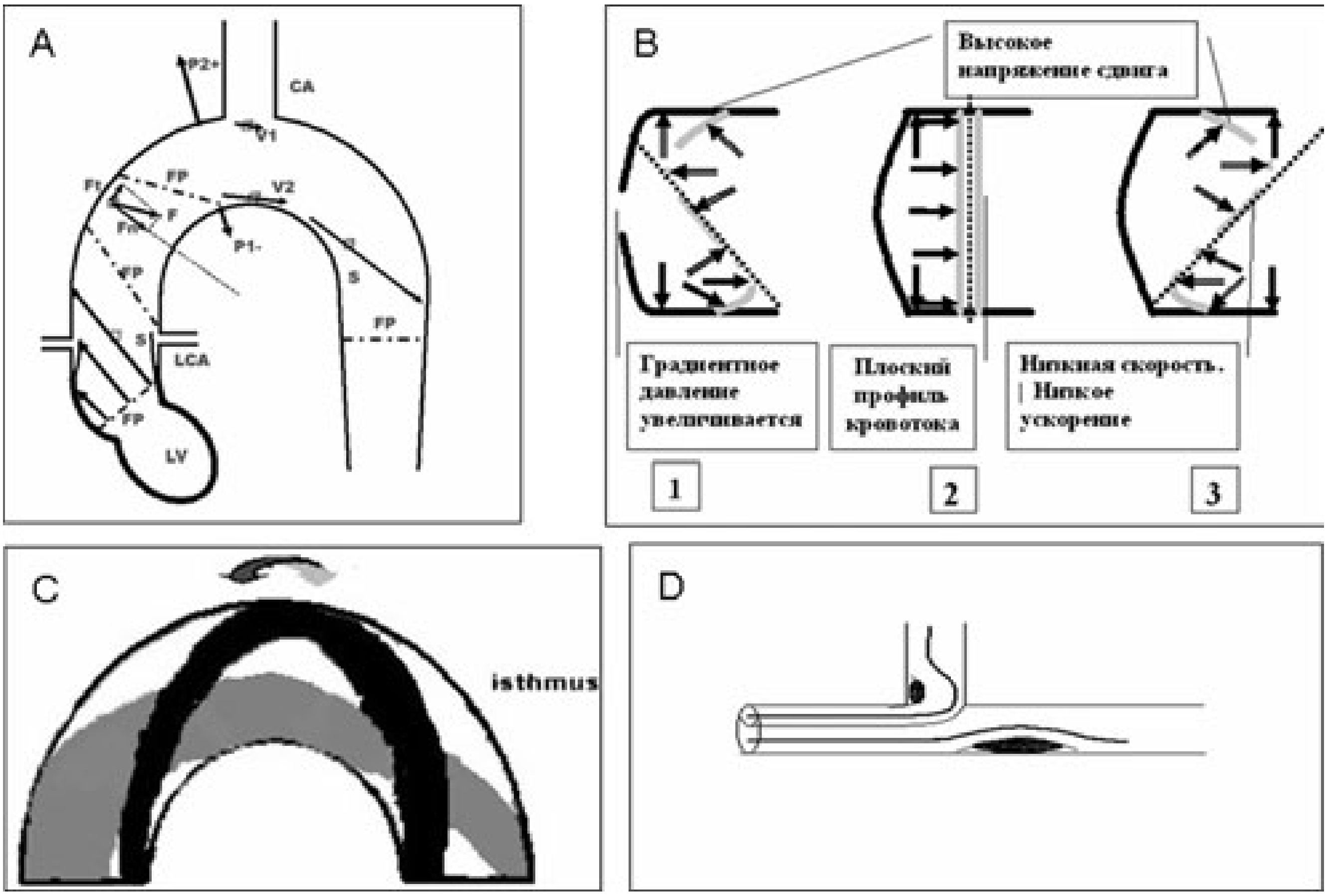

Рис. 5.

A. Кровоток в дуге аорты. V1, V2- скорость; P1, P2- давление на разных стенках сосуда; Fn, Tt — перпендикулярное и тангенциальное составляющие давления; FP — фронт проходящей волны; S — места сепарации пограничных зон с возвратным течением в систоле; LV — левый желудочек; LCA — левая коронарная артерия; CA — сонная артерия.

B. Образование течения с плоским профилем при высоком напряжении сдвига во время протодиастолы (наружная стенка в области перешейка — 1,3- до и после задержки кровотока). Стрелками указаны направления силы давления (растягивающие и сдвигающие силы) в разные периоды движения крови.

C. Расщепление кровотока в протодиастоле с указанием направления антеградного, ретроградного потока и критических участков для образования плоского течения.

D. Особенности кровотока в области артериальных разветвлений (на C и D ретроградный кровоток — темный).

что в области перешейка во время изменения протодиастолического ретроградного потока на антеградный, отмечается мгновенная локальная задержка аортального кровотока (**рис. 4**). В этот момент в этой области профиль потока плоский, пограничного слоя нет, и все элементы крови движутся в идентичной форме. При нулевой (или же при пиковой) скорости уравнение (2.1.) можно записать в следующем виде: $F = -F_v$ (2.1.1)

Перед началом кровотока градиентная сила давления в начальном участке высокое (резко уменьшается во время формирования полностью развитого потока), то есть у наружной стенки дуги аорты перед началом протодиастолического антеградного движения она будет на много больше 18,18 Н/м^2. Перед началом движения исходно высокое растяжимое (трансмуральное) давление одинаково передается во все направления (закон Паскаля), в том числе перпендикулярно (растяжимое) и тангенциально (напряжение сдвига) на адгезированный наружный слой жидкости. Если учесть, что 1 мм рт. ст. = 133,3 Н/м^2 и систолическое давление = 120 мм рт. ст, то напряжение сдвига в протодиастоле в области аорты при скорости кровотока $v_{pr} \approx 0{-}0{,}1$ см/сек составит τ_{pr}=16000 Н/м^2, что во много раз превышает среднее значение на-

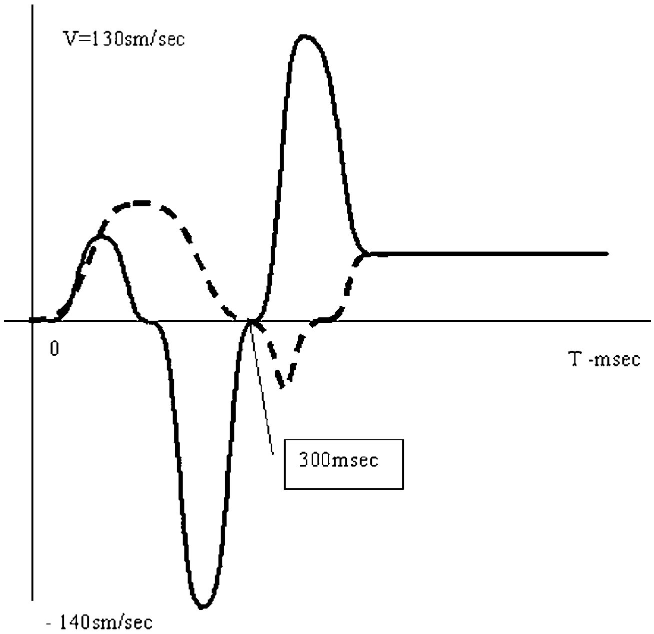

Рис. 6. Теоретически уточненная диаграмма изменения скорости кровотока в области перешейка аорты (при более коротких интервалах между измерениями на МРТ, кривые скорости в области пересечения с линиями абсцисс закруглены).

пряжения сдвига и растяжимое давление стенки сосуда, но время воздействия поражающей силы не превышает ≈0,3 мсек.

Высокое трансмуральное давление в области сильно сниженной скорости обеспечивает достижение предельной адгезии, превышающий когезию фосфолипидной мембраны эндотелия (этим и объясняется, что высокое артериальное/трансмуральное давление способствует атеросклеротическим изменениям крупных артерий). Адгезия становится особенно значимой во время инициации движения крови, так как в это время кажущаяся вязкость крови высокая (кровь не ньютоновская жидкость, вязкость повышается больше чем в 80 раз при снижении скорости сдвига до 0,1 сек$^{-1}$ [9]). Следует указать, что адгезия вычисляется от поверхностного натяжения крови. В момент начала движения элементов крови, растяжимое напряжение стенки высокое, градиентным силам давления противостоят инерционные силы и адгезия (уравнение 2.1.). В инициирующей стадии движения при наличии высокой вязкости кровь не успевает распадаться на взаимоскользящие слои, а в начале движения «заострение» кровотока происходит от прилежащей к сосудистой стенке поверхности потока.

Учитывая параболическую форму кривой нарастания скорости кровотока, в инициирующей стадии движения элементов крови можно указать на наличие низкого ускорения (**рис. 6**). В этом положении высоким градиентным силам в основном противостоит сила адгезии, которая изначально высокая, поэтому более справедливо говорить о сдвиговом растяжении поверхности эндотелиальной мембраны стенки сосуда и/или же об обнажении поверхностной мембраны эндотелия вместе с прилипшим под высоким растяжимым давлением с ней кровью, нежели о скольжении слоев жидкости между собой (**рис. 5в**, **7**).

В подтверждение значимости поверхностной силы натяжения для процесса развития атеросклероза можно указать:

1) Вязкость этанола и воды равны, поверхностное натяжение этанола в 4 раза ниже, чем у воды [10]. Вода и этанол — взаиморастворимые вещества; этанол свободно диффундирует в эндотелий. У лиц, злоупотребляющих этанолом, атеросклеротические поражения аорты меньше выражены.
2) В малом круге кровообращения венозная кровь смешивается с лимфой, что может способствовать снижению поверхностного натяжения крови (а — лимфа/интерстициальная жидкость растекается на всю клеточную поверхность и из-за низкого поверхностного натяжения/вязкости характеризуется высокой степенью просачивания между клетками. В жидкости, где нет форменных элементов, вязкость и поверхностное натяжение пропорциональны; б — венозная кровь в малом количестве содержит поверхностно активные вещества — желчные кислоты), и несмотря на то, что расход крови в малом и большом кругах кровообращения одинаков, атеросклеротического поражения сосудов малого круга не наблюдается.

Пульсирующий характер кровотока в сердце и крупных артериях способствует высокому ускорению кровотока и может быть обусловлен необходимостью повышения эффективности дистального транспорта крови путем уменьшения объема пограничного (вязкостного/диффузионного) слоя. Форма отсеченного конуса, максимально приближенная к цилиндрической, способствует уменьшению размеров пограничного слоя (рис. 8).

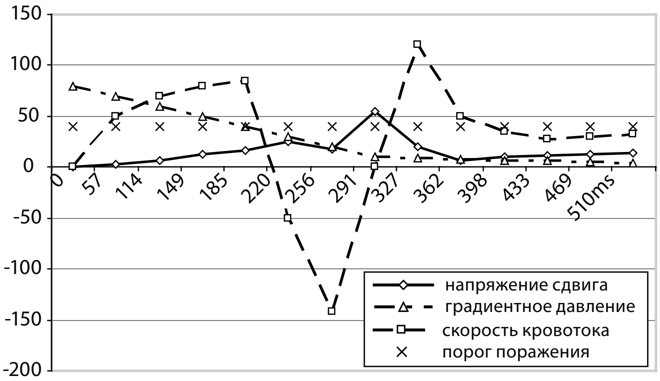

Рис. 7. Диаграмма изменения гемодинамических параметров во время кровотока в области наружной стенки перешейка.

Максимальное приближение формы проходящей крови в артериях к цилиндрической обеспечивают следующее факторы:

1) Скорость кровотока в систоле повышается быстро и при пиковой скорости резко срывается протодиастолой. При высокой скорости кровотока в сосуде не хватает объема для формирования полностью развитого потока (этим можно объяснить терапевтический эффект сердечных гликозидов).

Длина начального участка X=0,03d (Re), где Re=vdρ/μ при условии, что диаметр d=2,5 см и число Рейнольдса в начальной части аорты не менее 2500. X=187,5 см при реальной длине аорты ≤ 60см). В крупных артериях кровоток измеряется от места разветвления (по принципу Гюгенса — волнового расширения пространства). Кровоток в аорте и крупных артериях по характеру ближе к течению на начальном участке.

2) Конусообразная форма аорты и крупных артерий способствует уменьшению объема пограничного слоя.

3) Срыв систолического импульса в протодиастоле способствует волновому движению давления и кровотока в аорте — выброс крови в систоле обеспечивает максимальное натяжение стенки начала аорты, а волновое движение осуществляется за счет упругости стенки крупных артерий.

В инициирующей стадии быстрого выброса крови из сердца образуется артериальный пульс — колебательная волна давления, пробегающая в дистальном направлении по артериальной стенке. Скорость пульсовой волны давления — 5–10м/сек и примерно в 5–8 раз превышает скорость кровотока.

Опережая кровоток, пульсовая волна давления вблизи стенки сосуда может вызвать местное движение/возмущение элементов крови, разрушение эритоцитарных столбиков, уменьшение вязкости и облегчение кровотока (при условии, что кровь изотропна).

Вязкость крови, находящейся внутри желудочка в стационарном состоянии, может повышаться. При импульсе давления, создаваемым в фазе изометрического сокращения сердца, вязкость в области стенки может снижаться аналогично пульсовой волны давления, и при циркулярном сдавлении кровь будет одномоментно выдвигаться в область открывающихся аортальных клапанов сердца, создавая условия для образования пульсовой волны давления в аорте.

В подтверждение этому можно указать:

3а) Частота основной гармоники колебания волны давления в аорте — 1,2 сек$^{-1}$. Частота колебания и скорость сдвига измеряются в идентичных единицах — сек$^{-1}$, и они взаимопропорциональны. При скорости сдвига большей, чем 1,0 сек$^{-1}$, вязкость резко уменьшается, эритроциты в потоке прекращают круговое движение вокруг своей оси и движутся вниз по течению (при перкутанной транслюминальной коронарной ангиопластике частота реокклюзии или рестеноза составляет 50–60 % в сроки до 6 месяцев, что может быть следствием нарушения проводимости пульса в стенке сосуда).

3б) Число Уомерсли (α) показывает, как сильно отличается профиль скорости при ламинарном течении в длинной трубе от Пуазейлевского, когда жидкость подвергается воздействию синусоидального градиентного давления с угловой частотой ώ: α = d/2√ώρ/μ.

Смысл параметра Уомерсли можно представить и по другому: величина α^2 равна отношению времени, в течение которого действие вязких сил распространяется на всю ширину сечения сосуда ($d^2\rho/4\mu$), к периоду колебания (1/ώ), то есть число Уомерсли тем выше, чем быстрее в течение периода колебания синусоидальное колебание охватывает весь диаметр сосуда. Для сосудов разных диаметров оно разное: восходящая аорта — 13,5; брюшная аорта — 8; сонная артерия — 4,4; бедренная артерия — 3,5; артериолы — 0,04; капилляры — 0,005. То есть, в крупных артериях, опережая кровоток, синусоидальная пульсовая вольна давления быстрее охватывает весь сосуд, чем в артериолах и капиллярах, тем самым способствуя уменьшению вязкости крови.

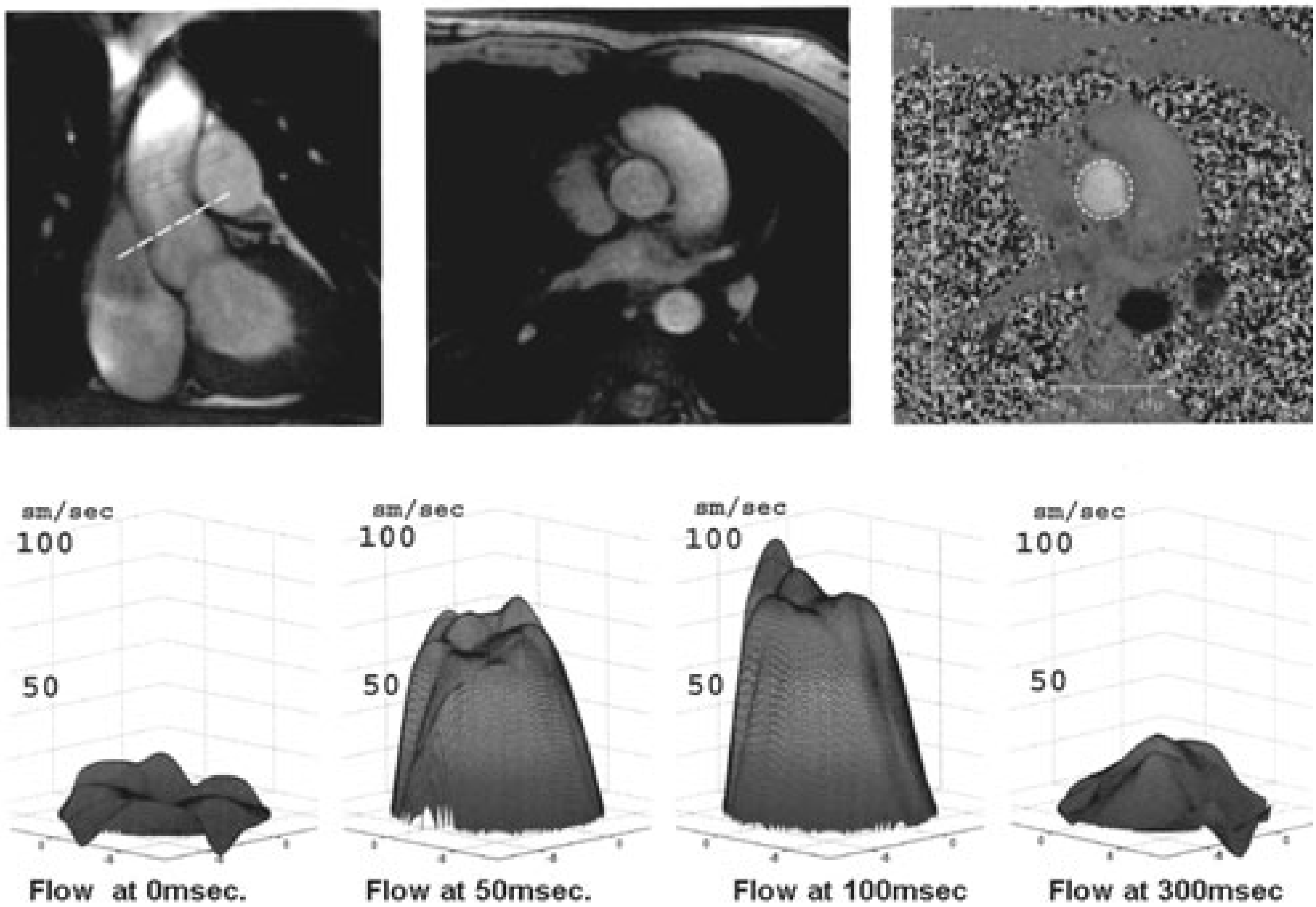

Рис. 8. Реконструктивный снимок быстрой ангиографии в восходящей части аорты — фракция сердечного выброса в начальной части восходящей аорты в виде отсеченного конуса с плоской поверхностью. Поверхность более широкая при инициации движения и постепенно получает форму отсеченного конуса. Возвышения на поверхности отсеченного конуса на наружном стенке аорты вызваны круговым движением крови в начальной части аорты.

3в) Вышеуказанные физиологические аспекты кровотока правомерны для всей области крупных артерий, кроме той, где пульсовое давление не опережает кровоток. Такими являются: проксимальная часть области входа/начального участка а) в систоле — свободные края аортальных клапанов (где фаза колебания артериального пульсового давления и кровотока в инициирующей стадии систолы совпадают); б) в протодиастоле — перешейка аорты и области разветвления артерий. Морфологически подтверждено, что начальные склеротические изменения у годовалого ребенка отмечаются как раз в области сердечных клапанов, наружной стенки перешейки аорты и противоположной стороне водораздела крупных артерий.

В отличие от других артерий, в левой коронарной артерии нет систолической фазы, кровоток начинается в протодиастоле, и нет условий для образования артериального пульса давления, опережающего кровоток.

3г) Скорость крови в аорте в течение сердечного цикла никогда не бывает нулевой, кроме вышеуказанных критических областей. Скорость кровотока в инициирующей стадии систолы и в конце диастолы различаются. При этом скорости в разных частях аорты в инициальной стадии систолы образуются синхронно и одинаковы по величине, что может быть обусловлено наличием пульсовой волны давления в начале систолы (**рис. 2**, **3**).

Наличие плоской поверхности движущейся крови можно наблюдать при быстром исследовании кровотока (МРА). Выброшенный в систоле кровоток в виде «компрессионного цилиндрического поршня» с плоской поверхностью продвигается вперед (**рис. 8**).

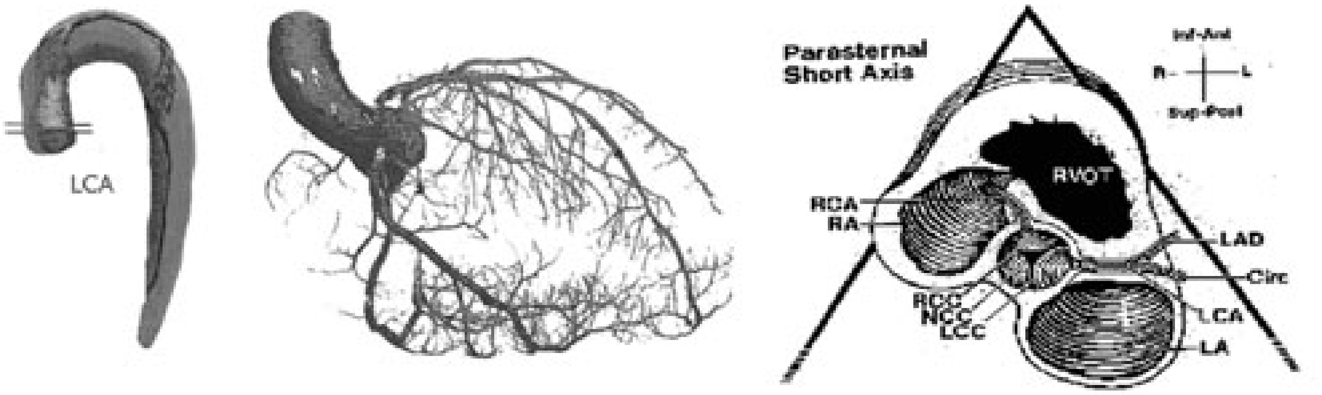

Рис. 9. Ретроградное заполнение левой коронарной артерии в протодиастоле и ее анатомические коррелянты.

Для адекватной работы сердца закрытие клапанов сердца должно происходить быстрее (0,07 сек), чем продолжительность систолы (0,2 сек — без протодиастолы). Этому способствует высокое градиентное давление и местное ускорение кровотока в протодиастоле, которое в области наружной стенки дуги аорты в 6 раз превышает систолическое, а градиентное давление в начале движения более чем в 6 раз будет превышать систолическое [11, 12].

Лизиса форменных элементов крови не происходит, поскольку пороговая величина напряжения сдвига для поражения их мембран составляет 200–300 Н/м^2.

Холестерин в клеточной мембране — естественный элемент эукариотных живых существ. Повышение уровня липопротеинов низкой плотности и образование атеросклеротической бляшки может быть адаптационным механизмом, и обусловлено необходимостью повышения стабильности поверхностной мембраны эндотелиальной клетки при вышеуказанных механизмах кровотока, так как:

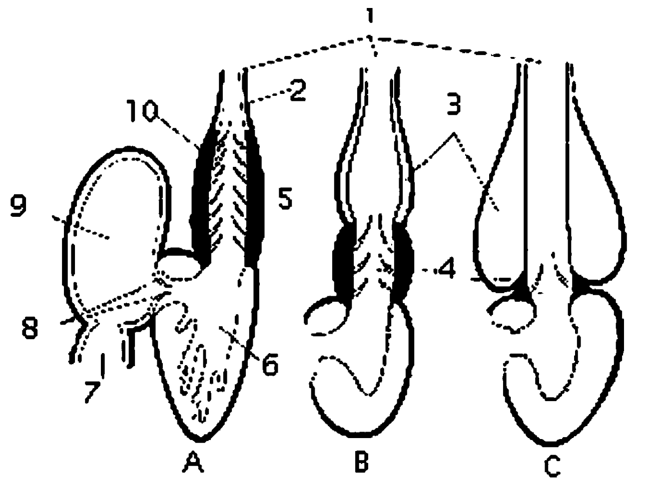

Рис.11. Эволюция аортальных клапанов и сердца у рыб. **1** — Aorta ventralis; **2** — Truncus arteriosus; **3** — Bulbus arteriosus; **4**, **10** — Conus arteriosus; **5** — Ventral part; **6** — Ventricle; **7** — Sinus venosus; **8** — Valv. atrio-ventic; **9** — Atrium.

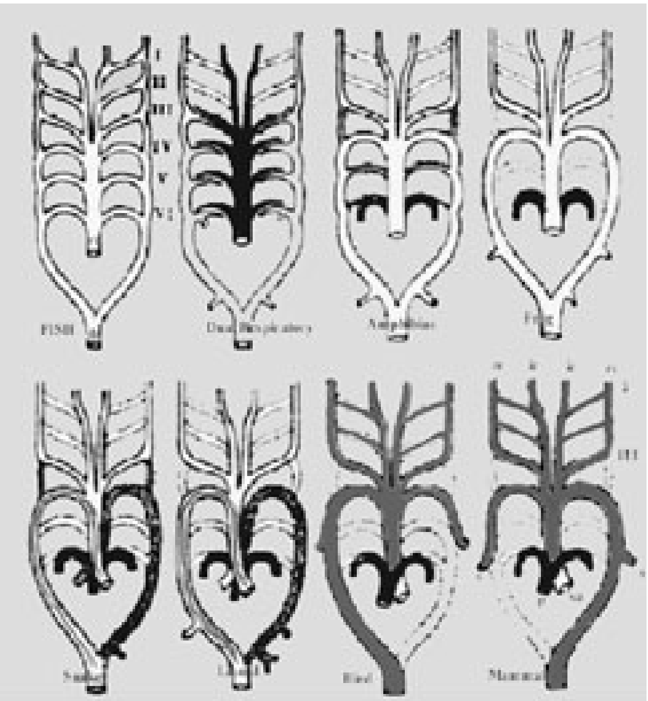

Рис.10. Эволюция дуги аорты у хордовых (в верхнем ряду слева направо — рыбы и амфибии; в нижнем ряду — пресмыкающиеся, птицы и млекопитающие): ec — arteria carotis externa, ic — arteria carotis interna, s — arteria subclavia, va — ventral aorta, da — dorsal aorta.

1. При атеросклеротическом поражении сосуда в процесс вовлечены все слои стенки.

Согласно закону Лапласа ($F = Pr/2$) натяжение стенки F (поверхностное натяжение) цилиндрического сосуда прямо пропорционально давлению внутри сосуда P и радиусу цилиндра r. При нулевой скорости кинетическая энергия кровотока переходит в потенциальную энергию сосуда — сосуд расширяется и повышается площадь/поверхностная энергия эндотелиальной мембраны и связанной с ней веществ. Площадь также повышается сдвиговым напряжением при инициации кровотока: стенка сосуда расширяется в продольном и поперечном направлениях.

Согласно второму закону термодинамики, все самопроизвольные процессы протекают с уменьшением свободной энергии. Вещество принимает форму, соответствующую минимальной поверхностной энергии. Поверхностная энергия из-за внутреннего давления вещества (сила межмолекулярного притяжения) всегда стремится к уменьшению, и в области задержки кровотока на внутренней поверхности стенки сосуда формируется участок фиброза/склероза/стеноза, уменьшающий поверхностную энергию и радиус просвета. Переход одной энергии в другую не бывает полным, и атеросклеротическую бляшку можно представить как энтропию переходного процесса.

Пропорциональное уменьшение радиуса сосуда (в том числе и при повышенном градиентном давлении) способствует уменьшению натяжения и стабильности стенки сосуда. При несостоятельности процесса (обызвествление стенки, суживающее просвет сосуда) образуется аневризматическое расширение/разрыв стенки сосуда/расслаивающая аневризма/тромбоз сосуда.

2. В процессе атеросклеротического воспаления фиброз и кальциноз, помимо усиления стенки, меняют характер пристеночного потока и величину сдвигового напряжения на нем: при уменьшении просвета сосуда и повышении скорости кровотока объем противоположно направленных потоков снижается. Ишемическому поражению органов в основном способствует тромбоэмболическое поражение сосуда, а не стеноз, который образуется постепенно, способствуя коллатеральному кровообращению. При стентировании артерий часто бывает повторный тромбоз.

В эволюционном ряду позвоночных образование спиралеобразной дуги аорты с вертикально крутящимся кровотоком может быть обусловлено следующими факторами:

1. При круговом движении в дуге аорты ретроградный кровоток способствует рассечению кровотока, быстрому закрытию аортальных клапанов и заполнению левой коронарной артерии (у млекопитающих), в которой нет систолического кровотока (**рис. 9**).

В подтверждение тому, что круговое движение крови является определяющим фактором для заполнения коронарных артерий, можно указать на наличие левосторонней дуги аорты у птиц (у млекопитающих дуга аорты правосторонняя) (**рис. 10**). Это может быть обусловлено тем, что кровоток в правой коронарной артерии у птиц требует дополнительных затрат энергии: в полете у птицы дыхательные мышцы груди напряжены, и заполнение кровью легких требует интенсивной работы правого желудочка (синхронизация сокращений дыхательных мышц и сердца, как и у рыб, не представляется возможной).

У рыб, не имеющих аортальных дуг (при наличии одного желудочка, от которого отходит брюшная аорта, а дуга аорты образуется от жаберных дуг, исходящих от брюшной аорты), на ранней стадии эволюции имеются несколько рядов аортальных клапанов, которые с развитием артериального мышечного конуса (способствует ретроградному заполнению клапанов) регрессируют, и остается только один ряд аортальных клапанов (**рис. 11**).

2. При круговом движении крови силы давления на наружной стенке выше (скорость ниже — закон Бернулли), чем на внутренней (дуга аорты, кавернозный сифон, подключичная артерия) (**рис. 12**). Крупные сосуды дуги отходят от наружной стенки и васкуляризируют те органы, которые могут подниматься выше горизонтально расположенной грудной аорты у птиц, млекопитающих (односторонняя аорта, и экспериментальный атеросклероз образуется только у них), и тем самым нуждаются в наличии дополнительной силы давления.

В подтверждение этому можно указать также на изобилие барорецепторов в дуге аорты и каротидного сифона. Пульсирующее сердце способствует нормальной артериальной, капиллярной, венозной гемодинамике, но продолжительность его работы детерминирована изначально.

Учитывая вышеизложенные предположения, работа требует дальнейших подтверждений, что будет

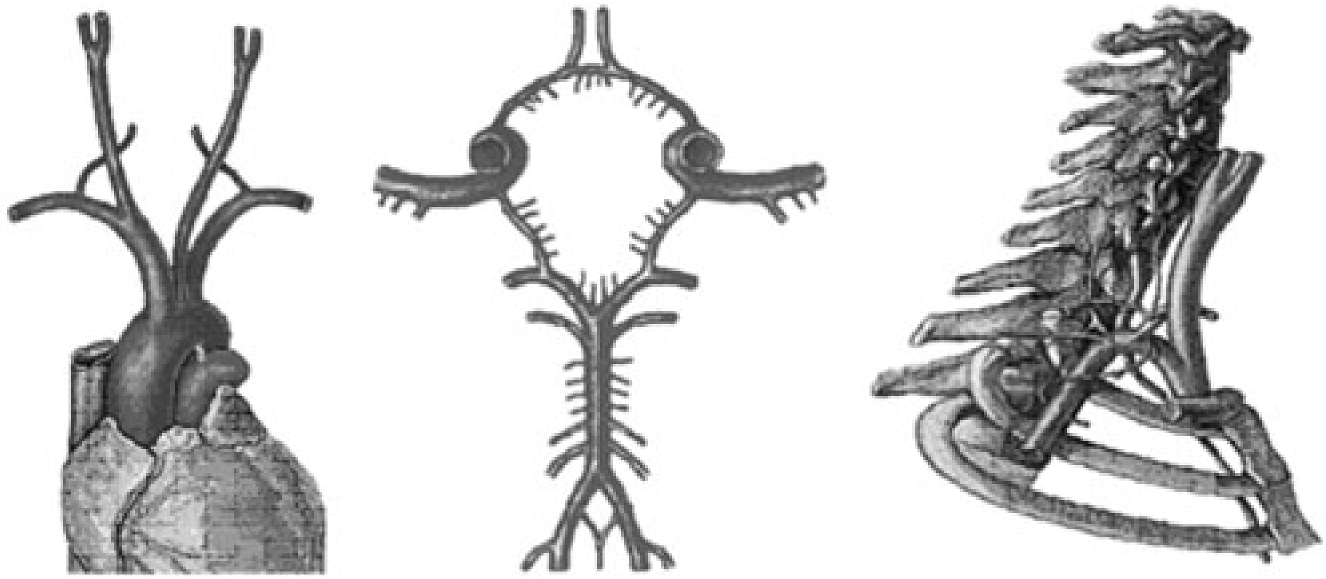

Рис. 12. Некоторые области кругового кровотока в артериальной системе у людей и животных.

способствовать патогенетическому подходу к лечению атеросклероза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пульсирующий кровоток — метод полноценного продвижения крови по артериальной системе. Круговой кровоток в дуге аорты способствует транспорту крови по сосудам во всех направлениях, но при переходных процессах гемодинамики (протодиастола) поражает стенку сосуда. Аналогичные изменения кровотока могут обнаруживаться в области разветвлений крупных артерий.

Состояние эндотелия у млекопитающих находится на грани выносливости, и силы давления кровотока со временем (в постнатальном периоде ≈0,3 мсек импульсы с запредельным напряжением сдвига более чем 30×10^6 раз в год) способствуют образованию склеротических изменений стенок крупных артерий.

Склеротические изменения со стенозом артерий — адаптационный механизм к сдвиговому давлению кровотока, который предохраняет сосуд от дальнейших функциональных/структурных нарушений.

Наличие более коротких импульсных последовательностей на МР томографе будут способствовать уточнению вопроса о разработке новых направлений лечения атеросклероза, в том числе при помощи методов, способствующих изменению фазы колебания противонаправленных сил давления в крупных артериях (стенты специальной конструкции) и/или с использованием веществ, понижающих поверхностное натяжение эндотелиальной мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Тимов В.Н. Общность атеросклероза и воспаления: Специфичность атеросклероза как воспалительного процесса//Российский кардиологический журнал. — 1999. — №5.*
2. *Ross R The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s//Nature. — 1993. — Vol. 362. — P. 801-809.*
3. *Nerem R.M. Hemodynamics and the vascular endothelium//ASME J Biomech. Eng. — 1993. — Vol. 115. — P. 510-514.*
4. *Zarins C.K., Giddens D.P., Bharadvaj B.K. et al. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localizationwith flow velocity profiles and wall shear stress//Circ. Res. — 1983. — Vol. 53. — P. 502-514.*
5. *Ku D.N., Giddens D.P., Zarins C.K., Glagov S Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low and oscillating shear stress//Arteriosclerosis. — 1985. — Vol. 5. — P. 293-302.*
6. *Zarins C.K., Zatina M.A., Giddens D.P. et al. Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis//J Vasc. Surg. — 1987. — Vol. 5. — P. 413-420.*
7. *Langille B.L. Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle and matrix//J Cardiovasc. Pharmacol. — 1993. — Vol. 21. — P S11-S17.*
8. *Fung Y.C. Biomechanics, Circulation./Second Edition:*

Springer-Verlag, New York, 1997.

9. *Каро К., Педи Т., Шротер Р., Сид У. Механика кровообращения/Пер. с англ. Е.В. Лукошковой и Ф.Н. Рогозы. — М.: Мир, 1981.*
10. *Балезин С.А., Ерофеев Б.В., Подобаев Н.И. Основы физической и коллоидной химии. — М.: Просвещение, 1975. — 398 с.*
11. *Beraia M.V., Todua F.I. Blood flow to aorta and its relationship with aortic branches//Europian Radiology. — 2002. — Vol. 12, № 11. — P. 117-118.*
12. *Тодуа Ф., Берая М. Физиология гемодинамики в дуге аорты и инициирующие факторы атеросклероза//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2005. — № 12. — P. 614-617.*

Конечный этап свертывания крови в норме и патологии

В.Г. Стуров, А.В. Чупрова, А.Р. Антонов, С.Я. Анмут

Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск

Final stage of blood coagulation in physiology and pathology

V.G. Sturov, A.V. Chuprova, A.R. Antonov, S.Ya. Anmut

State Medical University, Novosibirsk

We present a review of physiology and pathophysiology of blood coagulation final stage. We characterized in detail stages and mechanisms of regulation fibrin- and thrombin generation processes. Genetic structures of fibrinogen molecule with characteristic of functional sites providing interaction of procoagulant with various cellular components were concreted. The role and value of factor I was proved in maintenance coagulation and nonhemostatic function that develops representations about global role of fibrinogen in current homeostasis processes.

Key words: *coagulation final stage — fibrinogen — homeostasis — fibrin- and thrombin generation*

Свертывание крови — многоступенчатый, поликомпонентный процесс, в котором принимают участие сериновые протеазы, а также неферментные белки — акцелераторы, обеспечивающие взаимодействие факторов свертывания на матрице фосфолипидных мембран [1, 2]. Еще в 1686 году *M. Malpighi* описал структурную основу кровяного сгустка (тромба) как белое фибриллярное вещество, которое можно увидеть после промывки красно-кровяного сгустка водой, а в 1797 году *Chaptal* обозначил его как «фибрин». В XVII–XVIII веках предполагалось, что коагуляция крови происходит в результате агрегации тромбоцитов, однако *W. Hewson* в 1770 году, а затем *J. Muller* в 1832 году показали, что свертывание крови происходит и в условиях тромбоцитопении.

Завершающий, конечный этап свертывания крови характеризуется, как известно, трансформацией растворенного в плазме фибриногена в волокна фибрина, которые образуют основной каркас кровяного сгустка [3]. Фибриноген, как основной участник этих превращений, представляет собой глобулярный гликопротеид с молекулярной массой около 340000 Д, состоящий из 2946 последовательных аминокислот. Это димер, включающий фибринопептиды А и В, в каждой субъединице которого содержится три полипептидные цепи, соединенные дисульфидными мостиками (тремя пептидными цепями). В свою очередь каждая из цепей состоит из 450 аминокислотных последовательностей. При этом в условиях функциональной полноценности фибриногена огромное значение имеют начальная и конечная последовательности аминокислот в этих цепях. У нормального фибриногена они представлены аланином, аспарагином и треонином, при этом около 6% молекулярной массы фибриногена состоит из углеводной части в виде гексоз, глюкозаминов, сиаловых кислот [4, 5].

Фибриноген как один из наиболее важных белков крови известен уже с 70-х годов XIX столетия, когда *R. Wirchow* в 1847 году предположил, что существует некий растворимый предшественник в плазме, из которого и формируется кровяной сгусток. В 1859 году *Deni de Commercy* впервые предложил для этого предшественника термин «фибриноген» и ввел его в употребление. В 1872 году *A. Schmidt*

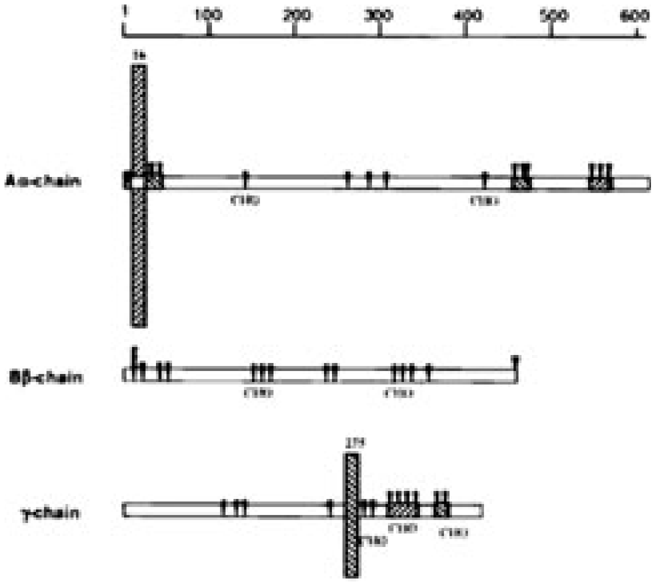

Рис. 1. Структурно-доменная организация α, β и γ-цепей молекулы фибриногена.

высказал предположение, что некий «тромбиновый» фермент непосредственным образом вовлечен в образование фибрина. Наконец, *O. Hammarster* в 1876 году выделил высокоочищенный фибриноген из плазмы крови лошади, которой свертывался лишь после добавления к ней «тромбинового» фермента — фибриногена. В 1904 году *А. Шмидт* наряду с тромбином определил центральную роль FI в коагуляционном каскаде. С 1909 года, когда фибриноген впервые был выделен в хорошо очищенном виде среди большой группы прокоагулянтов, было предложено более 20 методов и их модификаций для его очистки и количественного определения. В процессе гемокоагуляции фибриноген занимает исключительное положение, поскольку является единственным субстратом, из которого под действием протеолитических тромбиноподобных энзимов возникает волокнистая сеть фибрина — материальная основа сгустка. В 1951–1952 годах, когда *L. Lorand* совместно с *K. Laki et al* обнаружили, что активация фибриногена тромбином происходит путем отщепления от него двух фибринопептидов А и двух фибринопептидов В, этот процесс стали именовать «полимеризация фибрин-мономеров».

В настоящее время появились данные о конформации молекулы фибриногена и ее аминокислотной последовательности [6, 7, 8] (**рис. 1**). Структуру фибрина, в котором пептиды А и В отсутствуют, обозначают как «дез-ААВВ-фибрин». В молекуле имеется 29 дисульфидных связей, 3 из которых соединяют его субъединицы. В молекуле фибриногена длиной около 45 нм различают 3 домена: один центральный с молекулярной массой 60000 Д и два периферических домена с молекулярной массой в 95000 Д каждый. Обе субъединицы фибриногена имеют половину центрального домена и один периферический домен. Домены молекулы фибриногена характеризуют не только структуру белка, но и его функциональные свойства. Так, в центральном и периферических доменах имеются центры, ответственные за стыковку мономеров фибрина (МФ) и образование фибрин-полимера [8].

Фибриноген (фактор I — FI) синтезируется исключительно в гепатоцитах. Экспрессия кодирующего его гена осуществляется АКТГ — гормоном аденогипофиза. Супрессию гена вероятнее всего осуществляет гормон коры надпочечников — кортизол. В том виде, в каком фибриноген вырабатывается паренхиматозными клетками печени и поступает в кровь, называется фибриногеном А. В отличие от фибриногена В, он не осаждается из плазмы витамином К (производным β-нафтохинона). FI под влиянием тромбина превращается в фибрин в ходе протеолитического дробления его молекулы. Многочисленными исследованиями определено, что вначале тромбин отщепляет от молекулы фибриногена два пептида А, образуя дез-А-мономеры фибрина (неполноценные мономеры фибрина). Затем отщепляются два пептида В, и возникают дез-АВ-мономеры, или полные мономеры фибрина [4, 9].

Фибринопептиды А иногда появляются в циркулирующей крови, что свидетельствует либо о ранних этапах развития ДВС-синдрома, либо о латентно протекающем внутрисосудистом свертывании крови. Оставшаяся молекула фибриногена представляет собой фибрин-мономер (ФМ). Последний приобретает способность соединяться с себе подобными ФМ и образовывать фибрин-полимер, который представляет собой гель (или сгусток). Сборка ФМ проходит этапы формирования димеров, из которых при продольном и поперечном сшивании образуются полимеры фибрина — протофибриллы, а затем нити фибрина (**рис. 2**).

Тромб из такого фибрина легко растворяется плазмином и потому не может обеспечить полноценный гемостаз. Это нередко бывает причиной кровоточивости и плохого заживления ран. Подобный фибрин называется растворимым (фи-

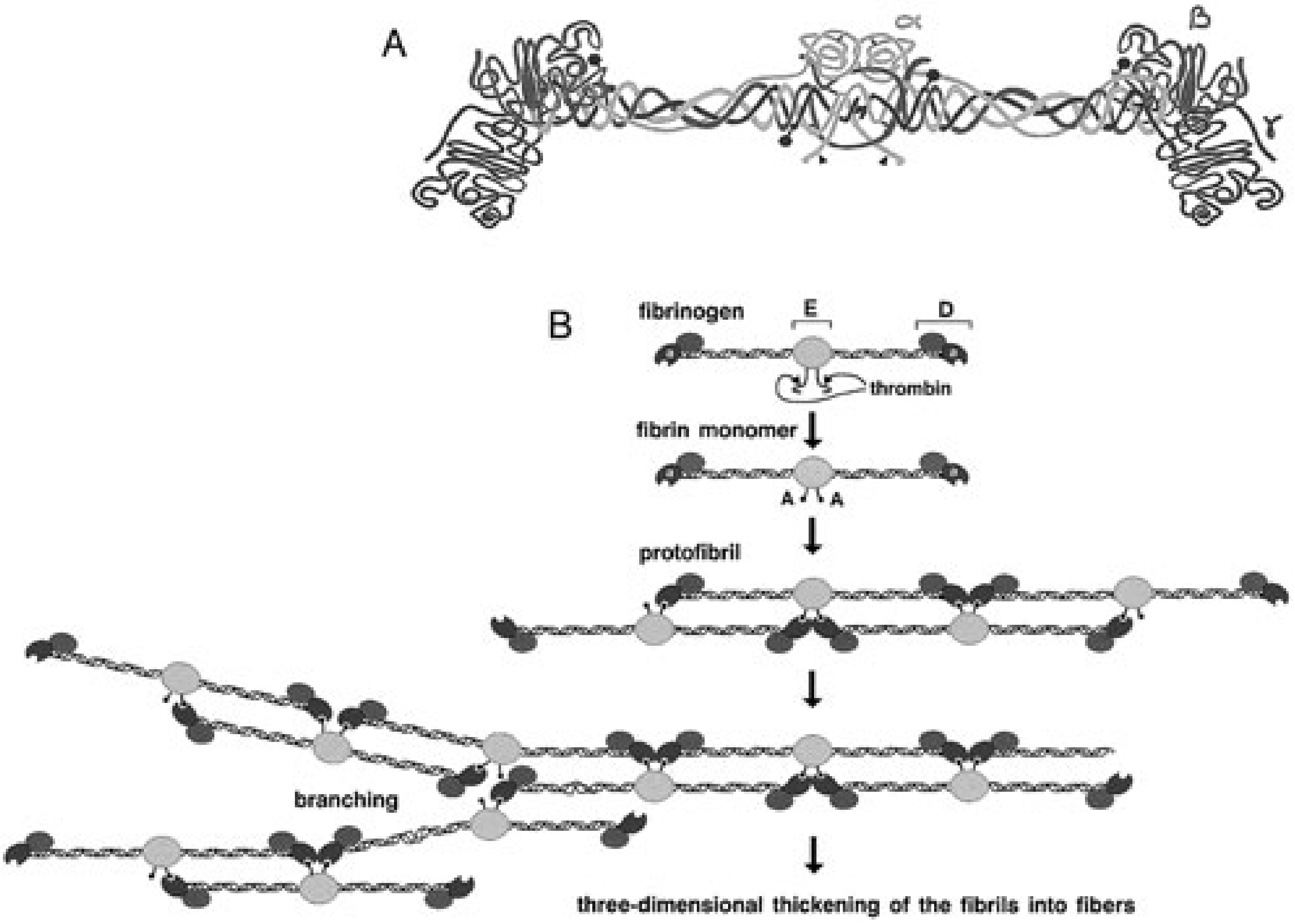

Рис. 2. Схема полимеризации молекул фибрин-мономера в фибриновые протофибриллы путем междоменного D — E-связывания (по Д.М. Зубаирову [12]).

брин S, soluble). Полноценным, то есть устойчивым к фибринолизину он может стать лишь под действием фибриназы (фактора XIIIa). Образовавшийся после этого воздействия фибрин называется нерастворимым (фибрин I, insoluble) [10]. Основные свои функции он реализуют с помощью особых, активных в функциональном отношении сайтов: 1) внутренних, с участием которых осуществляются расщепление его и фибрина под действием тромбина и плазмина соответственно и реакции полимеризации мономеров фибрина; 2) взаимодействующих с тромбоцитами, эритроцитами, моноцитами, макрофагами, фибробластами, эндотелиальными клетками и бактериями; 3) взаимодействующих с фактором XIII, плазмином, t-PA, тромбоспондином, коллагеном, альбумином и др.; 4) связывающих гепарин, ионы Ca^{2+}, Zn^{2+}, цитрат, ЭДТА [8–10]. В физиологических условиях FI обеспечивает не только формирование фибрина, как материальной основы кровяного сгустка, но и заживление ран, рост и метастазирование опухолей, нормальный баланс в плазме ионов Ca^{2+}, Zn^{2+}, цитрата [11, 12, 13].

Кроме широко известных функций фибриногена в процессах коагуляционного каскада и остановки кровотечений, немаловажное значение имеет способность FI усиливать тромбоцитарный потенциал в частности и в целом активировать клеточную популяцию, содержащую тканевой фактор (ТФ-клетки) [14]. Среди последних наиболее коагулологически важными являются тромбоциты, макрофаги и фибробласты.

Конечный этап свертывания крови принято подразделять на три этапа [12–14].

Этап 1 (ферментативный). На данном этапе тромбин последовательно отщепляет от молекулы фибриногена сначала два фибринопептида А, затем два фибринопептида В, в результате чего образуются полные (дез-ААВВ) мономеры фибрина с 4 свободными связями, способные кратно наращивать свою массу при взаимодействии с други-

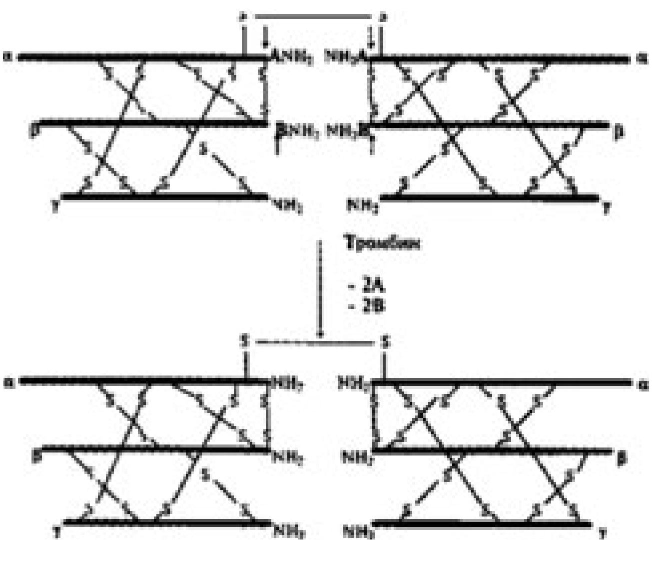

Рис. 3. Модель ковалентной структуры фибриногена (сверху) и мономера фибрина (внизу) (по Blomback B. [5]). Стрелки — места отщепления пептидов А и В

ми мономерами фибрина или с фибриногеном [5]. Отделение фибринопептидов подчиняется определенной последовательности. Вначале тромбин, разрывая связь Арг-Гли, отщепляет пептиды А, содержащие 16 аминокислотных остатков, с образованием дез-АА-фибриногена (**рис. 3**). Последний уже способен к самосборке с исходом в гель (фибриновый сгусток). Разрыв аналогичной связи (Арг-Гли) в цепях В приводит к высвобождению 2 фибринопептидов В, имеющих по 14 аминокислотных остатков, что приводит к образованию дез-ААВВ-фибриногена. Обе формы мономерного фибрина (дез-АА и дез-ААВВ) можно обозначать как полный и неполный фибрин-мономеры (**рис. 4**).

Этап 2 (неферментативный). Мономеры фибрина вначале образуют остающиеся в растворенном состоянии комплексы (олигомеры фибрина), состоящие из 2–10 и более мономеров фибрина и обозначаемые как низко-, средне- и высокомолекулярные растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК). Методами электронной микроскопии, светорассеивания и другими показано, что самосборка фибрин-мономеров в чистой системе и в плазме крови состоит из 2 фаз [15, 16]. В первой формируются промежуточные олигомеры — нити толщиной в 2 молекулы, получившие название протофибрилл, в результате чего образуются волокна фибрина с упорядоченной структурой и характерной поперечной исчерченностью [17]. Этот фибрин растворим в 5–7 М мочевине или 2% уксусной кислоте — растворимый фибрин S (solubile) (**рис. 4**).

Этап 3 (стабилизация фибрина). Под влиянием фактора XIII и плазменной трансглутаминазы, которые также активируются тромбином в присутствии ионов кальция, в фибрине происходит образование дополнительных дисульфидных связей как между α-, так и между β-цепями, что делает его более эластичным и нерастворимым в мочевине — фибрин I (insolubile) [18]. Такой стабилизированный фибрин менее подвержен лизису плазмином/плазминогеном. Имеются указания и на то, что сшивка фибрина под влиянием фактора XIIIa происхо-

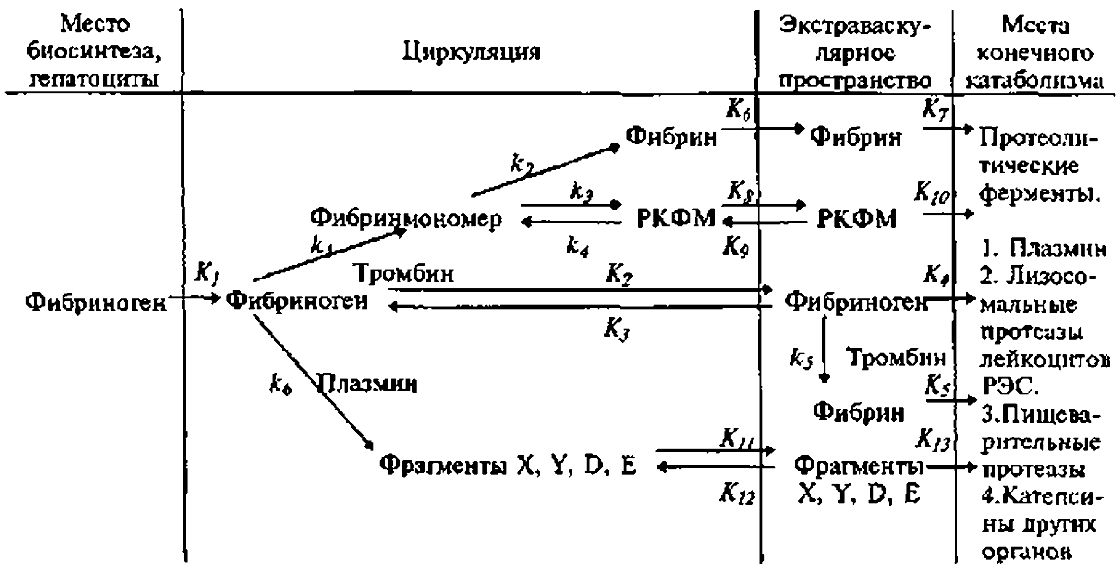

Рис. 4. Принципиальная схема превращения фибриногена в фибрин (по Д.М. Зубаирову [12]).
K — константы скоростей потоков; *k* — константы химических превращений.

дит не только при образовании волокон фибрина, но и в промежуточных растворимых его олигомерах. Все эти данные получили отражение в современных схемах свертывания крови [2–4, 10].

Параллельно с активацией свертывающей системы крови образуются комплексы между МФ и продуктами деградации фибриногена/фибрина (ПДФ) плазмином, МФ и фибриногеном. Повышение их уровня имеет важное значение для диагностики тромбинемии и внутрисосудистого свертывания крови [13]. Эти комплексы плохо коагулируют, так как ограничивают как чувствительность фибриногена к тромбину, так и процесс полимеризации (самосборки) фибрин-мономеров, в силу чего накапливаются комплексные соединения с фибриногеном и ранними продуктами его расщепления в крови [9, 11, 18]. Некоторые авторы их называют «заблокированными» комплексами фибрин-мономеров [13, 19]. Наиболее полное выявление этих комплексов дает коагуляционная проба с ядом среднеазиатской змеи эфы многочешуйчатой [20].

Замедление самосборки фибрин-мономеров может быть связано как с наследственной дисфибриногенемией [21], нередко возникающей на фоне признаков дисплазии соединительной ткани, так и приобретенной, например, при патологии печени [22].

Значение FI, как кофактора процесса тромбоцитарной агрегации, было доказано более 20 лет назад на основании следующих наблюдений. У больных с дисфибриногенемией агрегация кровяных пластинок отсутствует под воздействием таких доз АДФ и эпинефрина, которые легко индуцируют ее в плазме здоровых людей. Отмытые тромбоциты, суспензированные в буфере или дефибринированной плазме, также не агрегируют с этими индукторами, однако добавление фибриногена к перемешиваемой суспензии и агониста агрегации вызывает каскад агрегационных реакций [8,23]. Получены также прямые доказательства специфической и насыщаемой связи радиоактивно меченного нативного фибриногена (1^{25I}-Fgn) с ADP-стимулированными тромбоцитами. При оптимальных условиях максимальное число мест связывания фибриногена достигает 20000–50000 в одном тромбоците [4]. Причиной того, что из всех адгезивных белков именно фибриноген служит главным кофактором агрегации, является его большая концентрация в плазме по сравнению с другими адгезивными белками, высокая аффинность к рецепторам тромбоцитарной мембраны (в частности, рецепторов GP Ib-IIa), а также особенности структурной организации.

Симметричное строение димерной молекулы фибриногена позволяет ей вступать в двухсторонние связи с мембранными рецепторами прилежащих тромбоцитов и образовывать связывающие их мостики [15]. Описывая способы возможного соединения двух прилежащих тромбоцитов через молекулу фибриногена, можно представить несколько гипотетических вариантов:

1. симметричная модель связи — благодаря димерной структуре фибриногена аналогичные места в каждой половине его молекулы взаимодействуют с идентичными рецепторными местами в прилежащих тромбоцитах;
2. фибриноподобная связь — наличие ассоциаций между соседними фибриногеновыми мостами;
3. модель асимметричного связывания — фибриноген содержит несколько неидентичных участков связывания, а на GP IIb-IIIa находятся несколько различных рецепторных мест; молекула фибриногена, соединенная одним концом с рецепторными местами в GP IIb-IIIa, вторым может ассоциироваться с тромбоспондином (TSP), также фиксированным после секреции на плазмолемме;
4. укрепление симметричной связи тромбоспондином — процесс, наблюдающийся при вторичной агрегации, обусловленной тем, что в формирование соединений, помимо фибриногена, может вовлекаться и тромбоспондин, укрепляющий симметричную связь или выполняющий функцию его акцептора. После осуществления секреторной реакции в присутствии ионов Ca^{2+} с плазматической мембраной тромбоцитов может связываться высвобожденный из α-гранул TSP;
5. межтромбоцитарный контакт, опосредованный через фактор XIIIa;
6. соединение комплексов GP IIb-IIIa — при образовании рецепторно-фибриногенового комплекса могут существенно изменяться мембранные гликопротеины GP IIb-IIIa, в результате чего они приобретают способность взаимодействовать друг с другом непосредственно.

Наряду с этим, фибриногеновая молекула играет немаловажную роль в процессе агрегации адгезивных белков, содержащихся в α-гранулах тромбоцитов. Плазменный фибриноген является основным, но далеко не единственным кофактором тромбоцитарной активации, поскольку тромбоцитарный фибриноген и другие адгезивные белки α-гранул могут принимать участие в данном процессе. Однако последнее происходит после их высвобождения в окружающую среду, то есть в период развития вторичной агрегации. Тромбоциты содержат приблизительно 50–150 мг фибриногена на 5×10^8 клеток (примерная концентрация тромбоцитов в 1 мл плазмы). После секреции за счет высвободившегося фибриногена концентрация его в супернатанте достигает 15–70 нМ. Эта концентрация достаточна, чтобы поддерживать тромбоцитарную агрегацию в зоне, наиболее приближенной к месту повреждения [24].

Проведенные иммунохроматографические и кристаллографические исследования позволили сделать вывод об отличии тромбоцитарного FI от плазменного белка как по размеру, так и молекулярной структуре. В дальнейшем была установлена высокая чувствительность фибриногена к экзогенным и эндогенным протеазам и особенно к Са-зависимому кальпаину тромбоцитов [25]. После того, как были использованы все способы предупреждения частичной деградации тромбоцитарного фибриногена в процессе его выделения, стало очевидным, что между рецепторами плазматической мембраны и плазменным фибриногеном нет отличий в отношении размера, аффинности к фибриногеновым рецепторам плазматической мембраны, способности поддерживать агрегацию кровяных пластинок и коагулировать. Далее было установлено, что очищенный тромбоцитарный фибриноген состоит из Aα, Bβ и γ_A-цепей, но не имеет γ'-цепей (минорный вариант γ-цепей), которые в человеческом плазменном фибриногене составляют долю в 12 %. Отсутствие γ'-цепей, вероятно, является следствием особенностей посттрансляционного процессинга в мегакариоцитах. Ген, ответственный за продукцию и плазменного и тромбоцитарного фибриногена, локализован в длинном плече 4 хромосомы (полосы q23 — q32) [26].

Человеческий фибриноген — один из наиболее гетерогенных белков плазмы, структурные компоненты которого могут модифицироваться и после биосинтеза, причем различными способами, и, как полагают, у каждого человека. В основном они являются результатом следующих трех причин: альтернативного процессинга во время биосинтеза, посттрансляционной модификации аминокислотных остатков и протеолитической деградации [27].

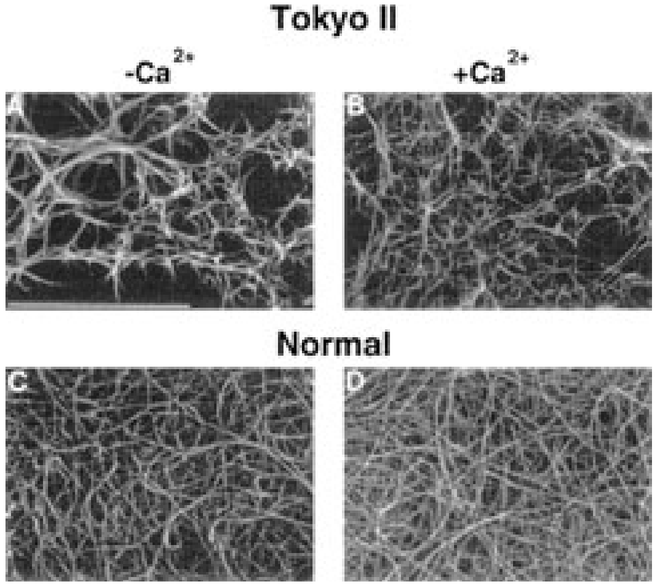

Рис. 5. Сканирующая электронная микрофотограмма нормального (**C**, **D**) и аномального фибриногена (**A** — декальцирированный, **B** — рекальцифицированный вариант) (ДФГ-Токио II).

Частично физиологические модификации затрагивают и протофибриллярную структуру FI, но, в отличие от аномальных фибриногенов (dysfibrinogens), морфологическая структура белка всегда остается неизмененной (**рис. 5**).

В настоящее время интенсивно развиваются исследования в области клеточного гемостаза. Концепция свертывания крови, опосредованная через ТФ-содержащие клетки («TF-cells hemostasis»), является на сегодняшний день общепризнанной и физиологически обоснованной. Основную роль в реализации клеточного свертывания играют тромбоциты и эндотелиальные клетки. Однако в условиях *in vivo* плазменный и клеточный гемостаз неразрывным образом связаны между собой и представляют единую систему.

Существует много убедительных данных о том, что различные заболевания у человека сопровождаются нарушением функционирования систем свертывания и фибринолиза. При этом наиболее часто в клинике имеют место нарушения именно на конечном этапе фибрино- и тромбиногенеза. Примерами могут служить ДВС-синдром, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт головного мозга, тромбоз глубоких вен, ТЭЛА, различные формы как гемофилии, так и тромбофилий и ряд других патологических состояний. Для более глубокого понимания и адекватного распознавания нарушений свертывания крови на этом этапе в отечественных и зарубежных клиниках все активнее внедряются методы молекулярно-генетической детекции процессов фибриногеногенеза, в частности, с использованием арсенала моноклональных антител к различным прокоагулянтным субстанциям [28], что определит новые перспективные направления научной и клинической гемостазиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mann K. G. Biochemistry and physiology of blood coagulation//Thromb. & Haemost. — 1999. — Vol. 82. — P. 165-174.*
2. *Папаян Л. П. Новые представления процесса свертывания крови//Трансфузиология. — 2004. — Т. 5, № 1. — С. 7-22.*
3. *Fitzgerald L. A., Phillips D. R. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice/Eds.: R. W. Colman et al. — Philadelphia, 1997. — P. 572-593.*
4. *Луговской Э. В. Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза. — Киев: Наукова думка, 2003.*
5. *Blomback B Fibrinogen structure, activation, polymerization and fibrin gel structure//Thromb Res. — 1994. — Vol. 75. — № 3. — P. 327-328.*
6. *Hanss M. M. L. et al. A database for human fibrinogen variants//Ann. N. Y Acad. Sci. — 2001. — Vol. 936. — P. 89-90.*
7. *Henschen A., Lottspeich F., Kehl M., Southan C Covalent structure of fibrinogen//Ann. N. Y Acad. Sci. — 1983. — Vol. 408. — P. 28-43.*
8. *Becker I., Bartl K., Wahlefeld A. W. A functional Photometric Assay for plasma fibrinogen//Throm. Res. — 1984. — Vol. 35, № 5. — P. 475-484.*
9. *Doolittle RF. The structure and evolution of vertebrate fibrinogen//Ann. N. Y Acad. Sci. — 1983. — Vol. 408. — P.13-27.*
10. *Lane D. A., Henschen A., Jasani M. K. Fibrinogen — Fibrin Formation and Fibrinolysis. — Berlin: Walter, 1999.*
11. *Martin D., Boys C., Ruf W. Tissue factor: Molecular recognition and cofactor function//FASEB J. — 1995. — Vol. 9. — P. 852-859.*
12. *Зубаиров Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. — Казань: Фен, 2000. — 364 с.*
13. *Батрак Т. А. Участие нарушений полимеризации мономеров фибрина в генезе различных видов кровоточивости: Автореф. дисс… канд. мед. наук. — Барнаул, 1999.*
14. *Mosesson M. W. Fibrinogen and fibrin polymerization: Appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly//Blood Coagulation & Fibrinolisis. — 1997. — P. 257-267.*
15. *Doolittle R. E. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion//Adv. Protein. Chem./Eds. Anfinsen C. B., Edsall J. T., Richards F. M. — N. Y. London: Acad. Press, 1983. — Vol. 27. — P. 1-19.*
16. *Soderquist Th., Blomback B Fibrinogen structure and evolution//Naturwissenschaften. — 1991. — Vol. 1, № 58. — P. 16-23.*
17. *Matsuda M Structure and function of fibrinogen inferred from hereditary dysfibrinogens//Int. J. Haematol. — 2000. — Vol. 72, № 4. — P. 436-447.*
18. *Chung D. W., Harris J. E., Davie E. W.//In: Fibrinogen, thrombosis, coagulation, and fibrinolysis/Eds. Liu C. Y., Chien S. — New York: Plenum Press, 1990. — P. 39-48.*
19. *Siebenlist K. R., Mosesson M. W. Factors affecting g-chain multimer formation in crosslinked fibrin//Biochemistry. — 1992. — № 31. — P. 936-941.*
20. *Цывкина Л. П. Клинико-диагностическое значение герпетоксинов в распознавании основных видов патологии системы гемостаза: Автореф. дисс…док. мед. наук. — Барнаул, 1997.*
21. *McDonagh J Dysfibrinogenemia and other disorders of fibrinogen structure and function//In: Colman R. W., George J. N. et al.: Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice, 4th ed., Philadelphia, PA: Lappincott, Williams & Wilkins, 2001. — P. 855-852.*
22. *Kun-hwa H Thrombin interaction with fibrin polymerization sites//Thromb. Res. — 1997. — Vol. 4, № 86. — P. 301-315.*
23. *Neerman-Arbez M The molecular basis of inherited afibrinogenemia//Thromb & Haemost. — 2001. — Vol. 86. — P. 154-163.*
24. *Bennett J. S. Platelet — fibrinogen interaction//Ibid. — 2002. — Vol. 98, № 24. — P. 65-68.*
25. *Martin D., Boys C., Ruf W Tissue factor: Molecular recognition and cofactor function//FASEB J. — 1995. — Vol. 9. — P. 852-859.*
26. *Kant J. A., Fornace A. J. Jr., Saxe D. et al. Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82, № 8. — P. 2344-2348.*
27. *Herrick S., Blanc-Brude O., Gray A. et al. Molecules in focus: Fibrinogen//Int. J. Biochem. and Cell Biology (IJBCB). — 1999. — Vol. 31. — P. 741-746.*
28. *Lugovskoi E. V., Kolesnikova I. N., Gritsenko P. G. et al. A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrinogen and fibrin//Thromb. Res. — 2002. — Vol. 107, № 3-4. — P. 151-156.*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нарушение обмена гомоцистеина у больных сахарным диабетом 2 типа

З. С. Баркаган [1], Т. А. Рудницкая [2], М. А. Колпаков [3]
Алтайский филиал Гематологического Научного Центра РАМН [1], Барнаул; Фонд «Медсанчасть-168» [2], НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН [3], Новосибирск

Homocysteine metabolic disorder in patients with diabetes mellitus type 2

Z. S. Barkagan[1], T. A. Rudnitskya[2], M. A. Kolpakov[3]
Altay Branch of HRC RAMS[1], Barnaul; Fund «Medico-sanitary department-168»[2], Research Center of clinical and experimrntal limfology SO Rams[3], Novosibirsk

Increased homocysteine serum level (over 11,0 mkmol/l) was found in 74% patients with diabetes mellitus type 2. Mean homocysteine level in diabetes patients was 15,9 ± 8,2 mkmol/l, in controls — 8,8 ± 1,9 mkmol/l (p <0,001). No association was found between hyperhomocysteinemia and patient's age, sex, body mass index, remoteness of disease and type of diabetic therapy. No association was found between homocysteine serum concentration and haemostatic, carbohydrate and lipid metabolic parameters, as well as level of microalbuminuria. Tissue perfusion in diabetes patients with hyperhomocysteinemia was found to be 21% lower than that in diabetes patients without hyperhomocysteinemia. After two months of folic acid intake (5mg/day) in combination with vitamin B_{12} intake (6 mcg/day) and vitamin B_6 intake (4 mg/day) serum homocysteine level decreased from 19,0 ± 7,2 mkmol/l to 12,6 ± 5,1 mkmol/l (34% decrease). It was found out the decrease of homocysteine concentration (85%) in patients with initial hyperhomocysteinemia and normalization of homocysteine amount in 38% of patients. Along with this, the improvement in blood flow in the region of microcirculation and decreasing of clinical manifestations of microangiopathia were observed.

Key words: *homocysteine — hyperhomocysteinemia — diabetes mellitus.*

ВВЕДЕНИЕ

В современной литературе подробно описан патогенез диабетической ангиопатии, причем все большее внимание привлекает изучение новых факторов риска развития и прогрессирования ангиопатий при этой патологии. Одним из важных факторов повреждения эндотелия является, как известно, гомоцистеин (ГЦ) — аминокислота, которая содержит сульфгидрильную группу, не входит в состав белков и не поступает в организм человека с пищей, а является продуктом метаболизма метионина. В большинстве тканей ГЦ получает метильную группу при участии метаболитов фолиевой кислоты и B_{12}-зависимого фермента — метилентетрагидрофолатредуктазы. В ходе сульфурирования ГЦ конвертируется до цистатионина (который в дальнейшем используется для синтеза цистеина) при участии витамин B_6-зависимого фермента цистатионин-β-синтазы [1, 2, 3].

Распространенность гипергомоцистеинемии (ГГЦ) в общей популяции составляет около 5%, а среди больных с симптомами атеросклеротического поражения сосудов — 13–47% [4]. Распространенность ГГЦ (>14 мкмоль/л) среди больных сахарным диабетом (СД) 2 типа составляет от 25,8% [5] до 31% [6]. Во многих экспериментальных и клинических исследованиях показано прямое и опосредованное повреждающее действие избытка ГЦ на сосудистый эндотелий [7, 8] и систему свертывания крови [9, 10, 11]. Коррекция ГГЦ проводится систематическим ограничением потребления метионина с пищей и приемом комплекса фолиевой кислоты, витаминов B_{12} и B_6 [4, 9, 12]. Однако окончательных и однозначных данных о роли избытка ГЦ в повреждении эндотелия сосудов при СД 2 типа пока не получено, хотя в большинстве работ такая связь отмечается [1, 12, 13].

В настоящее время в практическом здравоохранении этот фактор риска прогрессирования ангиопатии недостаточно учитывается, в том числе при диагностике предтромботического состояния, а также при разработке тактики профилактики и лечения тромбозов у больных СД 2 типа. В настоящей работе предпринята попытка восполнить этот пробел.

Целью исследования явилось определение частоты и оценка значимости ГГЦ в патогенезе сосудистых осложнений у больных СД 2 типа, а также апробирование коррекции этого метаболического нарушения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 84 пациента с СД 2 типа — все жители города Новосибирска: 47 (56%) женщин и 37 (44%) мужчин в возрасте от 37 до 75 (в среднем — 60,5) лет. Давность заболевания с момента его выявления составляла от 1 до 31 года. Диабет легкой степени имелся у 16 (19%) пациентов, средней тяжести — у 48 (57%), тяжелой — у 20 (24%) пациентов.

В исследование не включали пациентов с хронической почечной недостаточностью, кетоацидозом, гнойно-некротическими осложнениями, больных с острым коронарным синдромом, в раннем периоде мозгового инсульта, с повышенными в 1,5 и более раз значениями функциональных проб печени, а также лиц, получавших ранее препараты, влияющие на обмен ГЦ (фолиевую кислоту, витамины B_{12} и B_6). Контрольную группу составили 23 здоровых человека (11 женщин и 12 мужчин) в возрасте от 29 до 65 лет без нарушений углеводного обмена и атеротромботических проявлений в анамнезе.

Проводили опрос по анкете, антропометрию, физикальное обследование; определяли индекс массы тела Кетле (ИМТ). Диагноз инфаркта миокарда (ИМ) и острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) устанавливали на основании комплексного клинико-инструментального обследования.

Микроциркуляцию оценивали методом лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ) с использованием лазерного анализатора кровотока ЛАКК-01 (НПП «ЛАЗМА»). Использовали датчик с гелий-неоновым лазером с длиной волны 0,63 мкм. Производили регистрацию ЛДФ-граммы утром с кожного покрова в области подошвенных поверхностей больших пальцев ног в положении больного лежа на спине и запись допплерограммы в течение минимум 3 минут.

Измеряли концентрацию ГЦ иммуноферментным методом с использованием набора реактивов «Axis-Shield AS» (Норвегия). Степень компенсации углеводного обмена оценивали по концентрации глюкозы капиллярной крови натощак глюкозооксидазным методом на аппарате «Эксан» (Россия) и концентрацию фруктозамина сыворотки крови с использованием реактивов фирмы «Sentinel CH», (Италия).

Все параметры системы гемостаза изучали в соответствии с методиками, описанными в руководстве *З. С. Баркагана и А. П. Момота* (2001). Исследовали: агрегацию тромбоцитов с универсальным индуктором агрегации (УИА) (в пробирке), содержание фибриногена в плазме по Клауссу, активированное парциальное тромбопластиновое временя (АПТВ), протромбиновое временя (ПТВ), количество растворимого фибрина с помощью ортофенантролинового теста (ОФТ). Использовали реактивы фирмы «Технология-Стандарт» (Россия, Барнаул). Измерения проводили на коагулометре «Behnk Elektronik CL-4» (Германия).

В сыворотке крови определяли концентрацию мочевины, креатинина, общего белка, общего холестерина (ОХС) и холестерина в липопротеидах высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицеридов с использованием реактивов фирмы «Biocon Diagnostik» (Германия) на спектрофотометре «Shimadzu» (Япония). Оценку микроальбуминурии проводили с использованием стрип-теста «Micral-Test®» (Канада).

Статистическая обработка результатов включала создание базы данных, автоматизированную проверку качества подготовки информации и статистический анализ. Гипотезу о нормальности выборки проверяли с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилкса. Поскольку основные изучаемые параметры (содержание ГЦ и триглицеридов, показатели гемостаза и микроциркуляции) имели распределения, отличные от нормального, применяли методы непараметрической статистики. Анализ числовых признаков проводили с определением средней арифметической (X), среднего квадратичного отклонения (σ). Анализ простых связей между двумя множествами данных проводили с расчетом коэффициента корреляции Спирмена (r). Для оценки достоверности различий (p) полученных результатов при сравнении двух независимых выборок использовали критерий серий Вальда-Вольфовица (Z), при сравнении нескольких независимых выборок — критерий ANOVA Краскела-Уоллиса (H), медианный тест (χ^2) и критерий значимости различий между двумя пропорциями, для анализа различий между связанными выборками применяли критерий Вилкоксона (Z). Использовали статистический пакет программ Statistica 5,5A.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средний уровень ГЦ в сыворотке крови лиц контрольной группы составлял 8,8 ± 1,9 мкмоль/л (здесь и ниже X ± σ) с пределами колебаний (X ± 2σ) от 5,2 мкмоль/л до 12,4 мкмоль/л. Концентрация ГЦ в сыворотке крови больных СД 2 типа составляла в среднем 15,9 ± 8,2 мкмоль/л и была существенно выше, чем в контроле (*p = 0,00015*).

Повышение уровня ГЦ в крови свыше 10–11 мкмоль/л в современной литературе Расценивается как независимый и самостоятельный фактор риска тромбоваскулярной болезни [1]. ГГЦ (концентрация ГЦ свыше 11 мкмоль/л) выявлена нами у 62 (74%) из 84 обследованных больных СД 2 типа, и лишь у 22 пациентов этот показатель был в нормальных пределах. При этом в контрольной группе ГГЦ была выявлена лишь у одного из 23 обследованных. Частота встречаемости ГГЦ среди женщин с СД 2 типа составляла 79%, среди мужчин с диабетом — 68%. Таким образом, ГГЦ является одним из наиболее частых обменных нарушений у больных СД 2 типа. По некоторым данным вероятность развития атеросклеротического поражения увеличивается, начиная со значений гомоцистеинемии, превышающих 11 мкмоль/л [14, 15]. Умеренная ГГЦ более распространена, но столь же опасна по риску развития сосудистых осложнений, как и высокий уровень этой аминокислоты [3, 16].

Не выявлено статистически значимой корреляционной связи концентрации ГЦ с возрастом пациентов (*r = +0,02, p = 0,84*), а также с давностью заболевания СД 2 типа (*r = +0,13, p = 0,25*). Не найдено статистически значимых различий в содержании ГЦ при разделении обследованных больных на группы в зависимости от пола, отягощенности семейного анамнеза по диабету и вида проводимой антидиабетической терапии (**табл. 1**). У 42% обследованных установлены случаи СД в семейном анамнезе, у 58% — нет. Компенсация углеводного обмена у 19% пациентов достигалась назначением диеты: 57% получали перорально сахароснижающие препараты, остальным 24% вводился инсулин в индивидуально подобранных дозах.

Мы не обнаружили достоверной корреляционной связи как между концентрациями ГЦ сыворотки крови и глюкозы капиллярной крови натощак (*r = +0,19, p = 0,08*), так и между уровнями ГЦ и фруктозамина сыворотки (*r = –0,14, p = 0,19*). Полученные данные согласуются с ранее проведенными исследованиями у здоровых лиц, у которых не наблюдали корреляцию между значениями ГЦ и глюкозой плазмы [17].

Таблица 1

Критерии различий в группах больных, разделенных по полу, отягощенности семейного анамнеза по диабету 2 типа и виду сахароснижающей терапии (*n=84*)

Принцип группировки	Критерий различий	Достоверность (*p*)
Пол	Z = –0,98	0,33
Отягощенность семейного анамнеза по диабету	Z = +0,48	0,62
Вид лечения	H = +0,95	0,62

Корреляционный анализ не выявил достоверной статистической связи между уровнями ГЦ и изучаемыми показателями липидного обмена: с триглицеридами (*r = –0,17, p = 0,13*), с ОХС (*r = –0,08, p = 0,45*), с ХС ЛПВП (*r = +0,15, p = 0,19*), что согласуется с опубликованными в литературе данными: уровень ГЦ не зависел от возраста, пола, содержания холестерина, липопротеинов и триглицеридов сыворотки крови у лиц без СД [9, 18].

Корреляционный анализ не установил у обследованных больных статистически значимых связей между концентрацией ГЦ и содержанием мочевины (*r = +0,15, p = 0,19*), креатинина (*r = 0,04, p>0,69*) и общего белка сыворотки крови (*r = +0,18, p = 0,09*).

При определении у 52 больных СД 2 типа степени микроальбуминурии не было выявлено различий в содержании ГЦ в группах пациентов с различной экскрецией альбумина почками (*H = 0,50, p = 0,78;* χ^2 *= 0,87, p = 0,65*). Отмечено также отсутствие статистически значимой корреляционной связи между концентрацией ГЦ и ИМТ у обследованных больных СД 2 типа (*r = –0,15, p = 0,16*), что согласуется с данными зарубежных исследователей [18].

Из 84 у 25 (30%) пациентов в анамнезе были сердечно-сосудистые катастрофы (инфаркт миокарда, ОНМК). Средние концентрации ГЦ в группах пациентов, разделенных по наличию или отсутствию тромботических эпизодов в анамнезе, были примерно равны и при сравнительном анализе статистичес-

Таблица 2

Количество инфарктов и инсультов у больных диабетом 2 типа в зависимости от концентрации гомоцистеина в сыворотке крови

№	Уровень ГЦ (мкмоль/л)	Число больных (%)	Число тромботических эпизодов (%)
1	менее 11	22 (26%)	4 (18,2%)*
2	11–15	24 (29%)	10 (41,6%)*
3	15–30	32 (38%)	9 (28,1%)
4	30 и более	6 (7%)	2 (33,3%)

*Примечание: * — различия между группами 1 и 2 достоверны, $p = 0,042$*

Таблица 3

Значения параметра микроциркуляции в зависимости от наличия или отсутствия гипергомоцистеинемии у больных сахарным диабетом 2 типа

Показатель микроциркуляции	ГЦ менее 11 мкмоль/л	ГЦ более 11 мкмоль/л
Число больных (n)	18	32
Средняя концентрация ГЦ ($X \pm \sigma$)	$8,1 \pm 1,7$	$19,4 \pm 7,8$
Параметр микроциркуляции (перфузионные единицы) ($X \pm \sigma$)	$14,5 \pm 7,1$*	$11,4 \pm 4,4$*

*Примечание: * — $p = 0,03$; $Z = -2,2$*

ки не отличались друг от друга ($Z = 0,23$, $p = 0,82$), что подтверждает мнение, что ГГЦ является фоновым нарушением, которое предшествует сосудистым катастрофам.

В зависимости от концентрации ГЦ в сыворотке крови пациенты с диабетом 2 типа были разделены на четыре группы. Частота тромботических эпизодов у пациентов зависела от концентрации ГЦ в сыворотке крови. Так, из **таблицы 2** видно, что у пациентов с уровнем ГЦ от 11 до 15 мкмоль/л мозговые инсульты и/или инфаркты миокарда в анамнезе наблюдали чаще, чем в других группах. При этом выявлено статистически значимое различие между группами пациентов с умеренной ГГЦ и с нормальным уровнем ГЦ, что подтверждает описанное в литературе предположение о наибольшем повреждающем действии умеренной ГГЦ [3, 16].

Среди обследованных больных чаще ($p <0,05$), чем в контрольной группе, встречались пациенты с гиперфибриногенемией и гиперкоагуляцией по АПТВ, а в группе с ГГЦ более 15 мкмоль/л чаще наблюдали укорочение ПТВ. При этом укорочение АПТВ в группе пациентов с умеренной ГГЦ (от 11 до 15 мкмоль/л) наблюдали несколько чаще ($p = 0,04$), чем в группе пациентов с высокой ГГЦ (более 15 мкмоль/л).

Мы также оценивали микроциркуляцию у 50 пациентов на обеих нижних конечностях (всего 100 исследований). Из них у 18 человек концентрация ГЦ была в нормальных пределах, а у 32 была найдена ГГЦ. Установлено, что уровень микроциркуляции, характеризующий перфузию тканей в зондируемом участке конечности, у пациентов с СД 2 типа с ГГЦ был на 21% ниже, чем у больных с нормальным содержанием ГЦ в сыворотке крови (**табл. 3**). При этом выявлена отрицательная корреляционная связь между концентрацией ГЦ и параметрами микроциркуляции ($r = -0,22$, $p = 0,03$).

На следующем этапе исследования у 34 больных с СД 2 типа (основная группа) проводилось лечение витаминным препаратом «Ангиовит» (Россия), принимаемым внутрь 1 раз в день в суточной дозе по 5 мг фолиевой кислоты, 4 мг пиридоксина гидрохлорида, 6 мкг цианкобаламина. Такой курс амбулаторного лечения составил 2 месяца. Стандартная антидиабетическая и, по показаниям, гипотензивная и антиангинальная терапия оставались такими же, как и до начала приема витаминов. 20 пациентов с диабетом и ГГЦ не получали такую витаминотерапию и составили группу сравнения.

В основной группе больных средняя концентрация ГЦ составила $19,0 \pm 7,2$ мкмоль/л, в группе сравнения — $18,2 \pm 8,3$ мкмоль/л. По содержанию ГЦ в сыворотке крови обе эти группы не различались ($Z = -0,05$, $p = 0,96$). Не было установлено также различий между основной группой и группой сравнения по полу, возрасту, видам терапии и показателям липидного, углеводного обменов, гемостаза и функции почек. Оценка параметров микроциркуляции проведена в динамике у 18 больных с нормальным уровнем ГЦ и у 25 пациентов с ГГЦ. В основной группе после проведенной терапии комплексом витаминов концентрация ГЦ снизилась в среднем с $19,0 \pm 7,2$ до $12,6 \pm 5,1$ мкмоль/л ($Z = 5,01$, $p <0,0001$). При этом у 85% пациентов на фоне такого лечения отмечено достоверное снижение уровня ГЦ в сыворотке крови, у 38% — нормализация этого показателя, и лишь у 15% пациентов после двухмесячного курса терапии ГГЦ сохранялась. В основной группе также отмечено статистически значимое снижение концентрации фруктозамина с 393 ± 138

ммоль/л до 343 ± 109 ммоль/л (*Z = 2,86, p = 0,004*), тогда как в группе сравнения этот показатель не изменился (*Z = 0,32, p = 0,7*). Перфузионный кровоток в тканях после проведенной коррекции ГГЦ улучшился на 14%. В группе, получавшей витаминотерапию, 50% пациентов отметили уменьшение болей в ногах в покое и при нагрузках, а 7 из 10 пациентов с коронарной болезнью сердца отметили снижение частоты приступов стенокардии.

Таким образом, применение фолиевой кислоты и витаминов B_{12} и B_6 для коррекции ГГЦ позволяет не только снизить уровень ГЦ в сыворотке крови у большинства больных СД 2 типа, но и улучшить показатели микроциркуляции крови, ослабить проявления ангиопатии.

ВЫВОДЫ

1. Гипергомоцистеинемия — частое нарушение аминокислотного обмена, выявляемое у больных сахарным диабетом 2 типа. Частота и выраженность гипергомоцистеинемии у больных сахарным диабетом 2 типа не зависит от пола и возраста пациентов, давности заболевания, массы тела, показателей гемостаза, углеводного и липидного обменов, а также вида проводимой терапии основного заболевания.
2. Гиперкоагуляция по АПТВ в группе пациентов с умеренной гипергомоцистеинемией встречается в 2,3 раза чаще, чем при более высоком содержании гомоцистеина в сыворотке крови.
3. У больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с гипергомоцистеинемией показатель перфузии тканей по параметру микроциркуляции снижен в среднем на 21% по сравнению с больными без гипергомоцистеинемии.
4. Курс терапии, включающий прием внутрь фолиевой кислоты, витаминов B_{12} и B_6, позволил снизить концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови у больных диабетом в среднем на 34%. Снижение уровня гомоцистеина наблюдалось у 85% больных, при этом у 38% больных отмечена нормализация этого показателя к концу второго месяца лечения.
5. Двухмесячный курс лечения фолиевой кислотой, витаминами B_{12} и B_6 у больных сахарным диабетом 2 типа привел к улучшению кровотока в зоне микроциркуляции и уменьшению клинических проявлений ангиопатии.
6. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о важности и необходимости выявления гипергомоцистеинемии у больных сахарным диабетом 2 типа и устранения этого нарушения обмена аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ефимов В.С., Цакалоф А.К. Гомоцистеинемия в патогенезе тромбоваскулярной болезни и атеросклероза//Лабораторная медицина. — 1999. — №2. — С. 44-48.*
2. *Шмелева В.М. Гипергомоцистеинемия и тромбоз//Тромбоз, гемостаз и реология. — 2000. — №4. — С. 26-29.*
3. *Cattaneo M Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis//Thromb. Haemost. — 1999. — Vol. 81. — P. 65-76.*
4. *Hankey G.J., Eikelboom J.W. Homocysteine and vascular disease//Lancet. — 1999. — Vol. 354. — P. 407-413.*
5. *Hoogeveen E.K., Kostense P.J., Jakobs C. et al. Hyperhomocysteinemia increases risk of death, especially in type 2 diabetes: 5-year follow-up of the Hoorn Study//Circulation. — 2000. — Vol. 101. — P. 1506-1511.*
6. *Buysschaert M., Dramais A.S., Wallemacq P.E., Hermans M.P. Hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes: relationship to macroangiopathy, nephropathy, and insulin resistance//Diabetes Care. — 2000. — Vol. 23. — P. 1816-1822.*
7. *Cipolla M.J., Williamson W.K., Nehler M.L. et al. M. The effect of elevated homocysteine levels on adrenergic vasoconstriction of human resistance arteries: the role of the endothelium and reactive oxygen species//J Vascular Surgery. — 2000. — Vol. 31. — P. 751-759.*
8. *Woo D.K., Dudrick S.J., Sumpio B.E. Homocysteine stimulates MAP kinase in bovine aortic smooth muscle cells//Surgery. — 2000. — Vol. 128. — P. 59-66.*
9. *Баркаган З.С., Костюченко Г.И., Котовщикова Е.Ф. Гипергомоцистеинемия как самостоятельный фактор риска поражения и тромбирования кровеносных сосудов//Патология кровообращения и кардиохирургия. — 2002. — №1. — С. 65-71.*
10. *Dardik R., Varon D., Tamarin I. et al. Homocysteine and oxidized low density lipoprotein enhanced platelet adhesion to endothelial cells under flow conditions: distinct mechanisms of thrombogenic modulation//Thromb. Haemost. — 2000. — Vol. 83. — P. 338-344.*
11. *Midorikawa S., Sanada H., Hashimoto S., Watanabe T Enhancement by homocysteine of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and secretion from vascular endothelial and smooth muscle cells//Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2000. — Vol. 272. — P. 182-185.*
12. *Becker A., Kostense P.J., Bos G. et al. Hyperhomocystein-*

aemia is associated with coronary events in type 2 diabetes//J Intern. Med. — 2003. — Vol. 253- P. 293-300.

13. *Passaro A., D'Elia K., Pareschi P. L. et al. A. Factors influencing plasma homocysteine levels in type 2 diabetes//Diabetes Care. — 2000. — Vol. 23. — P. 420-421.*
14. *Руководство по гематологии/Под ред. акад. А. И. Воробьева. Издание третье, переработанное и дополненное. В трех томах. — М.: Ньюдиамед, 2005. — Т. 3. — С. 140-141.*
15. *Welch G., Loscalzo J Homocysteine and Atherotrombosis//New Engl. J. Med. — 1998. — Vol. 338. — P. 1042-1050.*
16. *Monnerat C., Hayoz D Homocysteine et maladie thrombo-embolique veineuse//Schweiz. Med. Wochenschr. — 1997. — Vol. 127, №36. — P. 1489-1496.*
17. *Abbasi F., Facchini F., Humphreys M. H., Reaven G. M. Plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers are not related to differences in insulin-mediated glucose disposal//Atherosclerosis. — 1999. — №146. — P. 175-178.*
18. *Woo K. S., Sanderson J. E., Sun Y. Y. et al. Hyperhomocyst (e) inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans//Circulation. — 1997. — Vol. 96. — P. 2542-2544.*

Определение содержания общего гомоцистеина в плазме методом ВЭЖХ с использованием амперометрического детектора

М. К. Малинка, М. В. Полуэктова

ГУ Медицинский Радиологический Научный Центр РАМН, Обнинск

Determination of total homocysteine plasma level by high-performance liquid chromatography with amperometry detector

M. K. Malinka, M. V. Poluaktova

Public Institution Medical Radiological Research Center RAMS, Obninsk

HPLC method with electrochemical (amperometry) detector for total homocysteine plasma level determination is presented. In the detector glasscarbonic working electrode is applied which is not making a concession to expensive (dear) import analogues on sensitivity to thiols. Electrochemical signal of calibrate homocysteine solution was linear from 0,1 up to 100 μmol/l. Bottom limit of quantitative homocysteine detecting was less than 1 μmol/l. Total homocysteine plasma content from 30 healthy donors was determined (coefficient of variation was less than 10%); for 40 analyses pool of plasma with homocysteine concentration 11,1 μmol/l coefficient of variation was 8,7%. Good reproducibility of results on such low limits of detecting proved the reliability of amperometry detector work.

Keywords: *homocysteine — amperometry detector — limit of detection*

ВВЕДЕНИЕ

Определение уровня гомоцистеина (ГЦ) в плазме крови представляется очень важным для клинической диагностики. Результаты исследований последних лет показали, что выявление гипергомоцистеинемии свидетельствует не только о высоком риске развития атеросклероза, тромбоза коронарных, церебральных и периферических артерий, но может манифестировать о наличии нервно-психических заболеваний, осложнений беременности, нарушений когнитивных функций и др. Внедрение в клиническую практику надежных клинико-лабораторных методов определения уровня ГЦ, в частности, иммуноферментных, радиоэнзимных, флюорометрических, а также ВЭЖХ — это значительный шаг для лабораторной диагностики [1, 2, 3, 4, 7, 8, 10]. Однако используемые методы при всех их достоинствах не лишены определенных недостатков, в том числе и экономического характера. Разработка и внедрение новых технологий отечественного производства, способствующие снижению себестоимости анализа, но обладающие высокими аналитическими показателями, до сих пор остаются актуальными.

Усовершенствование метода ВЭЖХ с использованием отечественного амперометрического детектора представляло задачу нашего исследования. Для определения ГЦ методом ВЭЖХ в качестве детектирующих систем используются, как правило, спектрофотометрические, флуоресцентные детекторы [4]. Для этого ГЦ предварительно химически дериватизируют в соответствующие производные, что делает аналитический процесс более длительным и трудоемким. Амперометрический детектор производства НПО «Химавтоматика» (Москва), оснащенный стеклоуглеродным электродом и не уступающий дорогим импортным аналогам по чувствительности к тиолам, позволяет определять ГЦ напрямую без дериватизации. В настоящей работе исследована возможность и предложена методика применения ВЭЖХ с отечественным амперометрическим детектором со стеклоуглеродным электродом для определения ГЦ в плазме крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали образцы плазмы крови 30 здоровых доноров и пул контрольной плазмы 3 здоровых лиц с концентрацией ГЦ, равной 11,1 мкмоль/л. Цельную кровь, отобранную натощак, собирали в пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта. Затем пробы центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 15 минут. Плазму отделяли и хранили до проведения анализа при — 20°С. Все пробы исследовали дважды. Для подготовки образцов крови к хроматографическому исследованию использовали метод восстановления: 60 мкл плазмы помещали в пробирки объемом в 1,5 мл (производства фирмы «Эппендорф»), затем последовательно добавляли 30 мкл 4 моль/л $NaBH_4$ в 0,066 моль/л NaOH и 333 мл/л диметилсульфоксида, 10 мкл 75 мг/мл ЭДТА, 10 мкл октанола и 20 мкл 1,8 М соляной кислоты [6]. Пробирки осторожно встряхивали и оставляли на 20 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали медленным добавлением 200 мкл холодной 20% трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугировали при 15000 об/мин. в течение 10 минут для отделения осажденного белка. Верхние слои фильтровали через 0,45 мкм нейлоновые фильтры, после чего 20 мкл супернатанта вводили в ВЭЖХ систему.

Аппаратура ВЭЖХ состояла из насоса — модель 305 (Gilson, США), интегратора — модель 506С, инжектора Reodin — модель 7725i (Gilson) с петлей 20 мкл, манометрического модуля — модель 805 (Gilson) и амперометрического детектора со стеклоуглеродным электродом (Химавтоматика, Москва). Хроматографическое разделение проводили на колонке 250×4,6 мм Platinum C18 с размером частиц 5 мкм Alltech, с предколонкой 7,5×4,6 мм С18 с размером частиц 7 мкм. Подвижная фаза состояла из 0,1 М монохлоруксусной кислоты и 3,6 мМ октилсульфоната натрия; значение pH=3,2 достигали с помощью гидроксида натрия. Фаза фильтровалась и дегазировалась под вакуумом в течение 30 минут.

Хроматографическое разделение проводили при комнатной температуре с расходом 1 мл/мин. при 1,3 В. При данных условиях пик ГЦ выходил примерно на 5 минуте, и общее время анализа составляло 25 минут. Этого времени достаточно для выхода всех окисляющихся соединений и готовности системы к следующему анализу. Время удерживания несколько менялось при старении колонки и изменении температуры. Также были опробованы колонки «Диабонд С-16» и «Диасфер 200 С-18» фирмы «БиоХимМак СТ», РФ и «Allsphere ODS-2» (Alltech).

Площадь пика ГЦ автоматически определялась компьютером, концентрация рассчитывалась интерполяцией по калибровочной кривой с учетом разбавления плазмы при пробоподготовке. Водные стандарты были приготовлены растворением в 0,1 М HCl D, L — гомоцистеина производства фирмы «ALDRICH». Между экспериментами растворы хранили на льду. Калибровочная кривая была получена на парных образцах с концентрацией ГЦ 1, 5, 10, 20, 40 и 100 мкМ. При методе внутреннего стандарта по принципу «введено-найдено» ГЦ добавляли к плазме до пробоподготовки. Коммерческий контрольный материал донорской плазмы для ВЭЖХ — «Liquichek Homocysteine Control» фирмы «Bio-Rad» содержал известное количество ГЦ и применялся между опытами один раз в неделю. Монохлоруксусная кислота, октилсульфат натрия, боргидрид натрия были получены от фирмы Sigma (США). Остальные реактивы были аналитической степени чистоты. Вода была получена на установке «Миллипоре».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При построении калибровочного графика использовали зависимость концентрация/площадь: по оси абсцисс откладывали концентрации ГЦ (мкмоль/л), а по оси ординат — площади пиков, выраженные

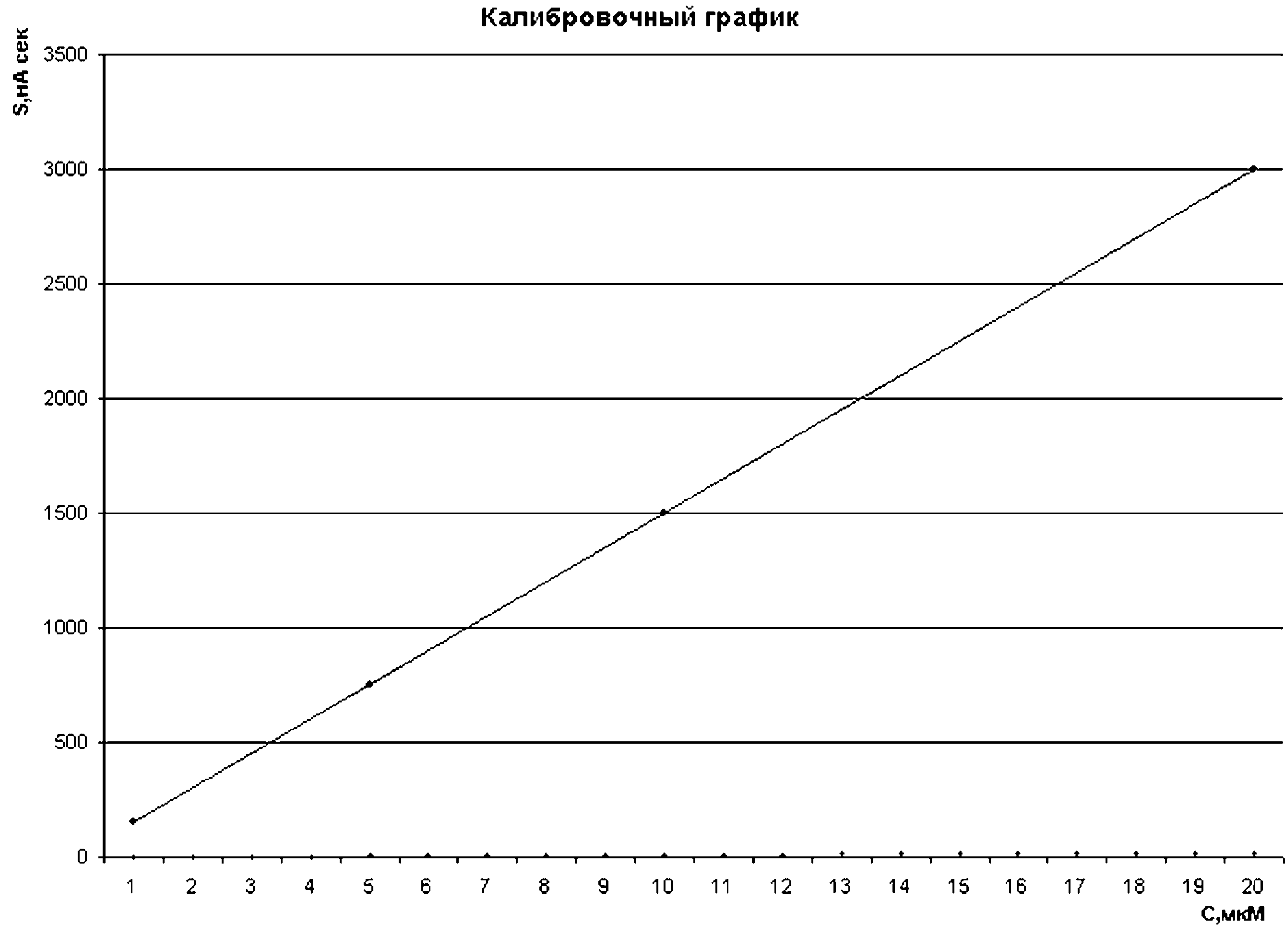

Рис.1. Зависимость детектируемой площади от концентрации гомоцистеина

в нА·сек. Калибровочная кривая была линейной в диапазоне концентраций 0–100 мкмоль/л (**рис.1**), то есть разрешающая способность детектора в использованных условиях обеспечивала определение от 0,2 до 20 мкмоль/л ГЦ. Поскольку при пробоподготовке образец плазмы разбавляется в 5 раз, то «рабочая» калибровка применима как для гипо-, так и для гипергомоцистеинемии. Площадь зарегистрированного пика рассчитывалась компьютером и записывалась в верхней части хроматограммы. Использовали компьютерную программу «ЭКОХРОМ». В наших условиях предел детектирования для водного стандарта ГЦ составлял <1 пмоль, или < 0,05 мкмоль/л (соотношение сигнал-шум 4).

Для контроля качества разработанной методики в процесс лабораторных исследований включали контрольные образцы в соответствии с требованиями Минздрава РФ [11, 12]. На **рисунке 2** приведены хроматограммы, полученные на хроматографе со стеклоуглеродным электродом, и показаны пики ГЦ в контрольном двухуровневом материале для ВЭЖХ «Liquichek Homocysteine Control» фирмы «БИО-РАД» (плазма человека, содержащая 11,4 и 37 мкмоль/л гомоцистеина). При анализе пяти проб в ходе одного эксперимента на парных образцах для «высокого» (37 мкМ) и «низкого» (11,4 мкМ) содержания общего ГЦ плазмы полученные коэффициенты внутрисерийной вариации составляли 8,4% и 7,0%, соответственно. Площадь пиков для разных уровней ГЦ составляла 821 и 297 нА·сек, что в пересчете соответствует 11,6 и 34,2 мкмоль/л.

Для расчета коэффициента вариации в разных серия анализировали 20 одинаковых проб пула плазмы с содержанием ГЦ 11,1 мкмоль/л на парных образцах в течение десяти дней. Получено 40 значений в десяти сериях измерений и определен коэффициент вариации между анализами, равный 8,7%.

Ежедневно перед определением ГЦ в образцах инжектировали стандартный раствор ГЦ (10 мкмоль/л) для определения времени удержива-

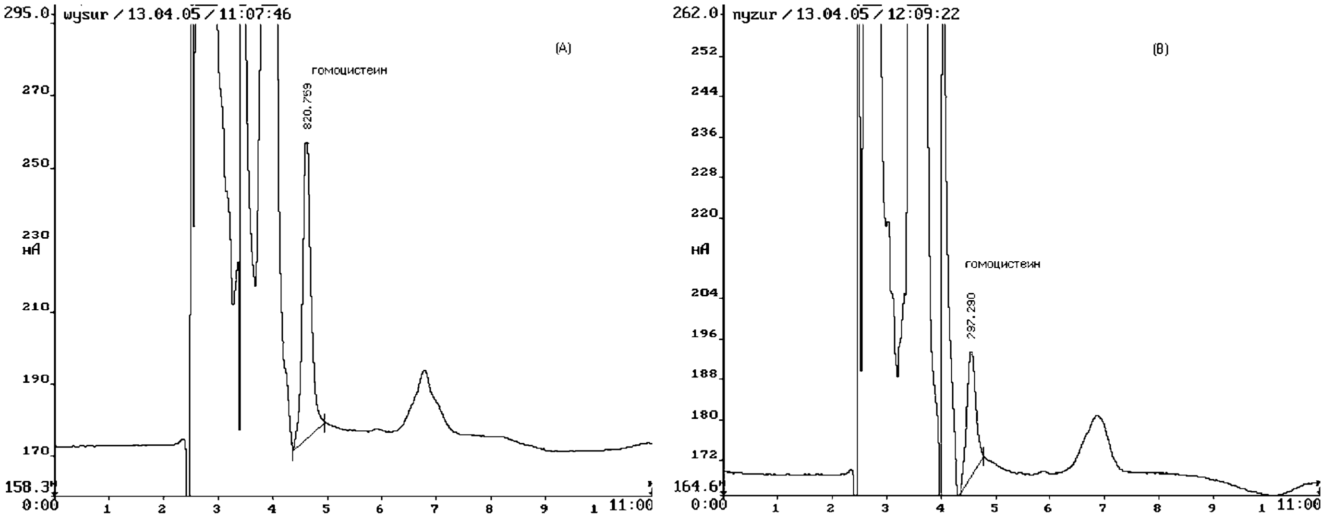

Рис. 2. Хроматограммы контрольного материала с «высоким» (А) и «низким» (В) содержанием общего гомоцистеина в плазме человека: 37 мкМ и 11,4 мкМ соответственно.

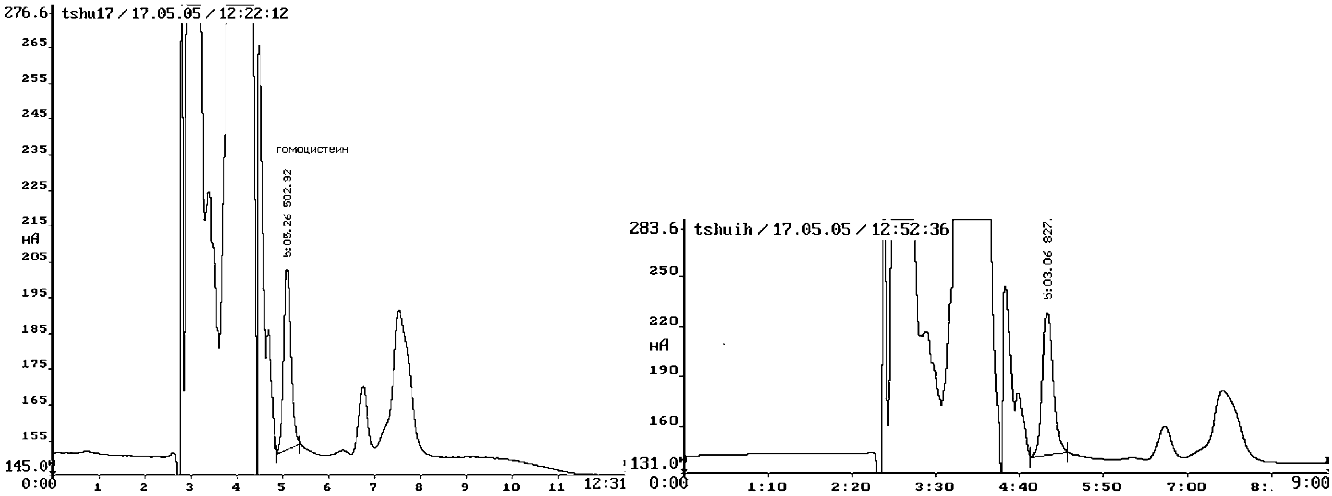

Рис. 3. А — хроматограмма плазмы, В — хроматограмма плазмы с добавкой гомоцистеина (+20 мкМ).

ния его колонкой. Очистку электрода осуществляли ежедневным включением импульсного режима и промыванием этанолом и метиленхлоридом.

В плазме 30 здоровых доноров значения ГЦ находились в диапазоне от 4,5 до 11,4 мкмоль/л с коэффициентом вариации в парных образцах <10%. По данным литературы нормальное содержание ГЦ в плазме крови здоровых взрослых людей составляет 5–15 мкмоль/л, с возрастом его уровень незначительно повышается [1, 2].

Для оценки результатов был опробован метод внутреннего стандарта по принципу «введено-найдено», который оказался пригодным для расчета содержания ГЦ. К плазме добавляли раствор ГЦ до конечной концентрации 20, 40, 60 и 80 мкмоль/л в пробе, затем проводили анализ. Полученная калибровочная кривая с добавлением к плазме ГЦ была линейной до 80 мкмоль/л. На **рисунке 3** представлены хроматограммы образцов плазмы: (А) с содержанием ГЦ, равным 30 мкмоль/л, и (В) с ГЦ, внесенным дополнительно (+20 мкмоль/л). Площади пиков составили 503 и 827 нА·сек, хорошо согласуясь с расчетными данными: 30 и 50 мкмоль/л.

Впервые определение ГЦ с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектором было разработано на золото-ртутном электроде, обладающем специфичностью к тиолам [6]. Стеклоуглеродный электрод, будучи неспецифичным, окисляет другие вещества, в том числе и не содержащие сульфгидрильных групп. Поэтому наши усилия были направлены на хорошее хроматографическое разделение. Из нескольких опробованных хроматографических колонок наиболее удовлетворительное деление было достигнуто на колонке Platinum C-18 (Alltech). Хорошая корреляция данных между расчетным количеством внесенного ГЦ в плазму и детектируемым количеством свидетельствует об отсутствии других компонентов плазмы, мешающих определению. Амперометрический детектор, оснащенный стеклоуглеродным электродом, не уступает дорогим импортным аналогам по чувствительности к тиолам, что позволяло достоверно определять ГЦ в сильноразбавленных пробах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемая методика определения общего гомоцистеина в плазме крови методом ВЭЖХ пригодна для лабораторий, имеющих небольшой объем работы и амперометрический детектор. В результате проведенной работы на разных контрольных материалах получена хорошая воспроизводимость результатов, что свидетельствует о надежной работе детектора и указывает на реальную возможность его широкого использования в клинической практике для получения дополнительной информации как при сердечно-сосудистых заболеваниях, так и при других видах патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шевченко О. П. Гомоцистеин — новый фактор риска атеросклероза и тромбоза//Клиническая лабораторная диагностика. — 2004. — № 10. — С. 25-31.*
2. *Козлова Т. В. Гипергомоцистеинемия как клиническое проявление риска тромбозов//Клиническая медицина. — 2005. — № 2. — С. 9-12.*
3. *Халифеоглу И., Гюр Б., Айдин С. и соавт. Уровень микроэлементов, витамина B12, фолата и гомоцистеина в плазме пациентов с циррозом печени и в норме//Биохимия. — 2004. — № 69. — С. 851-855.*
4. *Ефимов В. С., Кудрин В. С. Определение клинически значимых концентраций гомоцистеина путем использования стеклоуглеродного электрода в электрохимическом детекторе методом ВЭЖХ//Тромбоз, гемостаз и реология. — 2000. — № 3. — С. 39-41.*
5. *Бронштейн А. С. Частная медицина. — М., 2004. — Т. 1. — С. 168.*
6. *Eramo J. L. D., Finkelstein A. E., Boccazzi F. O. et al. Total homocysteine levels in plasma//J Chromatography. — 1998. — Vol. 720. — № 1, 2. — P. 205-210.*
7. *Mennen L. J. Homocysteine cardiovascular disease risk factors//Am. J Clin. Nutr. — 2002. — Vol. 76. — № 6. — P. 1279-1289.*
8. *Schulpis K. H. Homocysteine and otter vascular risk factors in patients with phenylketonuria diet//Acta Pediatr. — 2002. — Vol. 91. — № 8. — P. 905.*
9. *Kuo K., Still R., Cale S. et al. Standartization of HPLC assay for plasma homocysteine//Clin. Chem. — 1997. — Vol. 43. — P. 1653-1657.*
10. *Donner M. G., Klein G. K., Mathea P. B. et al. Plasma total homocysteine levels in patients with earli-onset coronary heart disease and a low cardiovascular risk profile//Metabolism. — 1998. — Vol. 47. — № 3. — P. 273-279.*
11. *Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике. — М.: Медицина, 2003. — С. 120.*
12. *«Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных клинических лабораторных исследований». Приложение 2 к Приказу Минздрава РФ № 45 от 7 февраля 2000 г.*

Влияние дополнительных доз протамина на состояние системы гемостаза при операции аортокоронарного шунтирования в условиях работающего сердца

Е. Л. Непорада, Н. А. Воробьева, О. В. Турундаевская, Г. Н. Мельникова
Северный государственный медицинский университет, МУЗ «Первая городская клиническая больница», Архангельск, Россия

Influence of additional protamine doses on hemostasis during aorto-coronary bypass at working heart

E. L. Neporada, N. A. Vorobieva, O. V. Turundaevskaya, G. N. Melnikova
North state medical university, city hospital № 1, Arkhangelsk, Russia

ВВЕДЕНИЕ

В периоперационный период любой травматичной операции наблюдаются выраженные изменения в системе гемостаза, связанные с иммобилизацией больного, возможным снижением температуры тела во время операции и постнаркозного сна, эмоциональным стрессом, сопровождающимся повышением уровня катехоламинов, кровопотерей, механическим повреждением тканей во время операции. При операции аортокоронарного шунтирования (АКШ) на работающем сердце присутствуют дополнительные пусковые факторы: хронические изменения системы гемостаза и реологии крови, характерные для атеросклероза и ИБС, сосудистый шов, ишемия миокарда при формировании анастомозов, реперфузия миокарда, возможная микроатероэмболия при атеросклерозе восходящей аорты, отмена обычной антикоагулянтной и дезагрегантной терапии в предоперационном периоде.

Состояние системы гемостаза в периоперационном периоде оказывает серьезное влияние на непосредственные результаты операции: величину кровопотери и потребность в инфузионно-трансфузионной терапии, проходимость шунтов, необходимость в повторной торакотомии, частоту периоперационных осложнений (ОИМ, ОНМК, инфекционные осложнения), периоперационную летальность.

Для создания управляемой гипокоагуляции при операции АКШ на работающем сердце применяется методика внутривенного введения гепарина в дозе 100 Ед/кг, при этом активированное время свертывания (АВС) во время операции поддерживается на уровне выше 250 секунд. Для нейтрализации антикоагуляционной активности гепарина с целью предотвращения геморрагических осложнений в конце операции вводится протамин сульфат из расчета 1 мг на 100 Ед гепарина (нейтрализация 1: 1). Протамин сульфат, являясь препаратом биологического происхождения, часто вызывает аллергические реакции, обладает вазоактивным действием и неоднозначным влиянием на состояние системы гемостаза. Известно, что частота аллергических реакций на протамин сульфат выше у лиц, имеющих пищевую аллергию на рыбные продукты, у мужчин после вазорезекции сосудов простаты, а также у пациентов, страдающих сахарным диабетом и находящихся на инсулинотерапии [1]. Неблагоприятные гемодинамические реакции на введение протамина встречаются довольно часто и варьируют от непродолжительной нестабильности артериального давления (АД) до сердечно-сосудистого коллапса. Экспериментальное исследование *Takakura et al* показало, что протамин сульфат и комплексы гепарин-протамин вызывают системную гипотонию, опосредованную стимуляцией индуцируемой NO-синтетазы [2]. При назначении протамина сульфата и образовании комплексов протамин-гепарин происходит активация комплемента по классическому пути [3, 4], выраженность которой коррелирует с фракцией легочного шунта в послеоперационный период [5]. По данным *Ocal et al* у 68 из 3800 (1,78%) пациентов, подвергавшихся АКШ, во время или после введения протамина развилась острая легочная гипертензия и правожелудочковая недостаточность [6]. *Hughes et al* установили, что введение протамина при операции АКШ в условиях вспомогательного кровообращения вызывает достоверное повышение как уровней 1 и 2 фрагмента протромбина, сохраняющееся в течение 6 часов, так и связанное с ним повышенное образование тромбина [7]. В исследовании *Lohne* частота ранней стенокардии или рестеноза/реокклюзии коронарной артерии в течение 30 дней после коронарной ангиопластики составляла 8% при применении протамина сульфата и 2% в группе больных, где протамин не применялся [8].

Перечисленные отрицательные эффекты протамин сульфата, диктуют необходимость поиска других препаратов и методов проведения управляемой гипокоагуляции с последующей нейтрализацией. В качестве альтернативного препарата для устранения эффекта гепарина предложен рекомбинантный тромбоцитарный фактор 4 (ТФ-4) — полипептид тромбоцитов, который связывает и ингибирует гепарин [9, 10]. Для минимизации неблагоприятных эффектов протамина многие исследователи при операции АКШ на работающем сердце выполняют неполную нейтрализацию гепарина. Так *Woo et al* выявили, что при АКШ на работающем сердце снижение дозы протамина в 2 раза (нейтрализация 0,5: 1) не сопровождалось ухудшением результатов операции [11]. *Nuttall et al* полностью отказались от нейтрализации гепарина при АКШ на работающем сердце, и в своем исследовании продемонстрировали, что данная методика, по сравнению с полной нейтрализацией гепарина при использовании искусственного кровообращения, сопровождается уменьшением потребности в гемотрансфузии [12].

При операции АКШ на работающем сердце в ГКБ № 1 г. Архангельска с 1994 года используется тактика полной нейтрализации гепарина протамином (1: 1). Основываясь на показателе АВС после назначения протамина, анестезиолог принимает решение о необходимости использования дополнительной дозы протамина.

Целью исследования явилось изучение эффектов дополнительных доз протамина на систему гемостаза и величину послеоперационной кровопотери при нейтрализации гепарина во время операции АКШ на работающем сердце. В задачи исследования входило: 1) анализ состояния системы гемостаза в периоперационном периоде операции АКШ на работающем сердце; 2) оценка адекватности мониторинга системы гемостаза и ее коррекции в периоперационном периоде операции АКШ на работающем сердце; 3) оценка эффектов гепарина и протамина, назначаемых во время и после операции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено проспективное наблюдательное исследование 51 пациента, перенесшего первичное изолированное коронарное шунтирование в условиях работающего сердца (средний возраст обследованных 56 ± 1,2 лет, среди них 80,4% мужчин) в период с марта по июль 2005 г. на базе МУЗ «Первая городская клиническая больница» г. Архангельска. Согласно принятому протоколу накануне операции определяли ряд показателей системы гемостаза: концентрация фибриногена (по Клауссу), АВС, АЧТВ, ПТВ (МНО), ТВ, АТ III (хроматогенный метод «STA-Compact», Roshe, Франция), эуглобиновый фибринолиз, стимулированный стрептокиназой. Во время операции оценивали исходное и после нейтрализации гепарина АВС; в послеоперационном периоде каждые 4 часа определяли концентрацию фибриногена, АВС, АЧТВ. Кровь для исследования отбирали в стандартные гемостазиологические вакутейнеры «Vacuette» (Gneiner bio-one). Время от отбора проб крови до выполнения анализа не превышало 30 минут.

Во время операции и в ранний послеоперационный период (17 часов) фиксировали следующие клинические и лабораторные показатели: величина дренажной кровопотери, объем и характер инфузии, диурез, параметры гемодинамики (неинвазивное определение АД, ЧСС), парциальное насыщение кислородом артериальной крови, газовый состав артериальной и венозной крови. Статистический анализ данных выполняли с использованием пакета Excel 5.0 for Windows и SPSS 11.0 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика пациентов

Большинство (50%) прооперированных пациентов страдали стенокардией напряжения 3 функционального класса (ФК), 18% — 4 ФК и 6% — 2 ФК. Операция по поводу нестабильной и ранней постинфарктной стенокардии была выполнена у 12% пациентов; у 12% и 2% пациентов ФК стенокардии определен как 3-4 и 2-3, соответственно (**рис.1**). Из сопутствующей патологии превалировала гипертоническая болезнь — 87,8% случаев; в 11,8% обнаружен СД 2 типа, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки — 21,6%, ХОБЛ — 7,8%; у 1 пациента (1,9%) наблюдали остаточные явления ОНМК. Та или иная степень ожирения (НЖО) наблюдалась у 47% пациентов, у 5,8% отмечено ожирение 3 степени, у 15,6% — ожирение 2 степени (**рис. 2**). Ранее инфаркт миокарда перенесли 80% пациентов (у 47% выявлены крупноочаговые изменения мио-

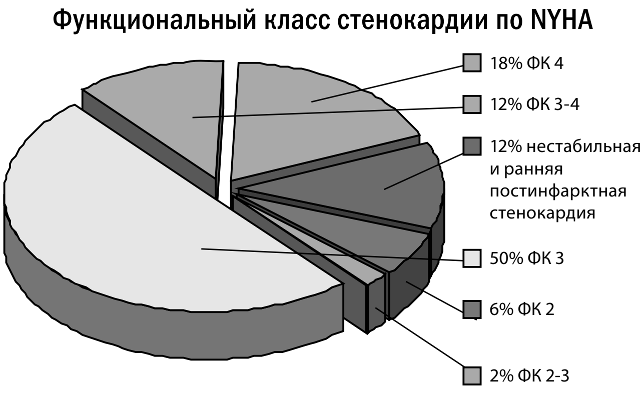

Рис. 1. Характеристика пациентов по функциональному классу стенокардии

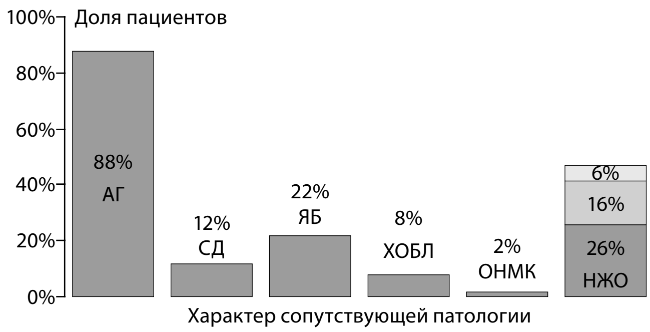

Рис. 2. Характер сопутствующей патологии у пациентов, подвергающихся АКШ на работающем сердце.

карда, заметные макроскопически). Среднее значение фракции выброса левого желудочка по данным ЭХОКГ составляло 57,9 ± 1,3% (у 16,6% пациентов наблюдалось снижение функции левого желудочка — ФВ <50%); хроническая сердечная недостаточность 2 ФК выявлена у 81% пациентов. По данным каротидной ангиографии среднее количество пораженных сосудов составляло 2,87 ± 0,1; количество дистальных анастомозов — 2,9 ± 0,1.

Некоторые особенности течения периоперационного периода

Средняя продолжительность операции составила 132 ± 4 минут; среднее время ишемии при формировании дистальных анастомозов — 30,5 ± 1,5 минут. Депрессия или элевация сегмента ST и/или появление аритмии по данным ЭКГ-мониторинга во время операции наблюдались у 21,5% пациентов, операционная гипотония — у 51%. В 23,5% случаев во время операции потребовалось введение вазопрессорных/инотропных препаратов. Артериальная гипертензия присутствовала у 37,3% пациентов.

Таблица 1

Состояние системы гемостаза накануне операции

Показатели	Средняя	Ошибка средней	Референтные значения
Тромбоциты ($\times 10^9$/л)	245	8	180–320
Агрегация к адреналину (сек.)	30	3	40–45
Агрегация к АДФ (сек.)	19	2	20–25
Фибриноген (г/л)	3,8	0,1	2–4
АЧТВ (сек.)	34,5	1	20–40
ТВ (сек.)	15,7	0,1	70–120
Фибринолиз (сек.)	93	5,5	70–85
Антитромбин III (%)	115	2,5	80–120
МНО (доли 1)	0,99	0,22	0,9–1,3

Операционная кровопотеря составляла 330 ± 6,4 мл; объем дренажной кровопотери в ранний послеоперационной период и средняя скорость кровопотери — 587 ± 36 мл и 0,43 ± 0,03 мл/кг/час, соответственно. Потребность в инфузии коллоидов в объеме 584 ±44 мл возникла у 37% пациентов, в трансфузии СЗП в объеме 994 ± 261 мл — у 13,7% пациентов, эритроцитарной массы в объеме 672 ± 86 мл — у 5,8% пациентов.

Необходимость в повторной срочной стернотомии вследствие большого объема дренажной кровопотери отмечена у 2 пациентов. В исследуемой группе не было летальных случаев. У 8% пациентов срок общей госпитализации (за счет послеоперационной) превысил 40 суток, чтобыло связано с развитием осложнений инфекционного характера (нестабильность грудины, медиастинит, аритмии).

Система гемостаза в периоперационный период

Система гемостаза накануне операции (**табл. 1**) характеризовалось повышением агрегационной активности тромбоцитов (агрегация к АДФ составляла 19 ± 2 сек.) на фоне их нормального количества (245 ± 8 × 10⁹/л). В системе плазменной коагуляции наблюдалось повышение прокоагулянтной активности за счет усиления тромбообразования: у 21% пациентов наблюдалось укорочение АЧТВ на 11,6%, у 27,5% — повышение концентрации фибриногена на 16,3% по сравнению с референтными показателями. Активность АТ III оставалась в пределах ре-

Таблица 2

Различия между периоперационными показателями гемостаза и объемами дренажной кровопотери в группах пациентов, кому назначалась стандартная и повышенная дозы протамина

Показатели	Средняя доза протамина 1 ± 0,03 мг/кг (*n=27*)	Средняя доза протамина 1,46 ± 0,05 мг/кг (*n=24*)	Значение *p*
АВС в начале операции (сек.)	144 ± 7	160 ± 11	0,25
АВС после введения стандартной дозы протамина (сек.)	182 ± 9	208 ± 10	0,06
АВС в первый час после операции	178 ± 11	251 ± 18	0,0016
Дренажная кровопотеря (мл)	607 ± 46	569 ± 64	0,59
Дренажная кровопотеря (мл/кг/час)	0,42 ± 0,03	0,44 ± 0,05	0,70

ферентных показателей — 115,1 ± 2,5%. Состояние фибринолитической системы характеризовалось тенденцией к ее депрессии (92 ± 6 сек.). Показатель АВС в начале операции до введения гепарина свидетельствовал о выраженной гипокоагуляции (152 ± 7 сек.).

Средняя доза гепарина, вводимого в начале операции, составляла 94 Ед/кг, коррекция дозы проводилась в 1 случае. Средняя доза протамина составляла 0,98 мг/кг, увеличение дозы протамина в среднем на 0,49 мг/кг выполнено у 24 (47%) пациентов. АВС в начале операции не различалось у пациентов, которым назначали стандартную и повышенную дозы протамина (144 ± 7 сек. по сравнению с 160 ± 11 сек., *p=0,25*). После введения стандартной дозы протамина АВС в группе пациентов, которым позже назначали дополнительную дозу протамина, было незначительно выше (208 ± 10 сек. по сравнению с 182 ± 9 сек, *p=0,06*). АВС в первый час после операции было достоверно выше у пациентов, которым назначали дополнительную дозу протамина (178 ± 11 сек. по сравнению с 251 ± 18 сек, *p=0,0016*) (**табл. 2**).

Таким образом, после введения стандартной дозы протамина, наблюдалась гипокоагуляция крови ($АВС_{после\ протамина}$ — 182 ± 9 сек.), которая не углублялась (*p =0,8*) в течение следующего часа ($АВС_{после\ операции}$ — 178 ± 11 сек.). В группе пациентов, которым протамин вводили дополнительно,

Таблица 3

Изменения показателя АВС с момента введения стандартной дозы протамина в течение одного часа*

Группы пациентов	АВС после введения стандартной дозы протамина (сек.)	АВС спустя 1 час после операции (сек.)	Значение *p*
Стандартная доза протамина	182 ± 9	178 ± 11	0,80
Повышенная доза протамина	208 ± 10	251 ± 18	0,05

* В группе полной нейтрализации гепарина протамином нет достоверных различий в показателе АВС. В группе пациентов, которым после введения стандартной назначалась дополнительная доза протамина, АВС спустя 1 час после операции достоверно выше

гипокоагуляция, наблюдавшаяся после назначения стандартной дозы протамина ($АВС_{после\ протамина}$ — 208 ± 10 сек.), еще более углублялась (*p = 0,050*) после назначения дополнительной дозы ($АВС_{после\ операции}$ — 251 ± 18 сек.) (**табл. 3**).

Разницу в АВС в конце операции между группами нельзя было объяснить различной степенью гемодилюции, так как в группе полной нейтрализации гепарина гемодилюция была даже более выражена: показатель гематокрита в конце операции составлял 0,39 по сравнению с 0,41 в группе избыточной нейтрализации (*p = 0,04*), причем за время операции он также менялся в меньшей степени в группе избыточной нейтрализации (уменьшился на 0,003 по сравнению с 0,02, *p = 0,02*).

Также не было выявлено различий между группами пациентов по температура тела после операции (35,3°С против 35,3°С, *p = 0,96*), так что условия, в которых осуществлялся тромбоцитарный гемостаз, были одинаковы.

Таким образом, дополнительная доза протамина неэффективно устраняла гипокоагуляцию (наблюдалось удлинение АВС), что может быть обусловлено как описанным парадоксальным эффектом протамина при его передозировке, так и наличием других причин удлинения АВС (снижение концентрации фибриногена, повышение фибринолитической активности с накоплением ПДФ, развитие ДВС и др.).

При корреляционном анализе в общей группе выявлена слабая корреляция (*r = 0,27, p = 0,053*) между дозой гепарина, вводимого во время операции,

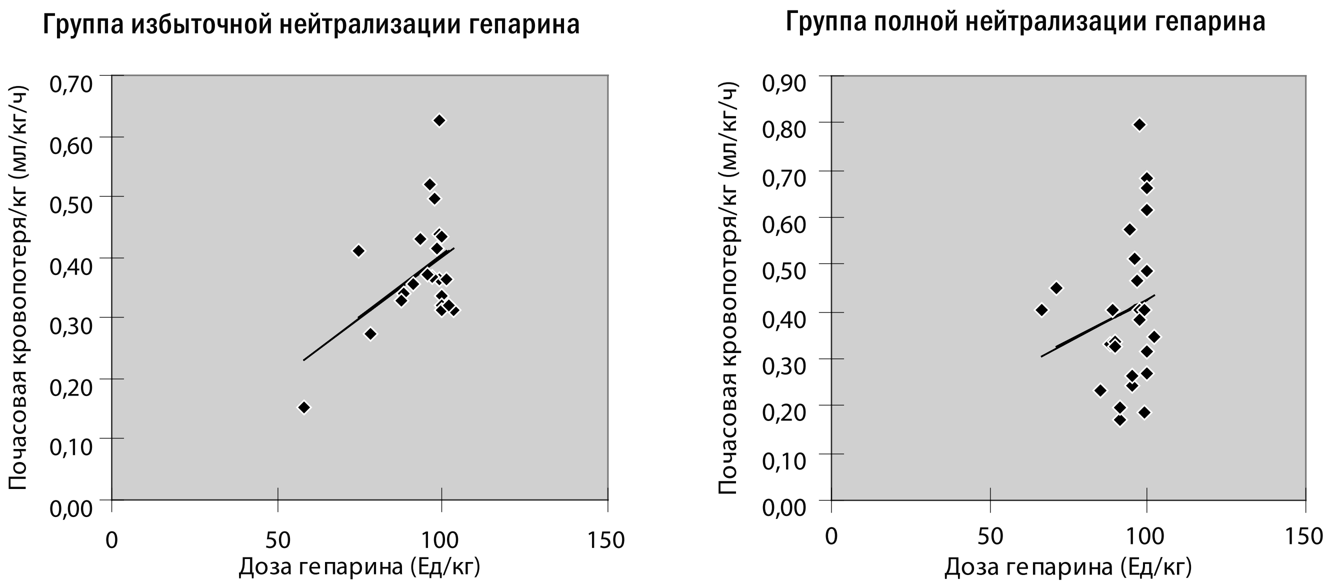

Рис. 3. Графики зависимости между дозой гепарина и величиной дренажной кровопотери в группах пациентов с и без введения дополнительных доз протамина.

и величиной дренажной кровопотери. При этом в группе пациентов, у которых осуществлялась стандартная нейтрализация гепарина протамином (1: 1) не наблюдали достоверной корреляционной связи между дозой гепарина и величиной дренажной кровопотери (*r = 0,23, p =0,26*), т.е. в отношении влияния на величину кровопотери полная нейтрализация гепарина протамином достигала своей цели. В группе больных, которым производилась избыточная нейтрализация гепарина, возможно существование корреляции (*r = 0,38, p = 0,070*) между дозой гепарина и величиной кровопотери. Таким образом, при проведении избыточной нейтрализации сохранялась зависимость объема дренажной кровопотери от дозы гепарина (**рис. 3**).

ВЫВОДЫ

1. Накануне коронарного шунтирования наблюдаются нарушения гемостаза, типичные для ИБС и распространенного атеросклероза: повышенная активность тромбоцитов на фоне депрессии фибринолитической системы.
2. Мониторинг системы гемостаза в анализируемой группе не дает представления об эффектах назначаемого гепарина и первой расчетной дозы протамина, и после операции не включает оценку важнейших гемостазиологических показателей (ФА, АТ III, ФАТ, РФМК, ПДФ), что не позволяет дифференцировать нарушения гемостаза и проводить их целенаправленную терапию.
3. Назначение дополнительной дозы протамина не устраняет состояние гипокоагуляции, наблюдаемое сразу после операции. Избыточная нейтрализация по сравнению с полной неэффективно устраняет влияние гепарина на величину кровопотери**.**

ЛИТЕРАТУРА

1. *Baker M.S., Skoyles J.R., Shajar F.M. et al. Can lean body mass be used to reduce the dose of heparin and protamine for obese patients undergoing cardiopulmonary bypass?//J Extracorpor. Technol. — 2005. — Vol. 37, № 2. — P. 153-156.*
2. *Takakura K., Mizogami M Fukuda S Protamine sulfate causes endothelium-independent vasorelaxation via inducible nitric oxide synthase pathway//Can. J. Anaesth. — 2006. — Vol. 53, № 2. — P. 162-167.*
3. *Herh J., Rohr H In vivo complement activation by polyanion-polycation complexes: Evidence that C5a is generated intravascularly during heparin-protamine interaction//Clin. Immunol. — 1983. — Vol. 22. — P. 5-9.*
4. *Kirklin J.K., Chenoweth D.E., Naftel D.C. et al. Effects of protamin administration after cardiopulmonary bypass on complement, blood elements, and hemodynamic state//Ann. Thorac. Surg. — 1986. — Vol. 41. — P. 193-199.*
5. *Shastry K.A., Logue G.L., Stern M.P. et al. Complement activation by heparin-protamine complexes during cardiopulmonary bypass: effect of C4a null allele//J Thorac. Cardiovasc. Surg. — 1997. — Vol. 114. — P. 482-488.*

6. Ocal A., Kiris I., Erdinc M. et al. Efficiency of prostacyclin in the treatment of protamine-mediated right ventricular failure and acute pulmonary hypertension//Tohoku J Exp. Med. — 2005. — Vol. 207, № 1. — P. 51-58.
7. Hughes P., Hasenkam J. M., Severinsen I. K., Steinbruchel D. A. Postoperative treatment with low molecular weight heparin after right heart assist for coronary artery bypass grafting//Scand. Cardiovasc. J. — 2005. — Vol. 39, № 5. — P. 306-312.
8. Lohne F., Klow N. E., Stavnes S. et al. Safety of heparin reversal with protamin and immediate sheath removal after coronary angioplasty//Acta Radiol. — 2004. — Vol. 45, № 2. — P. 171-175.
9. Levy J. H., Cormack J. G., Morales A. Heparin neutralization by platelet factor 4 and protamine//Anesth. Analg. — 1995. — Vol. 81. — P. 35-37.
10. Dehmer G. J., Fisher M., Tate D. A. et al. Reversal of heparin anticoagulation by recombinant platelet factor 4 in humans//Circulation. — 1995. — Vol. 91. — P. 2188-2194.
11. Woo Y. J., Atluri P., Grand T. J. et al. Should Standard On-Pump Protamine Dosing Formulas Be Recalculated for Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting?//Heart Surg. Forum. — 2004. — Vol. 7, № 1. — P. 42-44.
12. Nuttall G. A., Erchul D. T., Haight T. J. et al. A comparison of bleeding and transfusion in patients who undergo coronary artery bypass grafting via sternotomy with and without cardiopulmonary bypass. J Cardiothorac. Vasc. Anesth. — 2003. — Vol. 17, № 4. — P. 447-451.

Нарушения гемореологических параметров при ДВС-синдроме и их коррекция с помощью плазмафереза

А. В. Андриенко, В. Г. Лычев, В. В. Усынин

ГОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Росздрава, Барнаул

Disorders of hemorheological parametres in DIC-syndrom and there correction by plasmapheresis

A. V. Andrienko, V. G. Lychev, V. V. Usynin

Altay State Medical University, Barnaul

Plasmapheresis was used for intensive therapy of disseminated intravascular coagulation. To evaluate the effectiveness of this method clinical and laboratory investigation of 214 patients was carried out. After therapy a tendency of increasing hemorheological activity was noticed in comparison with initial background.

Keywords: *hemorheology — disseminated intravascular coagulation — plasmapheresis*

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивные методы коррекции различных патологических состояний, в патогенезе которых важнейшую роль играют нарушения реологии крови, возникающие на фоне диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) крови, основаны на использовании коррекционно-заместительной терапии, при которой трансфузии свежезамороженной плазмы (СЗП) или криосупернатантной плазмы остаются базисным и наиболее важным компонентом, в особенности при лечении острых, тяжелых, декомпенсированных форм (*З. С. Баркаган 1980–2001; А. И. Воробьев 1984-1997; В. Г. Лычев 1986–2001; British Commitee for Standarts in Haematology 1992–2002*).

Недостатком заместительной трансфузионной терапии ДВС-синдрома (СЗП, эритроцитарная масса и т.п.) является то, что нередко возникают тяжелые гемореологические нарушения, связанные с чрезмерным повышением содержания в плазме больных фибриногена, фибронектина, факторов VIII и Виллебранда, что ведет к повышению вязкости крови и усилению агрегации тромбоцитов и эритроцитов (*Shanberg, Quattrociocci-Longe 1992*). Одновременная гепаринизация не только не устраняет, но и усугубляет эти негативные стороны лечения, поскольку при таком прикрытии гипервискозность, гиперфибриногенемия и гиперагрегация эритроцитов и тромбоцитов сохраняются (*З. С. Баркаган 1988; Bell et al. 1977; Carreras 1980*).

Поэтому для коррекции указанных нарушений все шире применяют плазмаферез (ПА), плазмообмен и плазмофильтрацию, а также реопротекторные и антиагрегантные препараты. Лабораторный контроль за данными видами лечения чаще всего не проводится из-за отсутствия современных и доступных для большинства больничных лабораторий методик и аппаратов (вискозиметров, агрегометров и т.п.). Не разработан и оптимальный комплекс методов оценки основных гемореологических параметров, который бы мог бы найти широкое применение в клинической практике.

Гемореологические нарушения, возникающие при ДВС-синдроме, неоправданно остаются в тени, хотя успехи в изучении реологических свойств крови и достижения в использовании гемореологических методов в клинике не вызывают сомнения. Вместе с тем работ по комплексной оценке гемореологических параметров при включении в лечение ДВС-синдрома различных способов ПА очень мало (*В. Г. Лычев, В. В. Усынин, 2001*). Также не исследован вопрос о связях повреждения эритроцитов в контурах плазмаферезных операций с нарастанием гемокоагуляционного потенциала при лечении ПА. Недостаточно освещен вопрос о патогенетической роли сопряженных гемореологических и гемостатических сдвигов при лечении ДВС-синдрома плазмаферезом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлены результаты комплексного исследования гемореологии и гемостаза у 214 больных с ДВС-синдромом различной этиологии и течения: 156 больных с ДВС-синдромом; 74 пациента, у которых ДВС возник на фоне иммунокомплексных заболеваний; 52 пациента со злокачественными опухолями; 30 — с операционной травмой вследствие травматического хирургического вмешательства на органах брюшной полости. Диагностика синдрома ДВС основывалась на анализе клинической ситуации и вида патологии, комплексном исследовании основных параметров системы гемостаза, выявленных симптомов полиорганной недостаточности. В разработку включали случаи высоко верифицированного ДВС-синдрома по базисному варианту его распознавания с суммарным показателем достоверности диагноза в пределах 96–99%. Оценку тяжести состояния больных проводили по системе APACHE II, средний балл составлял 21±2 (*по Гельфанду Б. Р. с соавт. 2005*), летальность составляла 2,2%. Пациентов обследовали в динамике: в процессе лечения и на разных стадиях заболевания. Контрольную группу составили 60 здоровых лиц в возрасте от 18 до 43 лет.

Исследовали: 1) тромбоцитарный гемостаз: количество тромбоцитов в крови (фазово-контрастный метод); 2) коагуляционный гемостаз: активированное парциальное тромбопластиновое время — по *Caen et al.* (1968), протромбиновое время — по *Quick* (1935), тромбиновое время — по *Biggs, Macfarlane* (1962) на коагулометре CGL 2110 («SOLAR») хронометрически, концентрацию фибриногена в плазме — по *Р. А. Рутберг* (1961); 3) антикоагулянтное звено гемостаза: антитромбин III — по *Abildgaard* (1970) в модификации К. М. Бишевского (1983); 4) фибринолиз: XIIа-зависимый лизис — по *Г. Ф. Еремину* и *А. Г. Архипову* (1982); 5) методы определения РФМК и тромбинемии включали фенантролиновый тест (*В. А. Елыкомов, А. П. Момот 1987*).

Оценку гемореологии проводили по двум направлениям — изучали макро- и микрореологические свойства крови. Определяли параметры, входящие в гемореологический профиль (*В. В. Усынин, В. Г. Лычев 2004*): вязкость крови — капиллярной вискозиметрией с оптически интегрированной индикацией на вискозиметре оригинальной конструкции; вязкость плазмы — тем же способом; показатель гематокрита — традиционным центрифужным методом по модифицированному способу с определением спонтанной и стимулированной 5% раствором полиглюкина агрегации эритроцитов. Деформабельность эритроцитов оценивали с использованием коэффициента жесткости. Определение поврежденных эритроцитов осуществляли исследованием клеточного состава в интерфазе крови (*З. С. Баркаган, И. В. Тамарин 1986*). Кислотную стойкость эритроцитов с подсчетом индекса кислотной стойкости эритроцитов (ИКС) изучали на анализаторе агрегации эритроцитов «Биола» по разработанному нами методу (Патент на изобретение № 2242760).

У 134 больных с верифицированным ДВС-синдромом проводилось лечение дискретным ПА, который осуществляли в 4 этапа: забор крови в контейнер, центрифугирование, удаление из контейнера плазмы, возврат эритроцитов. Кровь получали при пункции локтевой вены, самотеком, в пластиковые маркированные контейнеры «Гемакон 500/300».

Таблица 1

Кратковременные гемореологические эффекты у больных с латентным ДВС-синдромом при лечении дискретным ПА (n=71)

Параметры	До ПА	После ПА	Контроль
	1	2	3
Вязкость крови (о. е.)	1,88 ± 0,04	1,83 ± 0,04	1,79 ± 0,01
Pu_{1-2} >0,05; Pu_{1-3} <0,05; Pu_{2-3}> 0,05			
Вязкость плазмы (о. е.)	1,30 ± 0,05	1,23 ± 0,01	1,18 ± 0,01
Pu_{1-2} < 0,05; Pu_{1-3} <0,05; Pu_{2-3} < 0,05			
Ht	0,44 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,44 ± 0,01
Pu_{1-2} > 0,10; Pu_{1-3} >0,05; Pu_{2-3} >0,05			
Коэффициент жесткости эритроцитов	1,43 ± 0,02	1,46 ± 0,03	1,30 ± 0,01
Pu_{1-2} < 0,05; Pu_{1-3} <0,05; Pu_{2-3} < 0,01			
Спонтанная агрегация эритроцитов (у. е.)	1,90 ± 0,30	1,87 ± 0,20	3,13 ± 0,36
Pu_{1-2} > 0,05; Pu_{1-3} <0,05; Pu_{2-3} < 0,05			
Стимулированная агрегация эритроцитов (у. е.)	2,13 ± 0,30	2,00 ± 0,24	5,73 ± 0,35
Pu_{1-2} > 0,05; Pu_{1-3} <0,05; Pu_{2-3} < 0,05			
ИКС (у. е.)	12,90 ± 2,99	16,45 ± 3,54	10,11 ± 1,55
Pu_{1-2} <0,005; Pu_{1-3} <0,05; Pu_{2-3}> 0,05			

Для центрифугирования крови использовали центрифугу ОС-6М (при температуре в камере центрифуги 22°С). Перед возвратом эритроциты ресуспензировали в 100 мл физиологического раствора (0,9% хлорида натрия). Было проведено 134 курса лечения дискретным ПА, состоявших в общей сложности из 536 сеансов. Число сеансов ПА в течение одного курса варьировало от 3 до 5 (в среднем 4); количество удаленной плазмы за курс лечения составляло от 1,5 до 2,5 л (в среднем 2 л). У 22 пациентов с верифицированным ДВС-синдромом проводилось лечение одноигольным безаппаратным мембранным ПА на плазмофильтре ПМФ-01-ТТ «Роса». Каждому пациенту проводили 1 сеанс мембранного ПА с одномоментным удалением в среднем 0,7 л плазмы.

Результаты исследования обрабатывали на персональном компьютере с помощью стандартных программ для статистического анализа. В некоторых случаях (при малом числе наблюдений, когда распределение отличалось от нормального) для расчета достоверности различий использовали непараметрический метод статистической обработки результатов исследования по *Вилкоксон-Ман-Уитни* (Pu). Результаты представлены в виде M ± m. Различия считали достоверными при P <0,05 и Pu <0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы провели серию экспериментов, когда первую пробирку с кровью для исследования отбирали непосредственно перед сеансом ПА, а вторую — сразу же после эксфузии эритроцитарной массы и плазмозамещающего раствора (то есть с временным промежутком в 40–60 минут). Выявленную динамику реологических свойств крови мы обозначили как кратковременные гемореологические эффекты дискретного ПА (**табл. 1**).

Установлено незначительное снижение вязкости цельной крови и плазмы (с 1,88 ± 0,04 до 1,83 ± 0,04 и с 1,30 ± 0,05 до 1,23 ± 0,01, соответственно). Вероятно, столь малосущественные сдвиги вязкости крови можно обосновать некоторым увеличением жесткости эритроцитов (с 1,43 ± 0,02 до 1,46 ± 0,03) и нарастанием показателя гематокрита (с 0,44 ± 0,01 до 0,46 ± 0,01). Повышение жесткости эритроцитарных мембран мы связываем, во-первых, с моделированием последних при центрифугировании, а во-вторых, с тем, что в ответ на взятие крови (как на острую кровопотерю) из депо поступают «молодые» формы эритроцитов, обладающие большей жесткостью и, соответственно, меньшей деформируемостью.

Параллельно с нарастанием жесткости эритроцитов наблюдали и увеличение их кислотной стойкости, что так же можно объяснить реактивным

Таблица 2

Долгосрочные гемореологические эффекты у больных с острым ДВС-синдромом при лечении дискретным ПА (n=71)

Параметры	Исходные данные	На 5-е сутки	На 10-е сутки	Контроль
	1	2	3	4
Вязкость крови (о. е.)	1,79 ± 0,03	1,71 ± 0,02	1,67 ± 0,02	1,79 ± 0,01
$Pu_{1\text{-}2} > 0,05$; $Pu_{2\text{-}3} > 0,05$; $Pu_{1\text{-}3} <0,05$				
Вязкость плазмы (о. е.)	1,23 ± 0,01	1,22 ± 0,02	1,22 ± 0,01	1,18 ± 0,01
$Pu_{1\text{-}2} > 0,05$; $Pu_{2\text{-}3} > 0,05$; $Pu_{1\text{-}3} > 0,05$				
Ht	0,44 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,42 ± 0,01
$Pu_{1\text{-}2} > 0,05$; $Pu_{2\text{-}3} > 0,05$; $Pu_{1\text{-}3} < 0,05$				
Коэффициент жесткости эритроцитов	1,42 ± 0,02	1,38 ± 0,02	1,35 ± 0,01	1,30 ± 0,01
$Pu_{1\text{-}2} > 0,05$; $Pu_{2\text{-}3} > 0,05$; $Pu_{1\text{-}3} > 0,05$				
Спонтанная агрегация эритроцитов (у. е.)	1,75 ± 0,70	1,33 ± 0,76	1,5 ± 0,56	3,13 ± 0,36
$Pu_{1\text{-}2} > 0,05$; $Pu_{2\text{-}3} > 0,05$; $Pu_{1\text{-}3} > 0,05$				
Стимулированная агрегация эритроцитов (у. е.)	3,5 ± 0,39	1,83 ± 0,45	4,5 ± 0,43	5,73 ± 0,35
$Pu_{1\text{-}2} > 0,05$; $Pu_{2\text{-}3} > 0,05$; $Pu_{1\text{-}3} > 0,05$				
ИКС (у. е.)	8,83 ± 2,30	12,90 ± 2,99	16,75 ± 3,54	10,11 ± 1,55
$Pu_{1\text{-}2} >0,05$; $Pu_{1\text{-}3} > 0,05$; $Pu_{2\text{-}3} < 0,05$				

выходом «молодых» форм эритроцитов из депо, которые, как известно, обладают более высокой прочностью к воздействию кислотного гемолитика (*А. И. Воробьев, М. Д. Бриллиант 1961–1963*; *Г. П. Григорьев, В. В. Усынин 1991*). Кроме того, установлено, что сеанс ПА достоверно не влиял на величину агрегации эритроцитов, как спонтанной, так и стимулированной 5% раствором полиглюкина. Таким образом, мы пришли к выводу о необходимости выделения так называемых кратковременных гемореологических эффектов дискретного ПА: незначительного снижения вязкости цельной крови и плазмы, нарастания показателя гематокрита, а так же увеличения жесткости эритроцитарных мембран и их кислотной стойкости.

Подходя к вопросу о так называемых долгосрочных эффектах дискретного ПА, необходимо отметить, что для большего удобства оценки гемореологических сдвигов мы условно выделили три этапа: 1. начало лечения; 2. время завершения цикла лечения плазмаферезом (как правило, 5–6 день от начала лечения) и 3. отдаленные сроки (спустя 5 дней после завершения всех сеансов ПА). Вязкость крови, изначально не выходившая за пределы нормальных значений (1,79 ± 0,03), под влиянием сеансов ПА приобретала тенденцию к снижению, что прослеживалось вплоть до отдаленных сроков (с 1,71 ± 0,02 до 1,67 ± 0,02 на 5-й и 10-й дни, соответственно). Столь выраженную динамику снижения вязкости цельной крови, по-видимому, можно объяснить параллельным изменением других показателей: гематокрита, имевшего неуклонную тенденцию к понижению (от 0,44 ± 0,02 в начале лечения до 0,38 ± 0,01 в средние сроки и, наконец, до 0,33 ± 0,01 в отдаленный период); а так же умеренным снижением жесткости эритроцитов, которая до начала лечения превышала нормальные величины (в среднем 1,42 ± 0,02), а под влиянием лечения уменьшалась до 1,35 ± 0,01, так и не достигая нормы.

Разнонаправленные сдвиги в изменении жесткости эритроцитов, наблюдаемые нами непосредственно после сеанса ПА и в более отдаленные сроки, свидетельствуют, вероятно, о том, что эритроциты, взятые сразу же после ПА, содержали долю «молодых» форм, сохранивших первоначально «жесткие» свойства клеточной мембраны. Снижение уровня гематокрита мы связываем с периоперационной кровопотерей, компенсаторной гемодилюцией, а так же с большими объемами вводимых растворов. Довольно необычным сочли мы поведение такого показателя как вязкость плазмы. Несмотря на продолжительное лечение ПА, не было выявлено тенденции к ее изменению, в то время как предполагалось, что после курса сеансов экстракорпоральной гемокоррекции вязкость крови снизится. Между тем даже в отдаленные сроки этот показатель превышал предельно допустимые величины (**табл. 2**).

Довольно показательна динамика такого параметра, как стимулированная агрегация эритроцитов. Известно, что эритроцитарная мембрана, не нагруженная крупномолекулярными соединениями (такими как глобулины, фибриноген и пр.), дает высокие показатели агрегации в растворах декстранов (в нашем случае — в 5% растворе полиглюкина). Действительно этот показатель, изначально существенно сниженный (в среднем 3,5 ± 0,39), под влиянием нескольких сеансов ПА приобретал отчетливую тенденцию к увеличению, что, по нашему мнению, является закономерным эффектом воздействия экстракорпоральной гемокоррекции.

Весьма показательным влиянием дискретного ПА на гемореологию и микроциркуляцию является нарастание устойчивости эритроцитов к кислотному гемолизу, что выражалось в увеличении индекса кислотной стойкости от 8,83 ± 2,30 до 12,90 ± 2,99 в середине лечения и до 16,75 ± 3,54 в отдаленные сроки. Суммируя вышеизложенное, мы посчитали необходимым выделить так называемые «долгосрочные» эффекты дискретного ПА, а именно: снижение вязкости цельной крови и плазмы, понижение жесткости эритроцитов, увеличение их кислотной стойкости и стимулированной агрегации.

Группу сравнения составил 41 пациент с ДВС-синдромом, которым проводили стандартную терапию без дискретного ПА. Сравнительный анализ выявил различия в динамике гемореологических показателей, наиболее разительным из которых было разнонаправленное изменение индекса кислотной стойкости в исследуемых группах. Так, если в основной группе отмечали отчетливое увеличение кислотной стойкости под влиянием сеансов ПА (механизм этого явления описан выше), то в группе сравнения наблюдали неуклонное снижение ИКС, отдаленный результат которого составил 7,0 ± 1,5, что достоверно ниже нормальных значений. Снижение стойкости эритроцитов к кислотному гемолизу коррелировало с существенным, по сравнению с основной группой, снижением жесткости эритроцитов, что могло свидетельствовать о наличии в кровотоке большого количества «старых» эритроцитов, обусловленное отсутствием экзогенной стимуляции депо на пополнение кровотока более молодыми формами. Так же к отрицательным моментам стоит отнести отсутствие достоверно значимого нарастания стимулированной агрегации эритроцитов, величина которой в группе сравнения изначально была ниже нормальной, и которая после лечения без ПА так и не достигала нормальных значений. Этот факт может свидетельствовать о важнейшей роли экстракорпоральной гемокоррекции в плане удаления из плазмы крупномолекулярных молекул, «нагружающих» мембраны эритроцитов и способствующих развитию нарушений в системе микроциркуляции.

ВЫВОДЫ

1. Предложенный метод изучения кислотной стойкости эритроцитов позволяет быстро оценить важные параметры гемореологии и микроциркуляции, а определение ИКС крови целесообразно использовать в качестве лабораторного скрининга эффективности проводимой терапии синдрома ДВС с помощью ПА.
2. К кратковременным эффектам дискретного ПА следует отнести незначительное снижение вязкости цельной крови и плазмы, повышение показателя гематокрита, а так же увеличение жесткости эритроцитарных мембран и их кислотной стойкости.
3. К долгосрочным эффектам дискретного ПА относятся снижение вязкости цельной крови и плазмы, понижение жесткости эритроцитов, увеличение их кислотной стойкости и стимулированной агрегации, что является диагностическими ориентирами для оценки эффективности проводимого лечения и его контроля.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владыка А. С. Экстракорпоральная детоксикация при критических состояниях. — Автореф. дисс… д. м. н. — М., 1987. — 38 с.*
2. *Воробьев П. А. Прерывистый лечебный плазмаферез. — М.: Ньюдиамед, 1998. — 197 с.*
3. *Воробьев П. А. Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. — М., 1994.*
4. *Панченков Н. Р., Дюгеев А. Н. Диагностика острого ДВС-синдрома в условиях работы выездной реанимационной гематологической бригады//Клиническая и лабораторная диагностика. — 1997. — С. 50.*
5. *Фермилен Ж., Ферстрате М. Гемостаз/Пер. с франц. — М.: Медицина, 1984. — 192 с.*
6. *Ройтман Е. В. Интенсивная терапия острых нарушений гемостаза//Актуальные проблемы гемостаза. — Архангельск, 2001. — С. 34-39.*

7. Aschar F. S., Ratima R. B. Thyroid storm treatment with blood exchange and plasmapheresis//J Amer. Med. Ass. — 1970. — Vol. 214, №7. — P. 1275-1279.
8. Takeda K., Yumaushi H Effects of plasma exchange of acute pancreatitis//31st Congress Intern. Soc. Surgery. — Paris, 1985. — Abstracts. — P. 643.
9. Murano G., Williams I Some properties of antithrombin III and its concentration in human plasma//Thromb. Res. — 1980. — P. 259-262.
10. Leon M., Aiach M Antithrombin synthesis in parenchimal cells//Thromb. Res. — 1983. — Vol. 30. — P. 369-375.
11. Chan V., Chan T Antithrombin III in fresh and cultured human endothelial cells: A natural anticoagulant from the vascular ehdothelium |//Thromb. Res. — 1979. — Vol. 15. — P. 209-213.
12. Nordenmann B., Danielsson A The binding of low-affinity and high-affinity heparin and antithrombin. Fluorescence studies//Eur. J. Biochem. — 1978. — Vol. 90. — P. 1-6.
13. Vinazzer H Therapeutic use of antithrombin III in shok and disseminated intravascular coagulation.//Semin. Thromb. Hemost. — 1989. — Vol. 15. — P. 347-352.
14. Rosenberg R The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism//Hemostasis and Thrombosis. — 1994. — P. 837-860.
15. Hirsh J Guide to anticoagulant therapy Part 1: heparin//Circulation. — 1994. — Vol. 89. — P. 1449-1468.

Иммунолатексный диагностикум для определения антитромбина III в плазме крови человека

М. А. Розенфельд, В. Б. Леонова, М. И. Бирюкова, Е. А. Костанова, М. В. Васильева, В. А. Макаров, О. Е. Неведрова, А. А. Савин

Институт биохимической физики РАН, ГУ Гематологический научный центр РАМН, Московский Государственный медико-стоматологический университет, Москва, Россия

Immunolatex kit for antithrombin III determination in human plasma

M. A. Rozenfeld, V. B. Leonova, M. I. Biryukova, E. A. Kostanova, M. V. Vasileva, V. A. Makarov, O. E. Nevedrova, A. A. Savin

Institute of biochemical physics named by Emanuel RAS, Hematological Research Center RAMS, Moscow State Medical-stomatology university, Moscow, Russia

The purpose of present work consists in creation and approbation of the original immunolatex kit for antithrombin III determination in hemostasis pathology.

Key words: *antithrombin III — hemostasis — original immunolatex kit*

ВВЕДЕНИЕ

Антитромбин III (AT III) является одним из важнейших естественных антикоагулянтов, блокирующих в присутствии гепарина тромбин, фактор Ха, а также другие сериновые протеиназы, участвующие в свертывании крови: факторы XIIa, XIa, и IXa. На долю AT III приходится более 80% всей противосвертывающей активности крови. Дефицит AT III, как врожденный, так и приобретенный вследствие снижения его синтеза при тяжелых заболеваниях и повреждениях печени (острый гепатит, обструктивная желтуха, пересадка печени, цирроз, карцинома, хроническая печеночная недостаточность и т.д.) приводит к развитию тромбозов и отсутствию эффекта гепаринотерапии. Снижение уровня AT III в кровотоке также может возникнуть в результате его интенсивного потребления в процессе свертывания крови, например при диссеминированном внутрисосудистом свертывании (ДВС-синдром). Проблема своевременного и быстрого определения количественного содержания AT III в плазме крови больного является одной из первостепенных задач современной клинической диагностики. Уровень содержания AT III в крови в норме составляет 235±25 мкг/мл, у больных он может снижаться на 25–50% [1, 2]. В основном в клинико-лабораторной практике применяют непрямые (косвенные) способы определения содержания AT III в плазме крови, основанные на оценке активности AT III, которая определяется по остаточной активности стандартного препарата тромбина после его инактивации АТ III-гепариновым комплексом. В повседневной лабораторной практике субстратом для такого тромбина обычно является фибриноген, об активности АТ III судят по времени образования фибрина. Активность АТ III выражается в процентах, за 100% принимается активность пула плазмы доноров. У здоровых людей активность АТ III, определяемая таким способом, колеблется от 85 до 115% [3]. Более точное определение антитромбиновой активности плазмы осуществляется при использовании строго специфичного к тромбину низкомолекулярного хромогенного субстрата [4]. Известны способы прямого количественного (мкг/мл) определения содержания АТ Ш в плазме крови: метод радиальной иммунодиффузии; иммуноферментный способ обнаружения АТ Ш в плазме крови; ракетный иммуноэлектрофорез [5]; а также способ лазерной нефелометрии, при котором образование иммунных комплексов АТ Ш со специфическими к нему антителами протекает в растворе, что сопровождается увеличением светорассеяния [6]. Перечисленные способы определения АТ Ш в отечественной медицинской практике применяются редко из-за необходимости при выполнении тестов применения дорогостоящего импортного оборудования, реактивов, а также из-за трудоемкости и длительности выполнения.

Авторами ранее был успешно разработан и создан ряд иммунолатексных диагностикумов нового поколения для выявления ДВС-синдрома, мужского бесплодия, ревматоидного артрита путем количественного определения содержания в биологических жидкостях белков — маркеров возникновения и развития этих заболеваний [7, 8].

Целью настоящей работы явилась разработка экспресс-метода определения концентрации АТ Ш в плазме крови человека путем создания иммунолатексного диагностикума с использованием принципиально нового способа иммобилизации специфичных антител на поверхность сферических частиц карбоксилированного полистирольного латекса [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

АТ III был получен методом аффинной хроматографии из плазмы донорской крови. В качестве аффинного сорбента использовали гепарин-сефарозу. Для дополнительной очистки АТ III после аффинной хроматографии применяли ионообменную хроматографию на DEAE-Toyperl 650M и гель-фильтрацию на сефадексе G-200 [4]. Полученный препарат АТ III был электрофоретически гомогенен. Концентрацию АТ III определяли спектрофотометрически (коэффициент экстинции E_{280}-0,6). Активность АТ III контролировали по его способности ингибировать амидолитическую активность тромбина. При создании иммунолатексного диагностикума использовали коммерческие моноклонапьные антитела к АТ III (Sigma, USA), реагирующие как с очищенным препаратом АТ III, так и АТ III, содержащимся в плазме крови человека.

Создание иммунодиагностикума состоит из нескольких этапов.

1. Получение полистирольной латексной суспензии с иммобилизованными на его поверхность моноклональными антителами к антитромбину III. Иммобилизацию антител к АТ III на поверхность карбоксилированного полистиролового латекса проводили следующим образом. К 1 мл 2% суспензии карбоксилированного полистиролового латекса (диаметром 0,5 мкм) в глициновом буфере, содержащем 0,15 М NaC1, 0,02% азида натрия при pH 8,2, добавляли равный объем раствора антител к АТ Ш в том же буфере, с концентрацией 250 мкг/мл, тщательно встряхивали и помещали в термостат при 37°С на 120 минут. С целью насыщения центров связывания на поверхность латексных частиц к суспензии добавляли в качестве балластного белка 2 мл 0,04% раствора α-казеина. Латексную суспензию тщательно встряхивали, оставляли при комнатной температуре на 30 минут и помещали в холодильник на 24 часа. Через сутки иммунодиагностикум был готов. Концентрация полистирольного латекса в диагностикуме составляла 0,5%, иммобилизованных антител — 62,5 мкг/мл, а α-казеина — 200 мкг/мл.

2. Определение чувствительности диагностикума. Определение проводили на стекле. Раствор стандартного препарата АТ III в глициновом буфере pH 8,2 с концентрацией 300 мкг/мл предварительно титровали кратно двум в том же буферном растворе. По 10 мкл каждого разведения плазмы переносили на стекло и к ним добавляли равный объем (10 мкл) латексной суспензии, тщательно перемешивали стеклянной палочкой. Реакцию учитывали визуально через 2–3 минуты. При положительной реакции латексные частицы склеиваются между собой, и в капле образуется зернистость. При отрицательной реакции склеивания частиц не происходит: капля состоит из однородной взвеси латексных частиц, напоминая молоко. В контрольной (отрицательной) пробе АТ III заменяли буфером. Чувствительность диагностикума определяется как произведение титра реакции, т.е. тем разведением стандартного препарата АТ III, которое дает последнюю положительную реакцию с иммунолатексной суспензией, на исходную концентрацию АТ III. Расчет чувствительности: титр реакции — 1: 64; исходная концентрация АТ III — 300 мкг/мл; чувствительность определения 1/64×300 = –5 мкг/мл.

3. Разработка регламента количественного определения АТ Ш в плазме крови человека. Определение проводили в бедной тромбоцитами плазме крови. Исходный образец разбавляли в 10 раз (к 0,1 мл плазмы добавляли 0,9 мл буфера); затем делали дробные полуторократные разведения: 1: 1,5; 1: 2,25 и т.д. Далее по 10 мкл каждого разведения переносили на стекло и добавляли по 10 мкл суспензии полистиролового латекса, на поверхность которого были иммобилизованы моноклональные антитела к АТ III, тщательно перемешивали стеклянной палочкой и наблюдали за развитием реакции агглютинации в течение 2–3 минут, непрерывно покачивая пластину. Для контроля делали заведомо отрицательную пробу, в которой образец плазмы заменяли рабочим буфером. Для более точного определения содержания АТ III в образце плазмы крови последнее разведение дополнительно разбавляли в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 раза. После окончания реакции определяли последнее разведение, еще дающее агглютинацию, и вычисляли концентрацию АТ III (С) как произведение общего разведения образца на чувствительность диагностикума:

$C = a \times bn \times c \times s$, где a — исходное разбавление плазмы крови, в данном случае равное 10; b — 1,5; n — число полуторократных разведений плазмы крови; c — дополнительное разведение; s — чувствиительность диагностикума, в данном случае равная 5 мкг/мл.

Для сопоставления полученных результатов определения концентрации АТ III иммунолатексным диагностикумом в исследуемых образцах плазмы крови определяли активность АТ III с помощью набора, содержащим хромогенный субстрат, фирмы Behring, а также с результатами прямого количественного определения содержания АТ III в плазме крови методом радиальной иммунодиффузии [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные по количественному содержанию АТ III в плазме крови доноров приведены в таблице 1. Для сравнения представлены также результаты исследования АТ III, полученные при использовании набора для определения активности АТ III на хромогенном субстрате и прямого количественного измерения содержания АТ III в плазме крови методом радиальной иммунодиффузии, также указывается время выполнения тестов.

Таблица 1

Определение активности АТ III в плазме крови здоровых доноров различными способами

Методики	Концентрация АТ III	Время выполнения теста (минуты)
АТ III-латтест, мкг/мл (чувствительность 5,0 мкг/мл)	233,0±21	2-3
Behring,%	103,1±3,3	20
Радиальная иммунодиффузия, мкг/мл (чувствительность 5,0 мкг/мл)	232,0±23	18
Коэффициент корреляции	> 0,5	

При исследовании плазмы крови здоровых доноров содержание АТ III в плазме крови, определенное с помощью иммунолатексного диагностикума, составило в среднем 233 мкг/мл, что соответствует 100,0±0,5%. Учитывая, что 100% активности АТ III соответствуют содержанию 235 мкг/мл АТ III в плазме крови, приведенные в таблице данные указывают на хорошую корреляцию предлагаемого способа с известными применяемыми в клинико-лабораторной и научно-исследовательской практике.

При определении АТ III в плазме крови больных, страдающих ДВС-синдромом, наблюдали достоверное снижение АТ III. Для исследований использовали плазму больных с диагнозом: вторичный гнойный рецидивирующий менингит. Результаты приведены в **таблице 2**. ДВС-синдром верифицирован по известным клиническим и лабораторным критериям.

Приведенные данные показывают, что определяемое предлагаемым способом содержание АТ III в плазме крови больных значительно ниже нормы (124–169 мкг/мл), что коррелирует с результатами,

Таблица 2

Определение АТ III в плазме крови больных

Методики	Концентрация АТ III
АТ III-латтест, мкг/мл	146,6 ±10,5
Behring,%	64,4±4,9
Радиальная иммунодиффузия, мкг/мл	156,0±11,5
Коэффициент корреляции	>0,5

полученными при использовании методов радиальной иммунодиффузии, и набора, содержащего хромогенный субстрат (фирмы Behring).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно сделать вывод о возможности использования полученного иммунолатексного диагностикума для количественного определения АТ III в плазме крови в клинико-лабораторной практике. Кроме того, сопоставляя предлагаемый способ с другими, можно отметить, что он обладает совокупностью положительных качеств, таких как: высокая чувствительность, строгая специфичность, быстрота выполнения, возможность регистрации результатов визуально, без использования специального дорогостоящего оборудования. Каждый в отдельности из перечисленных признаков присутствует в применяемых в клинико-лабораторной практике способах, но комплексом этих признаков обладает только предлагаемый иммунолатексный метод.

В заключение хотелось бы отметить, что в случае доведения предлагаемого иммунолатексного диагностикума до серийного производства можно надеяться на то, что диагностический набор, содержащий полностью все необходимое для анализа содержания АТ III, найдет применение не только в специализированных клинических учреждениях, но и в диагностических центрах, поликлиниках, в полевых условиях, при проведении профилактических осмотров и др., когда остро возникает проблема экспресс-диагностики возможности развития коагулопатии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Баркаган З. С., Момот А. П. Основы диагностики нарушений гемостаза. — М.: Ньюдиамед-АО, 1999.*
2. *Лычев В. Г. Диагностика и лечение диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. — Н. Новгород: НГМА, 1998.*
3. *Баркаган З. С., Макаров В. А., Лычов В. Г. Новые методы лабораторной диагностики диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрома). — М: Метод. Рекомендации, 1989.*
4. *Andersson T., Mowinckel M-C., Abilgaard U. et al. Thrombin-inhibitor complexes in the blood//Thrombos. Res. — 1996.*
5. *Энциклопедия клинических лабораторных тестов/Под ред. Н. Тица (пер. с англ.). — М.: Лаб. Информ., 1997.*
6. *Antovic J., Sodersrom J., Karlman B., Blomback M. Evalucion of new immunoturbidimetric test for determination of antithrombin antigen//Clin. Lab. Haematology. — 2001. — Vol. 23. — P. 313-316.*
7. *Розенфельд М. А, Леонова В. Б., Бирюкова М. И. и соавт. Иммунолатексный диагностикум нового поколения для выявления диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрома) и тромбозов//Тромбоз, гемостаз и реология. — 2005. — № 3. — С. 20-24*
8. *Леонова В. Б., Розенфельд М. А. Иммунодиагностикум на основе полистирольного латекса. — Патент РФ № 2231366 от 27 июня 2004 г.*
9. *Розенфельд М. А., Леонова В. Б., Костанова Е. А., Васильева М. В Способ определения концентрации антитромбина III в плазме крови. — Патент РФ № 2262109 от 10 октября 2005 г.*

Состояние гемостаза и перекисного окисления липидов при лапароскопических операциях на придатках матки

А. Л. Чернова, Е. А. Винокурова, Н. Б. Баклаева
ГОУ ВПО Тюменская государственная медицинская академия Минздрава РФ

Hemostasis and lipid peroxidation at laparoscopy on adnexa

A. L. Chernova, E. A. Vinokurova, N. B. Baklaeva
State Medical Academy of Ministry of Health of Russian Federation, Tyumen

We have studied coagulation and thrombocyte hemostasis, lipid peroxidation and antioxidative activity in 132 patients undergoing laparoscopy of adnexes. We have found that laparoscopy was a cause of hemocoagulative changes in gynecological patients: thrombocytes activity raised that brought thrombine-fibrinogenum over to speed-up co-operation, achieving a degree causing second hypocoagulation. It was shown that changes in indexes of hemocoagulation and thrombocytes positively correlated with intensification of lipid peroxidation processes. The depth of hemostasis changes can be limited, complementing ordinary (traditional) medical measures by setting of complex antioxidant of «Selmevit» that limited the activation of lipid peroxidation and was instrumental in more rapid renewal of indexes and coagulation hemostasis to the pre-operational values.

Keywords: *laparoscopy — hemostasis — lipid peroxidation — antioxidants.*

ВВЕДЕНИЕ

Частота осложнений и летальных исходов при хирургической лапароскопии выше, чем после традиционных вмешательств, что связывают с тромбоэмболическими осложнениями [5, 11, 14, 24]. Эти наблюдения, а также данные об активации гемостаза, достигающей степени хронического ДВС-синдрома [18], отсутствие клинической манифестации тромбогеморрагических осложнений у части пациенток, их более позднее проявление в виде стойкого посттромботического поражения вен и хронической венозной недостаточности нижних конечностей с развитием посттромбофлебитического синдрома [8, 21], а также малая эффективность разнообразных профилактических мероприятий [3, 16] побудили нас к изучению коагуляционной и тромбоцитарной компонент гемостаза у гинекологических больных до и после выполнения лапароскопических операций.

Сведения о взаимосвязи гемостаза с липопероксидацией [6, 17], экспериментальные и клинические наблюдения, установившие, что антиоксиданты (в том числе антиоксиданты-витамины) ограничивают гемостатические сдвиги [6, 7], определили необходимость одновременного изучения липопероксидации (ЛПО). Сведения о положительном влиянии антиоксидантов на гемостаз при гипероксидации [12, 19] указали на целесообразность изучения способности антиоксидантного витаминного комплекса «Селмевит» корригировать нарушения гемостаза при лапароскопических операциях.

Целью нашего исследования явилось изучение состояния коагуляционного компонента гемостаза, морфофункциональных свойств тромбоцитов и ЛПО у гинекологических больных до и после выполнения лапароскопических операций на придатках матки и оценка целесообразности коррекции гемостатических сдвигов Селмевитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 152 женщин, из которых 132 подверглись лапароскопическим вмешательствам на придатках матки. Традиционное лечение получали 79 пациенток (группа сравнения), дополнительно к традиционному лечению получали Селмевит 53 женщины (основная группа). Лабораторные исследования были выполнены также у 20 здоровых женщин детородного возраста (контрольная группа).

Клиническое и лабораторное обследование проводили за день до операции, на 1, 3–4 и 5–7 сутки после нее. Клиническое обследование включало изучение жалоб, анамнеза заболевания и жизни, гинекологического и акушерского анамнеза, общий осмотр и специальное гинекологическое обследование, бактериоскопию отделяемого цервикального канала, влагалища и уретры, УЗИ органов малого таза.

Тромбоцитарный гемостаз оценивали, определяя: 1) количество тромбоцитов; 2) распределение форм тромбоцитов (дискоциты, дискоэхиноциты, сфероэхиноциты, сфероциты), число и размеры агрегатов в пересчете на 100 свободных клеток, и количество агрегатообразующих тромбоцитов на 500 свободных клеток, число агрегатообразующих или вовлеченных в агрегаты тромбоцитов (на 500 свободных клеток); число малых агрегатов (по 2–3 тромбоцита на 100 свободных клеток) и больших агрегатов (по 4 и более клеток на 100 свободных клеток) [20].

Оценивая коагуляционный гемостаз, определяли: 1) активированное время рекальцификации (АВР) [9]; 2) активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) [4]; 3) протромбиновое время, выражая результат через протромбиновое отношение (ПО) и международное нормализованное отношение (МНО) [4]; 4) концентрацию фибриногена по Р. А. Рутберг [4]; 5) растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК) — количественно (ортофенантролиновый тест) [4]; 6) продукты деградации фибрина (ПДФ) [2]; 7) противосвертывающий потенциал крови — по активности антитромбина III (AT III) [4]; 8) индекс резерва плазминогена (ИРП), используя реагенты фирмы «Технология-Стандарт», Барнаул [4]; 9) фактор P_3 [1].

Интенсивность липопероксидации оценивали по содержанию первичных (диеновых коньюгат — ДК) и вторичных (малонового диальдегида — МДА) липопероксидов [15]. Об антиоксидантном потенциале (АОП) судили по содержанию витамина Е в эритроцитах [13].

Результаты подвергали математической обработке методом вариационной статистики для малых рядов наблюдений с вычислением M, m, σ. Для определения достоверности отличий вычисляли доверительный коэффициент Стъюдента (t) и величину вероятности (p). Различия считали достоверными при $p <0,05$. Для изучения парной корреляционной зависимости определяли коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (r_s).

В исследованиях использовали Селмевит (регистрационный номер 2000/114/8, производитель «УфаВит»), который назначали по одной таблетке в день в течение 14 суток до и после операции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По клинико-анамнестической характеристике наблюдавшиеся группы женщин были идентичными и сопоставимыми. Анализ социально-демографических показателей, структуры соматических и гинекологических заболеваний, показаний и объемов выполненных операций показал отсутствие достоверных различий в группах, получавших традиционное лечение и принимавших дополнительно Селмевит.

Сходство основной и группы сравнения позволило уже при оценке течения операции и раннего послеоперационного периода выявить важные моменты: 1) на 6,08% ($p <0,05$) сократилась продолжительность операции у женщин основной группы и на 8,2% уменьшился объем кровопотери; 2) тромбогеморрагические осложнения в группе сравнения составили 5,06% (4 из 79), в основной их не было. Учитывая взаимосвязь гиперкоагуляционных сдвигов и тромбоэмболий [4, 10], можно на основании этих данных говорить о позитивной роли назначения Селмевита. К позитивным эффектам можно отнести и небольшое снижение интраоперационной кровопотери, выявленное у женщин, получавших Селмевит.

Состояние тромбоцитарного гемостаза перед операцией у женщин в группе сравнения характеризовалось активацией тромбоцитов, проявляющейся увеличением числа малых и больших агрегатов и тенденцией к повышению содержания фактора P_3. При дополнении традиционных предоперационных мероприятий назначением Селмевита признаки активации тромбоцитов не определялись (**табл. 1**).

У женщин в группе сравнения на 1 сутки после операции выявили снижение числа дискоцитов (Д) и повышение количества сфероэхиноцитов (СЭ), увеличение ЧАО, ЧМА, ЧБА и ЧА, фактора P_3 (**табл. 2**). Достоверно значимые изменения числа Д и сфероцитов (С), ЧБА, фактора P_3 по сравнению с показателями до операции сохранялись до 3–4 дня после операции, а СЭ, ЧАО — до 5–7 суток.

При дополнении традиционной терапии назначением Селмевита динамика показателей тромбоцитарного гемостаза имела такую же направленность, как и в группе сравнения, однако была менее выраженной. С 3–4 дня после операции достоверных различий показателей тромбоцитарного гемостаза по сравнению с предоперационными данными мы не установили (**табл. 3**).

За сутки до операции параметры состояния коагуляционного гемостаза у женщин в группе сравнения и в основной группе были такими же, как у здоровых женщин детородного возраста (**табл. 1**).

В послеоперационном периоде у женщин в группе сравнения ускорялось взаимодействие

Таблица 1.

Параметры тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности до лапароскопических операций на придатках матки на фоне применения Селмевита и без него (M+m)

Показатели	Здоровые женщины (*n=20*)	Традиционное лечение (*n=30*)	Традиционное лечение + Селмевит (*n=20*)
Тромбоциты ($\times 10^9$/л)	248,5 ± 5,4	366,5 ± 16,9 *	258,9 ± 10,7 #
Д (%)	46,5 ± 0,9	46,6 ± 1,9	51,6 ± 2,1
ДЭ (%)	24,9 ± 0,6	27,7 ± 1,5	22,0 ± 1,1 #
С (%)	18,0 ± 0,5	19,9 ± 0,8	18,9 ± 1,1
СЭ (%)	9,4 ± 0,3	10,2 ± 0,4	8,2 ± 0,7 #
ЧАО (на 500 клеток)	53,5 ± 0,9	48,3 ± 3,3	48,4 ± 2,2
ЧМА (на 100 клеток)	7,7 ± 0,7	17,5 ± 1,6 *	9,2 ± 1,5 #
ЧБА (на 100 клеток)	1,0 ± 0,1	2,9 ± 0,4 #	0,5 ± 0,2 #
ЧА (на 100 клеток)	8,7 ± 0,8	20,4 ± 2,0 #	9,7 ± 1,7 #
Фактор P_3 (%)	31,5 ± 2,8	37,7 ± 3,1	34,4 ± 3,8
АВР (сек.)	59,0 ± 2,6	56,5 ± 3,0	65,4 ± 3,2
АЧТВ (сек.)	40,6 ± 1,3	39,6 ± 1,4	41,2 ± 1,8
ТВ (сек.)	18,5 ± 0,6	19,4 ± 1,3	20,7 ± 1,1
ПО	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,1
МНО	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,1
ФГ (г/ л)	2,5 ± 0,2	2,7± 0,1	2,9 ± 0,2
РФМК (мг/100 мл)	3,5 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,4 ± 0,2
ПДФ (мг%)	0,547 ± 0,02	0,572 ± 0,01	0,557 ± 0,01
АТ III (%)	95,1 ± 2,7	93,1 ± 4,2	100,1 ± 5,1
ИРП (%)	109,4 ± 3,7	99,7 ± 3,2	102,7 ± 4,7
ДК (нмоль/мл)	110,3 ± 3,4	113,5 ± 3,8	112,8 ± 3,6
МДА (нмоль/мл)	10,4 ± 0,5	11,1 ± 0,4	10,9 ± 0,4
Витамин Е (нмоль/мл) (нмоль/мл), нмоль/мл ннннннмоль/млнмоль/мл	4,6 ± 0,3	4,5 ± 0,2	4,4 ± 0,2

*Примечание: АВР — активированное время рекальцификации; АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время; ТВ — тромбиновое время; ПО — протромбиновое отношение; МНО — международное нормализованное отношение; ФГ — фибриноген; РФМК — растворимые фибрин-мономерные комплексы; ПДФ — продукты деградации фибрина; АТ III — антитромбин III; ИРП — индекс резерва плазминогена; Д — дискоциты; ДЭ — дискоэхиноциты; С — сфероциты; СЭ — сфероэхиноциты; ЧАО — число агрегатообразующих тромбоцитов; ЧМА — число малых агрегатов по 2-3 тромбоцита на 100 свободных клеток; ЧБА — число больших агрегатов по 4 тромбоцита и более на 100 свободных клеток; ЧА — суммарное число ЧМА и ЧБА на 100 свободных клеток; фактор Р3- тромбоцитарный фактор 3; ДК — диеновые коньюгаты; МДА — малоновый диальдегид; * р <0,05- различия достоверны по сравнению с показателями у здоровых женщин; # р <0,05- различия достоверны по сравнению с показат елями в группе сравнения.*

тромбин-фибриноген (рост РФМК, ПДФ), изменялась общая свертывающая активность крови (сдвиги АВР, АЧТВ, ПО, МНО, ТВ, АТ III), снижался резерв плазминогена, что особенно было выражено было через сутки, и в меньшей мере — на 5–7 сутки после операции (**табл. 2**)

У женщин основной группы динамика показателей, характеризующих коагуляционный гемостаз, после операции имела ту же направленность, но была менее выраженной (**табл. 3**). Достоверные сдвиги показателей АВР, ТВ, ПО, МНО, АТ III и ИРП сохранялись до 3–4 дня после операции. На 5–7 сутки все показатели не отличались от таковых у здоровых женщин.

По завершении предоперационной подготовки у больных с показаниями к вмешательству на придат-

Таблица 2.

Параметры тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности при традиционном лечении (M+m)

Показатели	До операции (*n=30*)	1 сутки (*n=40*)	3–4 сутки (*n=40*)	5–7 сутки (*n=20*)
Тромбоциты ($\times10^9$/л)	366,5 ± 16,9	397,9 ± 16,1	397,5 ± 21,0	322,3 ± 26,4
Д (%)	46,6 ± 1,9	38,9 ± 1,8*	40,3 ± 1,1*	42,4 ± 1,6
ДЭ (%)	27,7 ± 1,5	26,4 ± 0,9	25,1 ± 0,9	25,3 ± 1,3
С (%)	19,9 ± 0,8	21,5 ± 0,7	22,1 ± 0,7*	21,4 ± 0,8
СЭ (%)	10,2 ± 0,4	11,4 ± 0,3*	12,7 ± 0,4*	12,2 ± 0,5*
ЧАО (на 500 клеток)	48,3 ± 2,3	57,8 ± 1,7*	58,6 ± 1,2*	57,6 ± 1,6*
ЧМА (на 100 клеток)	17,5 ± 1,6	22,7 ± 1,6*	21,5 ± 1,7	15,7 ± 2,5#
ЧБА (на 100 клеток)	2,9 ± 0,4	4,4 ± 0,5*	4,1 ± 0,4*	2,9 ± 0,5#
ЧА (на 100 клеток)	20,4 ± 2,0	27,1 ± 2,1*	25,6 ± 2,1	18,6 ± 3,0#
Фактор P_3 (%)	37,7 ± 3,1	56,7 ± 3,2*	48,9 ± 4,1*	42,8 ± 3,6#
АВР (сек.)	56,5 ± 3,0	66,9 ± 3,3*	70,2 ± 3,8*	63,4 ± 4,6
АЧТВ (сек.)	39,6 ± 1,4	47,2 ± 1,8*	45,6 ± 2,7	49,3 ± 2,4*
ТВ (сек.)	19,4 ± 1,3	23,1 ± 1,6	23,9 ± 2,4	22,6 ± 1,4
ПО	1,5 ± 0,2	2,2 ± 0,2*	2,3 ± 0,3*	2,2 ± 0,3
МНО	1,6 ± 0,2	2,3 ± 0,3*	2,4 ± 0,3*	2,3 ± 0,3
ФГ (г/ л)	2,7 ± 0,1	3,4 ± 0,2*	3,0 ± 0,2	2,8 ± 0,3
РФМК (мг/100 мл)	3,3 ± 0,2	4,6 ± 0,3*	4,2 ± 0,2*	4,7 ± 0,5*
ПДФ (мг%)	0,57 ± 0,01	0,640 ± 0,01*	0,62 ± 0,02*	0,57 ± 0,01
AT III (%)	93,1 ± 4,2	77,3 ± 3,8*	78,7 ± 3,5*	81,3 ± 4,7*
ИРП (%)	99,7 ± 3,2	70,1 ± 3,5*	72,2 ± 3,8*	72,7 ± 5,0*
ДК (нмоль/мл)	113,5 ± 3,8	124,5 ± 3,7*	123,4 ± 3,2*	118,6 ± 4,1
МДА (нмоль/мл)	10,9 ± 0,4	12,6 ± 0,4*	12,0 ± 0,5*	11,4 ± 0,3
Витамин Е (нмоль/мл)	4,5 ± 0,2	4,0 ± 0,1*	4,2 ± 0,2	4,4 ± 0,3

*Примечание: * p≤0,05- различия достоверны по сравнению с показателями до операции; # p≤0,05- различия достоверны по сравнению с первыми сутками после операции.*

ках матки параметры ЛПО и АОП не были изменены (**табл. 1**). В послеоперационном периоде у женщин в группе сравнения и в основной группе отмечали повышение содержания ДК и МДА, что свидетельствовало об активизации ЛПО. Одновременно снижалось содержание витамина Е.

В группе сравнения различия в уровне ДК и МДА сохранялись до 3–4 дня после операции, а на 5–7 сутки показатели приближались к предоперационным (**табл. 2**); в основной группе уже на 3–4 сутки послеоперационного периода те же величины достоверно не отличались от дооперационных (**табл. 3**).

Параметры ЛПО и АОП находились в тесной корреляционной связи со значениями коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза. У женщин в группе сравнения установлена высокая степень корреляционной зависимости содержания продуктов ЛПО со значениями ТВ, ПДФ, AT III, ИРП, ЧАО, ЧА, уровнем фактора P_3 и количеством тромбоцитов. Взаимосвязь МДА, ДК с МНО оценивалась как средней степени, с АЧТВ — как слабая. Между уровнем витамина Е и ТВ, ПДФ, AT III, ИРП, ЧАО, ЧА, фактором P_3 и количеством тромбоцитов существовала сильная корреляционная связь, МНО — средней степени, АЧТВ — слабая.

У женщин в основной группе определялась высокая степень корреляционной связи первичных продуктов ЛПО с ТВ, МНО, ПДФ, AT III, ИРП, уровнем фактора P_3; средней степени — с числом тромбоцитов и ЧАО; слабая — с АЧТВ и ЧА. Связь МДА с ТВ, ИРП, ЧА, фактором P_3 оценивалась как сильная; с ПДФ — как средней степени; с АЧТВ, МНО, количеством тромбоцитов и ЧАО — как очень слабая. Между уровнем витамина Е и значениями ТВ,

Таблица 3.

Параметры тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности на фоне приема Селмевита (M+m)

Показатели	До операции (*n=20*)	1 сутки (*n=20*)	3–4 сутки (*n=20*)	5–7 сутки (*n=20*)
Тромбоциты ($\times 10^9$/л)	258,9 ± 10,7	317,4 ± 17,2*	258,5 ± 19,7	275,6 ± 17,3
Д (%)	51,6 ± 2,1	45,6 ± 1,7*	49,0 ± 1,2	52,6 ± 1,3#
ДЭ (%)	22,0 ± 1,1	23,5 ± 1,0	24,3 ± 1,5	24,0 ± 0,7
С (%)	18,9 ± 1,1	17,9 ± 1,2	20,5 ± 1,0	16,9 ± 0,7
СЭ (%)	8,2 ± 0,7	10,3 ± 0,5*	9,2 ± 0,6	9,1 ± 0,5
ЧАО (на 500 клеток)	48,4 ± 2,2	54,6 ± 1,8*	52,0 ± 1,7	47,6 ± 1,3#
ЧМА (на 100 клеток)	9,2 ± 1,5	9,8 ± 0,7	13,4 ± 1,6	6,6 ± 0,6#
ЧБА (на 100 клеток)	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,3	1,0 ± 0,3
ЧА (на 100 клеток)	9,7 ± 1,7	10,7 ± 1,0	14,5 ± 2,1	7,6 ± 0,2#
Фактор P_3 (%)	34,4 ± 3,8	50,3 ± 3,5*	39,6 ± 3,2	35,1 ± 3,4#
АВР (сек.)	65,4 ± 3,2	75,1 ± 3,5*	82,3 ± 6,2*	71,5 ± 3,4
АЧТВ (сек.)	41,2 ± 1,8	43,4 ± 1,7	43,6 ± 1,6	44,3 ± 1,8
ТВ (сек.)	20,7 ± 1,1	27,0 ± 2,4*	26,6 ± 0,4*	22,7 ± 1,7
ПО	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,2*	2,2 ± 0,2*	1,6 ± 0,2
МНО	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,2*	2,4 ± 0,3*	1,7 ± 0,2
ФГ (г/ л)	2,9 ± 0,2	3,1 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,4 ± 0,2
РФМК (мг/100 мл)	3,4 ± 0,2	4,3 ± 0,2*	3,7 ± 0,2	3,6 ± 0,1
ПДФ (мг%)	0,57 ± 0,01	0,608±0,020*	0,578 ± 0,01	0,566 ± 0,01
АТ III (%)	100,1 ± 5,1	85,5 ± 4,1*	83,3 ± 4,4*	93,2 ± 4,5
ИРП (%)	102,7 ± 4,7	76,6 ± 4,1*	80,1 ± 6,0*	96,5 ± 5,3
ДК (нмоль/мл)	112,8 ± 3,6	122,9 ± 3,4*	118,3 ± 3,7	115,1 ± 3,9
МДА (нмоль/мл)	10,9 ± 0,4	12,1 ± 0,3*	11,5 ± 0,4	11,1 ± 0,2
Витамин Е (нмоль/мл)	4,4 ± 0,2	4,1 ± 0,3	4,3 ± 0,2	4,6 ± 0,4

*Примечание: * $p \leq 0,05$- различия достоверны по сравнению с показателями до операции; # $p \leq 0,05$- различия достоверны по сравнению с первыми сутками после операции.*

ПДФ, ЧАО, количеством тромбоцитов, фактором P_3 существовала сильная корреляционная связь; МНО и АТ III — средней степени; АЧТВ — слабая; ЧА — как очень слабая.

Взаимосвязь уровня первичных и вторичных продуктов ЛПО, а также содержания витамина Е, с важнейшими показателями ВТФ — РФМК и ПДФ в контрольной и основной группах иллюстрируют **рисунки 1** и **2**.

Степень прироста содержания продуктов ЛПО (ДК и МДА), будучи сходной в обеих группах через сутки после операции, была значительно ниже на 3–4 сутки у основной группы. К 5–7 суткам у женщин в группе сравнения прирост оставался достаточно заметным, а у женщин в основной группе — минимальным. Уровень витамина Е падал в группе сравнения весьма существенно, в основной группе — менее заметно, а к 5–7 суткам оказывался выше предоперационного. Следовательно, интенсивность ЛПО и степень снижения АОП у женщин, получавших Селмевит, была заметно ниже. Важно, что это сочеталось с ослаблением прироста содержания продуктов взаимодействия тромбин-фибриноген: содержание как РФМК, так и ПДФ прирастало на фоне приема Селмевита в меньшей степени.

Степень активации тромбоцитов столь же заметно зависела от интенсивности гипероксидационных сдвигов (**рис. 3**). На фоне приема Селмевита у женщин основной группы прирост числа тромбоцитарных агрегатов был существенно ниже через сутки и особенно — через 3–4 дня после операции. Содержание фактора P_3 у женщин основной группы было ниже во все сроки после операции, а на

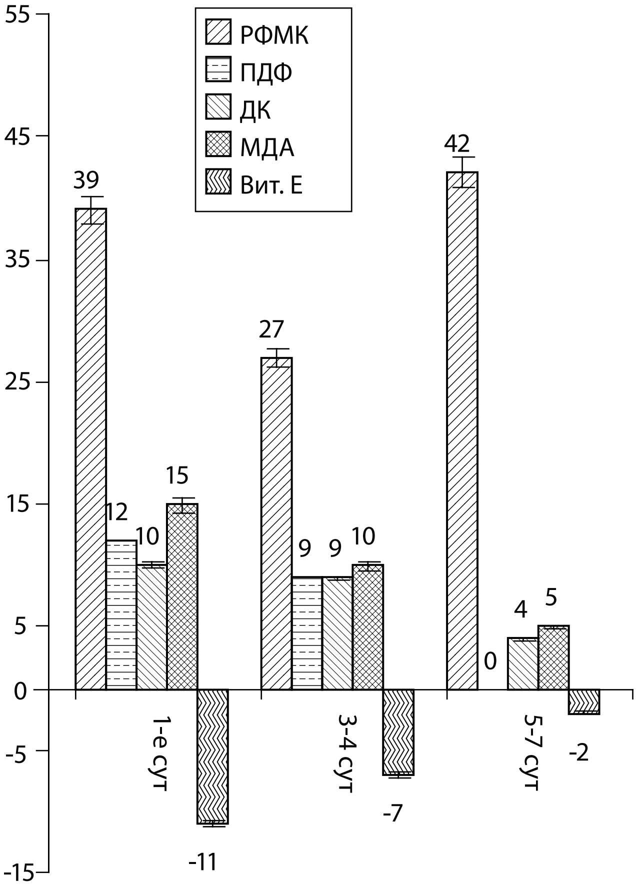

Рис. 1. Динамика РФМК, ПДФ, ДК, МДА и витамина Е (в% к значениям перед операцией) при традиционном лечении в разные сроки после операции.

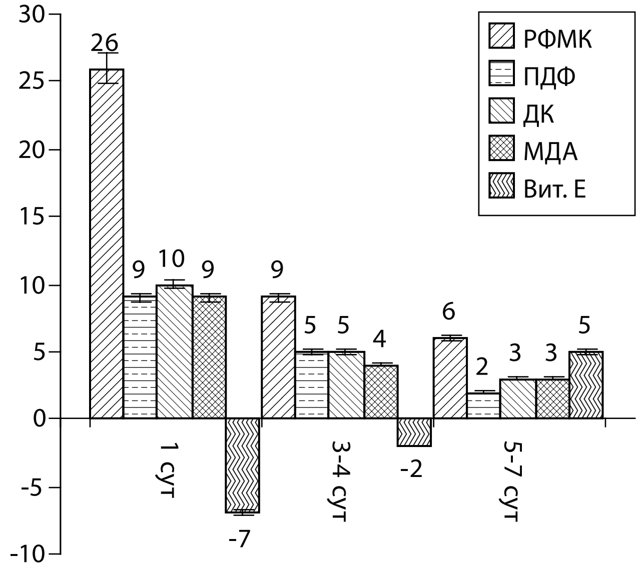

Рис. 2. Динамика РФМК, ПДФ, ДК, МДА и витамина Е (в% к значениям перед операцией) основной группы в разные сроки после операции.

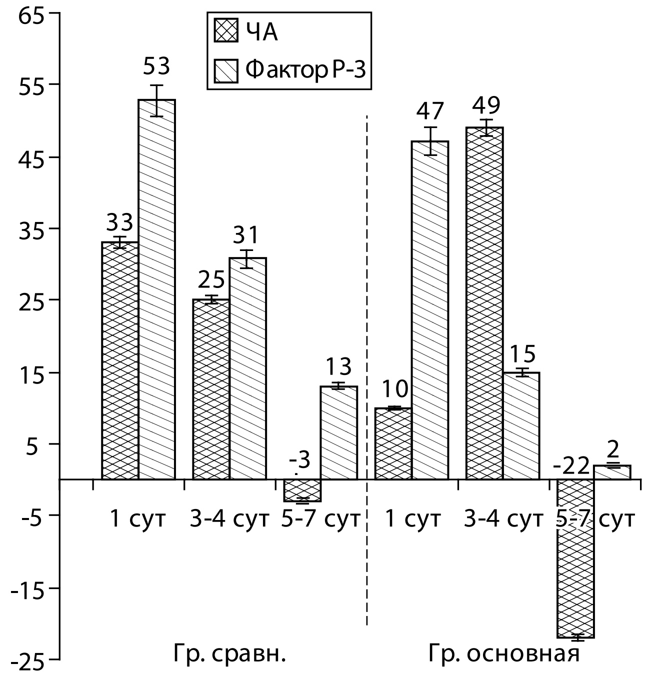

Рис. 3. Динамика общего числа тромбоцитарных агрегатов (ЧА) и содержания фактора P_3 в плазме крови (в% к значениям перед операцией) группы сравнения и основной после операции.

5 сутки существенно не отличалось от предоперационного.

Следовательно, прием Селмевита, лимитируя ускорение процессов ЛПО и снижение АОП, сдерживал одновременно активацию тромбоцитарного гемостаза. Это согласуется с ранее установленным в эксперименте фактами: на фоне предварительного введения антиоксиданта воздействия, существенно активирующие ЛПО, оказывают заметно меньшее влияние на прирост агрегационной (спонтанной и индуцируемой) активности, на высвобождение ими факторов P_3 и P_4 [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение состояния коагуляционного, тромбоцитарного гемостаза и процессов перекисного окисления липидов при выполнении лапароскопических операций на придатках матки показало, что они сопровождаются активацией липопероксидации. Этим изменениям сопутствует снижение содержания витамина Е — одного из важнейших физиологических антиоксидантов, что свидетельствует об ослаблении антиоксидантного потенциала.

Наряду со снижением антиоксидантного потенциала и повышением интенсивности ЛПО наблюдается напряжение в системе гемостаза, проявляющееся увеличением способности тромбоцитов к агрегатообразованию и к реакции высвобождения, что является причиной ускорения внутрисосудистого свертывания крови, проявлявшегося в наших наблюдениях повышением содержания в кровотоке продуктов взаимодействия тромбин-фибриноген (РФМК и ПДФ) и фактора P_3, также являющегося индикатором ускорения тромбиногенеза [23]. Известно, что фактор P_3 является фосфолипидным компонентом мембраны, ускоряющим образование протромбиназы по внутреннему механизму, и ускоряющим, наряду с факторами Va и Xa активацию фактора II, то есть образование тромбина [10, 22].

Принимая во внимание то, что признаки интенсификации фазы I гемокоагуляции и взаимодействия тромбин-фибриноген несомненны, выявлявшееся удлинение АВР и АЧТВ мы рассматриваем как следствие ускоренного потребления факторов свертывания за счет интенсификации фазы I плазмокоагуляции, что может свидетельствовать о напряжении в системе гемостаза.

В целом, проведенные исследования свидетельствуют, что назначение селмевита на фоне обычных терапевтических мероприятий пред- и послеоперационного периода ограничивает активацию ЛПО и степень снижения витамина Е. Этому сопутствует и ограничение интенсивности гемостатических сдвигов на 1 сутки после операции, и более быстрая их минимизация или исчезновение к 5–7 суткам. Эффект антиоксиданта проявляется, хотя и в небольшой мере, уменьшением интраоперационной кровопотери — показателе, сопряженном с состоянием гемокоагуляции.

Таким образом, наши наблюдения подтверждают представления о связи системы гемостаза и свободнорадикального окисления на уровне ЛПО, свидетельствуя о перспективности использования антиоксидантов в коррекции гемостатических сдвигов, сопровождающих патологические состояния с признаками оксидативного стресса и появляющихся при экстремальных воздействиях, в частности, при лапароскопических вмешательствах на придатках матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д. с соавт. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. — Томск, 1980. — С. 104-106.*
2. *Баркаган З. С. Исследования системы гемостаза в клинике. — Барнаул, 1975. — С. 158-160.*
3. *Баркаган З. С. Введение в клиническую гемостазиологию — М.: Ньюдиамед-АО, 1998. — 45 с.*
4. *Баркаган З. С., Момот А. П. Основы диагностики нарушений гемостаза. — М.: Ньюдиамед-АО, 1999. — 224 с.*
5. *Бронштейн А. С., Луцевич О. Э., Ривкин В. Л. Лапароскопическая хирургия. Состояние проблемы и собственный опыт//Межд. мед. журн. — 1998. — №3. — С. 203-206.*
6. *Бышевский А. Ш., Умутбаева М. К., Алборов Р. Г. Связь гемостаза с перекисным окислением липидов. — М.: Мед. книга, 2003. — 96 с.*
7. *Бышевский А. Ш., Умутбаева М. К., Алборов Р. Г. Антиоксиданты в коррекции гемокоагуляционных сдвигов. — М.: Мед. книга, 2004. — 79 с.*
8. *Горин В. С., Кондранина Т. Г., Чурляев Ю. А. Гиперкоагуляция как одно из осложнений лапароскопических операций в гинекологии//Эндоскопия и альтернативные подходы в хирургическом лечении гинекологических болезней. — М., 2001. — С. 376-378.*
9. *Детинкина Г. Н., Дынкин И. М., Тюрин Ж. Н., Шумабатина Л. Ф. Предложения по унификации методов исследования системы гемостаза//Лаб. дело. — 1984. — №3. — С. 140-143.*
10. *Зубаиров Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. — Казань: ФЭН АНТ, 2000. — 367 с.*
11. *Крапивин Б. В., Давыдов А. А., Дадаев Р. С. и соавт. К вопросу о понятии «осложнение хирургической операции»//Эндоскоп. хир. — 2001. — №6. — С. 3-10.*
12. *Полякова В. А., Бышевский А. Ш., Винокурова Е. А. Современное патогенетическое лечение гестоза легкой степени//Научный вестник ТГМА. — 2001. — №1 (9). — С. 34-37.*
13. *Рудакова-Шилина Н. К., Матюкова Л. Д. Оценка антиоксидантной системы организма//Лаб. дело. — 1982. — №2. — С. 19-22.*
14. *Сазонова Е. О., Азиев О. В. Осложнения лапароскопической гистерэктомии и возможности их профилактики//Акушерство и гинекология. — 2002. — №3. — С. 5-10.*
15. *Стальная И. Д., Горишвили Т. Г. Определение малонового диальдегида//В кн.: «Современные методы в биохимии». — М.: Медицина, 1977. — С. 66-68.*
16. *Стебунов С. С., Лызиков А. Н., Занько С. И. Осложнения и опасности при выполнении лапароскопических операций//Мед. консультация. — 1998. — №3. — С. 8.*
17. *Умутбаева М. К. Влияние нового витаминного комплекса «Селмевит» на липопероксидацию и гемостаз*

у женщин, получавших оральный контрацептив антеовин//Успехи современного естествознания. — 2003. — №6. — С. 88.
18. Хаджаева З.С., Мартынов С.А. Реализация репродуктивной функции у женщин, перенесших эндоскопические реконструктивно-пластические операции//Эндоскопия и альтернативные подходы в хирургическом лечении гинекологических болезней. — М., 2001. — С. 522-533.
19. Шабанов Э.А., Кудинов С.В., Арсаева Т.Д. Состояние гемостаза при заместительной гормональной терапии у женщин в перименопаузе//В кн.: «Влияние эстроген-гестагенных препаратов на гемостаз при клиническом применении в гинекологии». — Тюмень: Вектор-Бук, 1999. — С. 62-71.
20. Шитикова А.С., Каргин В.Д., Белязо О.Е. и соавт. Морфологическая оценка повышенной внутрисосудистой активации тромбоцитов. — Методические рекомендации 94/8: СПб, 1996. — 17 с.
21. Daily J.W., Zemel M.B. Antioxidants: research vs rhetoric.//Am. J. Clin. Nutr. — 1995/61. — Vol. 4. — P. 866-868.
22. Golgeli A., Tanriverdi F., Suer C. et al. Utility of P300 auditory event related potential latency in detecting cognitive dysfunction in growth hormone (GH) deficient patients with Sheehan's syndrome and effects of GH replacement therapy//Eur. J. Endocrinol. — 2004. — Vol. 150, №2. — P. 153-159.
23. Mugler K, Lefkowitz J.B. False-positive D-dimer result in a patient with Castleman disease//Arch. Pathol. Lab. Med. — 2004. — Vol. 128. — P. 328-331.
24. Schwenk W., Bohm B., Fugener A., Muller J.M. Intermittent pneumatic sequential compression (ISC) of the lower extremities prevents venous stasis during laparoscopic cholecystectomy. A prospective randomized study//Surg. Endosc. — 1998. — Vol. 12, №1. — P. 7-11.

Реакция тромбоцитов на электромагнитное излучение частотой молекулярного спектра излучения и поглощения оксида азота

А.Н. Иванов

Саратовский Государственный Медицинский Университет, кафедра нормальной физиологии, Саратов

Platelets reaction on electromagnetic radiation at frequency waves of nitric oxide

A.N. Ivanov

State Medical University, chair of normal physiology, Saratov

By means of specially designed generator we have investigated the effect of electromagnetic SWF-oscillation at nitric oxide molecular spectrum of radiation and absorption on thrombocytes functions of albino rats in state of immobilizing stress. The 5, 15 and 30 minutes-long SWF-radiation was demonstrated to foster various degrees of restoration of thrombocytes functions, its efficiency depending on the period of radiation. It was after 30-minutes radiation of rats that the most expressed restoration of thrombocytes functional activity was observed.

Key words: *aggregation — SWF-waves — nitric oxide — thrombocytes.*

ВВЕДЕНИЕ

Важными исследованиями последних лет, имеющими большое значение для теоретической и клинической медицины и позволившие по-новому интерпретировать молекулярные механизмы различных физиологических процессов в целом, является установление роли оксида азота (NO) в организме человека и животных [7, 18, 19, 29, 30, 36, 37]. Он является нейромедиатром, мощным фактором гемостаза, антиагрегантом, эндогенным вазодилататором [21, 22, 27, 32, 33].

Эндогенный NO существует и непрерывно синтезируется в органах, тканях и клетках ферментативным путем при участии NO-синтетаз — ферментов, использующих в качестве единственного субстрата аминокислоту L-аргинин [29, 30].

Исследование и разработка методов регулирования синтеза, поддержания физиологического уровня концентрации и функционального состояния эндогенного NO в клетках, органах и в организме в целом представляет несомненный научный и практический интерес. В связи с этим в настоящее время ведутся интенсивные поиски методов по созданию фармакологических активаторов гуанилатциклазы на основе химических структур (доноров), обеспечивающих возможность образования в организме эндогенного NO, регуляцию его концентрации и реакционной способности [21, 22].

Однако фармакологическая регуляция синтеза NO в живом организме может сопровождаться возникновением нежелательных, а иногда и вредных побочных эффектов. Это диктует необходимость изыскания неинвазивных физических регуляторов эндогенного NO на основе естественного физиологического регулирования.

Перспективным с точки зрения поставленной задачи является использование низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ). Вращательный молекулярный спектр поглощения и излучения NO находится в частотном КВЧ-диапазоне 150,176–150,664 ГГц [2].

Экспериментальные исследования в условиях *in vitro* по воздействию КВЧ-волн на частоте молекулярного спектра излучения и поглощения NO на плазму, обогащенную тромбоцитами, и кровь больных нестабильной и стабильной стенокардией, у которых процессы агрегации тромбоцитов нарушены, показали существенное влияние данного диапазона волн на восстановление функционального состояния кровяных пластинок [12, 13, 14].

Задача настоящего исследования — изучение функций тромбоцитов у белых крыс с нарушениями микроциркуляторного звена системы гемостаза, вызванных иммобилизационным стрессом, при облучении их КВЧ-волнами молекулярного спектра излучения и поглощения NO.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной задачи проводили изучение образцов обогащенной тромбоцитами плазмы 75 белых крыс-самцов массой 180–220 г. В качестве модели, имитирующей нарушение микроциркуляторного звена гемостаза у больных нестабильной и стабильной стенокардией, мы использовали иммобилизационный стресс: жёсткая фиксация крыс в положении на спине в течение трех часов [3].

Экспериментальные животные содержались в виварии на обычном пищевом рационе. Для устранения влияния сезонной и циркадной зависимости на систему гемостаза эксперименты проводили в осенне-зимний период во второй половине дня. Все животные при проведении эксперимента содержались в одинаковых условиях. Опыты проводили в отдельной лаборатории, исключающей посторонние раздражители, при постоянной температуре со стандартным уровнем освещения. Однократное облучение животных, находившихся в состоянии стресса, проводили электромагнитными волнами с частотой молекулярного спектра излучения и поглощения NO — 150,176–150,664 ГГц (длина волн соответственно 1,991–1,997 мм).

Механизм повышения реакционной способности эндогенного NO может быть объяснен теорией возмущения молекулярных орбиталей электромагнитным полем [10]. В связи с этим в экспериментальных исследованиях использовали малогабаритный переносной медицинский аппарат «КВЧ-NO», разработанный в Медикотехнической ассоциации КВЧ (Москва) совместно с ФГУП «НПП-Исток» (Фрязино) и ОАО ЦНИИИА (Саратов). Структура молекулярного КВЧ-спектра ЭМИ оксида азота формируется в нем в соответствии с методами, предложенными и реализованными в квазиоптическом КВЧ генераторном комплексе моделирования детерминированных шумов для биофизических исследований, разработанном в ОАО ЦНИИИА [15].

Облучали предварительно выбритую поверхность кожи площадью 3 см^2 над областью мечевидного отростка грудины. Облучатель располагали на расстоянии 1,5 см над поверхностью тела животного. Мощность излучения генератора составляла 0,7 мВт, а плотность мощности, падающей на участок кожи размером 3 см^2, — 0,2 мВт/см^2. Доза облучения определялась плотностью мощности, падающей на кожу, и заданным временем облучения. Продолжительность однократного облучения составляла 5, 15 и 30 минут.

Взятие крови осуществляли пункцией правых отделов сердца. В качестве стабилизатора крови использовали раствор гепарина (фирма «Рихтер», Венгрия) в дозе 40 ЕД/мл, так как он не вызывает избыточного связывания ионов кальция в отличие от раствора цитрата натрия [1, 13], необходимого для активации тромбоцитов [6, 26]. Активацию и агрегацию тромбоцитов исследовали в обогащенной тромбоцитами плазме [8] на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов 230 LA «BIOLA» при помощи IBM-совместимого

Таблица 1.

Соответствие закону нормального распределения показателей агрегации тромбоцитов у крыс-самцов при экспериментальной стресс-реакции и различных временных режимах облучения ЭМИ КВЧ молекулярного спектра поглощения и излучения оксида азота

Показатели		Контроль	Стресс	Время воздействия стресса совместно с облучением (минут)		
				5	15	30
Максимальный размер образующихся тромбоцитарных агрегатов (усл. ед.)	**W**	0,912568	0,923816	0,875729*	0,956787	0,923808
	p	0,148260	0,220187	0,040989	0,636768	0,220124
Максимальная скорость образования наибольших тромбоцитарных агрегатов (усл. ед.)	**W**	0,943870	0,899587	0,959283	0,954354	0,898677
	p	0,433526	0,093801	0,679927	0,595421	0,090848
Максимальная степень агрегации (%)	**W**	0,901777	0,926877	0,990075	0,965997	0,962362
	p	0,101314	0,244955	0,999442	0,795008	0,733366
Максимальная скорость агрегации (усл. ед.)	**W**	0,848151*	0,873845*	0,935925	0,963363	0,964921
	p	0,016352	0,038441	0,333876	0,750590	0,777057

Примечание: в каждом случае приведен W — критерий Шапиро-Уилкса и показатель его достоверности из 15 измерений.

компьютера и специализированной MS Windows-совместимой программы «Aggr» (НПФ «Биола»). Индуктором агрегации служил раствор АДФ в конечной концентрации 2,5 мкМ (фирма «Реонал», Россия). Исследование проводили на 5 группах белых крыс, в каждой из которых было по 15 животных: 1-я группа — контроль; 2-я группа (сравнительная) — животные, находившиеся в состоянии стресса; 3-я, 4-я, и 5-я — подопытные, в которых белые крысы были подвергнуты однократному облучению соответственно в течение 5, 15 и 30 минут на фоне стресса.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи программ Microsoft Excel 2000 и пакета программ Statistica 6.0. Проверяли гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро-Уилкса). В случае нормальных распределений для сравнения значений использовали t-критерий Стьюдента; в случае распределений, отличных от нормальных, — U-критерий Манна-Уитни. Большинство наших данных не соответствовало закону нормального распределения (**табл. 1**).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных исследований выявлено значительное увеличение функциональной активности тромбоцитов у крыс, находившихся в состоянии стресса: достоверное (по сравнению с контролем) увеличение максимального размера образующихся тромбоцитарных агрегатов, максимальной скорости образования наибольших тромбоцитарных агрегатов, максимальной степени агрегации, максимальной скорости агрегации (**табл. 2**). При этом не было обнаружено достоверных изменений таких параметров как время достижения максимального размера образующихся тромбоцитарных агрегатов, максимальной скорости образования наибольших тромбоцитарных агрегатов и максимальной скорости агрегации.

Установлено, что воздействие КВЧ-излучения на частоте молекулярного спектра излучения и поглощения NO в течение 5 минут на животных, находившихся в состоянии стресса, вызывало частичное восстановление функциональной активности тромбоцитов, что проявлялось в уменьшении (на 22%) максимального размера образующихся тромбоцитарных агрегатов, максимальной скорости образования наибольших тромбоцитарных агрегатов (на 29%). В тоже время не было найдено достоверных изменений максимальной степени агрегации и максимальной скорости агрегации при данном режиме облучения по сравнению с контролем (**табл. 2**).

Воздействие КВЧ-излучения молекулярного спектра излучения и поглощения NO в течение 15 минут на животных в состоянии стресса также вызывало частичное восстановление агрегационной активности тромбоцитов. При этом отмечали нормализацию максимального размера образую-

Таблица 2.

Показатели агрегации тромбоцитов у крыс-самцов при экспериментальной стресс-реакции и различных временных режимах облучения ЭМИ КВЧ молекулярного спектра поглощения и излучения оксида азота

Показатели	Контроль	Иммобилизационный стресс	Время воздействия стресса совместно с облучением (минут)		
			5	15	30
Максимальный размер образующихся тромбоцитарных агрегатов (усл. ед.)	2,63 (2,20; 2,86)	6,93 (6,16; 8,12) Z_1 = 4,67 p_1 = 0,000003	5,44 (5,18; 5,96) Z_1 = 4,62 p_1 = 0,000004 Z_2 = 3,73 p_2 = 0,000189	3,76 (3,16; 4,50) Z_1 = 3,48 p_1 = 0,000494 Z_2 = 4,50 p_2 = 0,000007 Z_3 = 4,23 p_3 = 0,000023	2,51 (2,17; 2,79) Z_1 = 0,95 p_1 = 0,340087 Z_2 = 4,67 p_2 = 0,000003 Z_3 = 4,67 p_3 = 0,000003 Z_4 = 3,94 p_4 = 0,000081
Максимальная скорость образования наибольших тромбоцитарных агрегатов (усл. ед.)	3,45 (2,47; 4,11)	12,22 (10,00; 15,80) Z_1 = 4,67 p_1 = 0,000003	8,69 (7,97; 9,93) Z_1 = 4,62 p_1 = 0,000004 Z_2 = 3,50 p_1 = 0,000457	5,86 (4,46; 7,30) Z_1 = 3,84 p_1 = 0,000125 Z_2 = 4,50 p_2 = 0,000007 Z_3 = 3,50 p_3 = 0,000457	3,41 (2,71; 4,30) Z_1 = 0,33 p_1 = 0,740022 Z_2 = 4,67 p_2 = 0,000003 Z_3 = 4,67 p_3 = 0,000003 Z_4 = 3,87 p_4 = 0,000105
Максимальная степень агрегации (%)	43,9 (32,9; 51,0)	65,6 (57,0; 74,4) Z_1 = 4,33 p_1 = 0,000015	52,2 (41,3; 59,5) Z_1 = 1,87 p_1 = 0,061971 Z_2 = 2,63 p_2 = 0,008443	49,5 (40,6; 57,6) Z_1=1,12; p_1=0,262754; Z_2=3,38; p_2=0,000724; Z_3=0,77; p_3=0,442877	42,3 (35,6; 47,5) Z_1 = 0,73 p_1 = 0,467921 Z_2 = 4,25 p_2 = 0,000021 Z_3 = 2,43 p_3 = 0,015247 Z_4 = 1,82 p_4 = 0,067997
Максимальная скорость агрегации (усл. ед.)	61,0 (44,2; 73,6)	87,4 (75,1; 97,9) Z_1 = 3,71 p_1 = 0,000205;	70,1 (54,1; 82,0) Z_1 = 1,30 p_1 = 0,191363 Z_2 = 2,59 p_2 = 0,009532	66,0 (55,1; 76,0) Z_1 = 0,60 p_1 = 0,547553 Z_2 = 3,46 p_2 = 0,000533 Z_3 = 0,39 p_3 = 0,693551	56,2 (46,2; 61,3) Z_1 = 1,06 p_1 = 0,290197 Z_2 = 4,09 p_2 = 0,000044 Z_3 = 2,07 p_3 = 0,038089 Z_4 = 2,05 p_4 = 0,040057

Примечание: в каждом случае приведены средняя величина (медиана — Me), нижний и верхний квартили (25%; 75%) из 15 измерений. Z_1, p_1 — по сравнению с группой контроля; Z_2, p_2 — по сравнению с группой животных в состоянии стресса; Z_3, p_3 — по сравнению с группой животных, подвергнутых 5 минутному КВЧ-облучению на фоне стресса; Z_4, p_4 — по сравнению с группой животных, подвергнутых 15 минутному КВЧ-облучению на фоне стресса.

щихся тромбоцитарных агрегатов (на 46%), максимальной скорости образования наибольших тромбоцитарных агрегатов (на 52%) по сравнению с группой животных, находившихся в состоянии стресса (**табл. 2**).

При 30-минутном облучении животных, находившихся в состоянии стресса, КВЧ-электромагнитным полем молекулярного спектра излучения и поглощения NO наблюдали полное восстановление функций тромбоцитов. При этом максимальный размер образующихся тромбоцитарных агрегатов, максимальная скорость образования наибольших тромбоцитарных агрегатов, максимальная степень агрегации и максимальная скорость агрегации тромбоцитов полностью нормализовались и достоверно не отличались от контроля (**табл. 2**).

Таким образом, у крыс в состоянии стресса повышалась агрегационная активность. При воздействии на животных, находившихся в состоянии стресса, КВЧ-волнами молекулярного спектра излучения и поглощения NO наблюдалась различная степень восстановления функций. Установлено, что нормализация процесса агрегации зависела от времени облучения животных. Восстановление индуцированной агрегации тромбоцитов происходило при 30 минутной экспозиции электромагнитных волн на частоте молекулярного спектра излучения и поглощения NO.

ОБСУЖДЕНИЕ

Колебания на частоте молекулярного спектра излучения и поглощения NO представляют собой распространяющиеся в пространстве и средах электромагнитные волны. При облучении экспериментальных животных электромагнитные волны практически полностью затухают в тонком слое кожи (эпидермис, дерма). Эффективная глубина поглощения электромагнитных волн составляет 0,3–0,5 мм [4]. Таким образом, эффект первичной рецепции миллиметровых волн имеет место преимущественно в коже. С учетом особенностей поглощения миллиметровых волн кожей возможно резонансное поглощение волн капиллярами и форменными элементами крови [20, 23].

В настоящее время предложено несколько научных подходов к объяснению механизмов воздействия на биологические объекты (на организменном, клеточном и молекулярном уровнях) электромагнитного излучения крайне высокой частоты. Наиболее полным нам представляется подход, развитый в работах [5, 9]. Основные положения этого подхода позволяют сделать заключение, что воздействие электромагнитным излучением крайне высокой частоты является действенным инструментом по управлению синтезом эндогенного NO в биологической среде, а также биохимическими реакциями, способствующими взаимодействию его с продуктами метаболических процессов [13].

На молекулярном уровне в реакции организма на КВЧ воздействие участвуют биохимические механизмы, за счет которых в клетках, подвергнутых КВЧ облучению малой интенсивности, происходит активация различных ферментных систем [9].

При облучении энергия КВЧ излучения расходуется на переходы молекул из одного энергетического состояния в другое. При используемых в медико-биологической практике уровнях мощности КВЧ излучения экзогенное воздействие электромагнитного излучения крайне высокой частоты приводит к изменению вращательной составляющей полной энергии молекул. При совпадении частоты проводимого облучения с частотой вращения полярных молекул возможна перекачка энергии излучения молекуле, сопровождающаяся увеличением ее вращательной кинетической энергии, влияющей на ее реакционную способность [4].

Известно, что вращательные молекулярные спектры резонансного поглощения и излучения молекул важнейших клеточных метаболитов (NO, CO, O_2, CO_2, активные метаболиты кислорода) находятся именно в КВЧ диапазоне [2]. В связи с этим нами было предложено использовать при облучении сложных биологических объектов электромагнитные колебания КВЧ диапазона, соответствующего вращательным молекулярным спектрам излучения и поглощения этих веществ [16].

Механизм восстановления функциональной активности тромбоцитов под влиянием облучения КВЧ-электромагнитными волнами в режиме модулированной генерации КВЧ-волн молекулярного спектра излучения и поглощения NO можно рассматривать в двух основных направлениях: микровзаимодействие (молекулярное взаимодействие) и макровзаимодействие, то есть взаимодействие макрочастиц — агрегатов тромбоцитов и эритроцитов с электромагнитным полем [12].

Механизм КВЧ-воздействия на тромбоциты можно объяснить прежде всего молекулярным взаимодействием электромагнитного поля и молекулы NO, вследствие чего может происходить активация эндогенного оксида азота [9].

Известно, что оксид азота образуется путем окисления аминогруппы аминокислоты L-аргинина под влиянием NO-синтетазы [7, 18, 19, 27, 29, 30]. Оксид азота взаимодействует с железом гема гуанилатциклазы и активирует ее. Активная гуанилатциклаза катализирует биосинтез цГМФ — мощного регулятора метаболизма клетки, проявляющего антиагрегационное действие [21, 22, 24, 28, 33, 34, 38]. Возможно, что механизм восстанавливающего эффекта электромагнитных волн на агрегацию тромбоцитов на частотах молекулярного спектра излучения и поглощения NO обусловлен их влиянием на активность ферментов NO-синтетазы и гуанилатциклазы, приводящим в конечном итоге к образованию NO и цГМФ. Последний, наряду с цАМФ, обладает мощными антиагрегационными свойствами. Оксид азота обладает стресс-лимитирующим эффектом [17], в связи с чем в крови уменьшается содержание фибриногена, необходимого для осуществления процессов агрегации тромбоцитов [6, 25, 35, 39].

Механизм макровзаимодействия можно рассматривать как резонансное взаимодействие агрегатов и электромагнитной волны [11]. При агрегации размер агрегатов увеличивается, и при достижении размера, соизмеримого с длиной волны, они вступают в резонансное взаимодействие, что вызывает процесс дезагрегации тромбоцитарных агрегатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Баркаган З. С. Исследования системы гемостаза в клинике. — Барнаул, 1975. — С. 186.*
2. *Башаринов А. Е., Тучков Л. Г., Поляков В. М., Аланов Н. И. Измерение радиотепловых и плазменных излучений в СВЧ-диапазоне. — М.: Советское радио, 1968. — С. 380.*
3. *Беспалова Т. А. Влияние гелий неонового лазерного излучения на систему гемостаза при стрессе (экспериментальное исследование): Автореф. дисс...канд. наук. — Саратов. — 23 с.*
4. *Бецкий О. В. Механизмы воздействия низкоинтенсивных миллиметровых волн на биологические объекты (биофизический подход). В кн. Миллиметровые волны в медицине и биологию. — М.: ИРЭ РАН, 1997. — С. 135-137.*
5. *Бецкий О. В., Лебедева Н. Н. Современные представления о механизмах воздействия низкоинтенсивных миллиметровых волн на биологические объекты//Миллиметровые волны в биологии и медицине. — 2001. — № 3. — С. 5-18.*
6. *Бышевский А. Ш., Галян С. Л., Дементьева И. А. и соавт. Тромбоциты. — Тюмень, 1996. — С. 250.*
7. *Волин М. С., Дэвидсон К. А., Каминска П. М. и соавт. Механизмы передачи сигнала оксидант — оксид азота в сосудистой ткани//Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 958-965.*
8. *Габбасов В. А., Попов Е. Г., Гаврилов И. Ю. и соавт. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов//Лаб. дело. — 1989. — № 10. — С. 15-18.*
9. *Девятков Н. Г., Голанд Н. Б., Бецкий О. В. ММ-волны и их роль в процессах жизнедеятельности. — М.: Радио и связь, 1991. — С. 186.*
10. *Днепровский А. С., Темникова Т. И. Теоретические основы органической химии. — Л.: Химия, 1982. — С. 560.*
11. *Киричук В. Ф., Головачева Т. В., Чиж А. Г. КВЧ-терапия. — Саратов: СарГМУ, 1999. — С. 360.*
12. *Киричук В. Ф., Волин М. В., Креницкий А. П. и соавт. Влияние электромагнитных КВЧ-колебании на частотах молекулярных спектров излучения и поглощения оксида азота функциональную активность тромбоцитов//Цитология. — 2001. — Т. 43, № 8. — С. 759-763.*
13. *Киричук В. Ф., Волин М. В., Креницкий А. П. и соавт. Тромбоциты в реакциях системы гемостаза на КВЧ-воздействие. — Саратов: СарГМУ, 2002. — С. 160.*
14. *Киричук В. Ф., Малинова Л. И., Креницкий А. П. и соавт. Реология крови и КВЧ-воздействие. — Саратов: СарГМУ, 2003. — С. 154.*
15. *Креницкий А. П., Майбородин А. В., Бецкий О. В. и соавт. Квазиоптический КВЧ генераторный комплекс моделирования детерминированных шумов для биофизических исследований//Биомед. технологии и радиоэлектроника. — 2003. — № 2. — С. 17-24.*
16. *Майбородин А. В., Креницкий А. П., Тупикин В. Д. и соавт. Панорамно-спектрометрический комплекс для исследования тонких структур молекулярных спектров физических и биологических сред//Биомедицинская радиоэлектроника. — 2001. — № 8. — С. 35-47.*
17. *Малышев И. Ю., Манохина Е. Б. Стресс, адаптация и оксид азота//Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 992-1006.*
18. *Реутов В. П. Биохимическое предопределение NO-синтетазной и нитритредуктазной компонент цикла оксида азота//Биохимия. — 1999. — Т. 64, № 5. — С. 634-651.*
19. *Реутов В. П., Сорокина Е. Г. NO-синтетазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота//Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 1029-1040.*
20. *Родштат И. В. Некоторые новые физиологические подходы к оценке КВЧ-воздействия на биологические объекты//В кн.: Миллиметровые волны в медицине и биологии. — М.: ИРЭ РАН, 1997. — С. 151-153.*
21. *Северина И. С. Растворимая форма гуанилатциклазы в молекулярном механизме физиологических эффектов окиси азота и в регуляции процесса агрегации тромбоцитов//Бюл. эксперим. биол. мед. — 1995. — № 3. — С. 230-235.*
22. *Северина И. С. Растворимая гуанилатциклаза в молекулярном механизме физиологических эффектов окиси азота//Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 939-997.*
23. *Хижняк Е. П., Зискин М. С. Механизмы взаимодействия электромагнитных излучений миллиметрового диапазона с биологическими объектами//В кн.:*

Миллиметровые волны в медицине и биологии. — М.: ИРЭ РАН, 1997. — С. 128-31.

24. *Чирков Ю.Ю., Белушкина Н.Н., Тыщук И.А., Северина И.С. Роль гуанилатциклазы в молекулярном механизме агрегации тромбоцитов человека//Вестн. АМН СССР. — 1991. — № 10. — С. 51-54.*
25. *Чуян Е.Н., Темурянц Н.А., Московчук О.Б., Чирский Н.В. Физиологические механизмы биологических эффектов низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ. — Симферополь. — 448 с.*
26. *Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз. — СПб.: ГМУ, 2000. — 227 с.*
27. *Furchgott R.F., Jothianandan D Endothelium-dependent and — independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light//Blood Vessels. — 1991. — № 28. — P. 52-61.*
28. *Gerzer R., Radany E.V., Garbers D.L. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase//Biochem. Biophis. Res. Commun. — 1982. — № 108. — P. 678-686.*
29. *Ignarro L.G. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide//Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. — 1990. — № 30. — P. 535-560.*
30. *Ignarro L.G., Murad F Nitric oxide: biochemistry, molecular biology and therapeutic implication//Adv. Pharmacol. — 1995. — № 34. — P. 1-516.*
31. *Kowabata A., Hata T Characterization of platelet hypofunction in rats under SART stress (repeated cold stress)//Thromb. Res. — 1993. — № 69. — P. 197-207.*
32. *Knowles R.G., Palacios M., Palmer R.M., Moncada S Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nerves system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase//Proc. Nat. Acad. Shi. USA. — 1989. — № 86. — P. 5159-5162.*
33. *Matsuoka I., Suzuki T Mepacrine-induced elevation of cyclic GMP levels and acceleration of reversal of ADP-induced aggregation in washed rabbit platelets//J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res. — 1983. — № 9. — P. 5341-5353.*
34. *Mellion B Th., Ignarro L.G., Ohlstein E.U. et all. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators//Blood. — 1981. — № 57. — P. 946-949.*
35. *Naesh O., Haedersdal C., Hindberg J Platelet activation in mental stress//Clin. Phisiol. — 1993. — № 13. — P. 299-307.*
36. *Palmer R.M., Ashton D.S., Moncada S Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine//Nature. — 1988. — № 333. — P. 6174-6646.*
37. *Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor//Nature. — 1987. — № 327. — P. 524-526.*
38. *Steer M.L. Salzman E.W. Cyclic nucleotides in hemostasis and thrombosis//Adv. Cyclic Nucleotides Res. — 1980. — № 12. — P. 71-92.*
39. *Takeda H Stress-induced gastric mucosal lesion and platelet aggregation in rats//J Clin. Gastroenterol. — 1992. — № 14. — P. 145-148.*


ВАШ СЕРВЕР В ХОРОШЕЙ КОМПАНИИ

Влияние электромагнитного излучения ТГц-диапазона на частоте молекулярного спектра излучения и поглощения оксида азота на количественный и качественный состав эритроцитов in vivo

О. И. Помошникова

Саратовский Государственный Медицинский Университет, кафедра нормальной физиологии, Саратов

Influence of electromagnetic radiation THz range on frequency of nitric oxide on quantitative and qualitative erythrocyte content in vivo

O. I. Pomoshnikova

Medical State University, chair of normal physiology, Saratov

We have examined the effect of electromagnetic THz-oscillation at nitric oxide molecular spectrum of radiation and absorption on quantitative and qualitative erythrocyte content of albino rats in state of immobilizing stress. Our results proved complete or partial reconstruction of quantitative and qualitative erythrocyte content which depended on time of influence.

Key words: *THz-waves — nitric oxide — erythrocyte content — hemoglobin — hematocrite — rheology.*

ВВЕДЕНИЕ

С момента обнаружения физиологического воздействия миллиметровых волн (ММ-волн) на живые объекты [3, 9] были определены области частот наиболее эффективного воздействия КВЧ-волн, так называемые «биологические» резонансы, разработаны и успешно используются методы КВЧ-терапии [4]. В основу физиологической концепции воздействия КВЧ-волн положено представление об их информационном, а не энергетическом действии [3, 9]. При воздействии ММ-волн на живые объекты главной мишенью являются полярные молекулы свободной воды, имеющие большой дипольный момент (~ 1,840). Энергия КВЧ-излучения трансформируется в кинетическую энергию поступательного и вращательного движения молекул воды. Хотя эта энергия и рассеивается в виде тепла за короткое время порядка 10^{-9}–10^{-10} секунд, молекулы воды могут оказывать влияние на различные физико-химические процессы, например, на гидратацию белков.

Кожа человека примерно на 65% состоит из воды. Поэтому эффекты первичной рецепции КВЧ-облучения имеют место только в коже (эпидермис, дерма), а влияние этих волн на организменном уровне проявляется опосредованно с участием периферической нервной и гуморальной систем (кровь, лимфа, межклеточная жидкость) [5]. При совпадении частоты проводимого облучения с частотой вращения полярных молекул возможна перекачка энергии излучения молекуле, сопровождающаяся увеличением её вращательной кинетической энергии, влияющей на её реакционную способность [6].

Терагерцовый диапазон частот (100 ГГц — 10 ТГц) вызывает большой интерес исследователей, так как именно в этом диапазоне в основном сосредоточены частотные спектры поглощения и излучения важнейших клеточных метаболитов (NO, O_2, CO_2, CO, OH^- и др.) [2, 15]. Терагерцовая терапия (ТГЧ-терапия), при которой осуществляется воздействие указанных ММ-волн, является относительно новым, но весьма перспективным методом лечения широкого ряда заболеваний [7, 12].

Установление роли оксида азота (NO) в организме человека и животных дает повод для проведения исследований, позволяющих по-новому объяснять молекулярные механизмы различных физиологических процессов [20, 21, 25, 27, 30]. Эндогенный NO постоянно синтезируется в органах, тканях и клетках ферментативным путём при участии NO-синтетаз — ферментов, использующих в качестве единственного субстрата аминокислоту L-аргинин [18, 26, 29].

Наиболее изучены антигипертензивные и антиагрегационные эффекты действия эндогенного

NO, которые осуществляются одним из важных внутриклеточных ферментов — гемосодержащей гидрофильной гуанилатциклазой (ГЦ), активирующейся в результате запуска оксидом азота ряда биохимических процессов [20, 21]. Вращательный молекулярный спектр излучения и поглощения (МСИП) оксида азота находится именно в ТГЧ-диапазоне — 150,176–150,664 ГГц [2].

Экспериментальные исследования в условиях *in vitro* по воздействию ТГЧ-излучения на частотах МСИП NO на цельную кровь больных нестабильной и стабильной стенокардией, у которых наблюдается нарушение вязкостных свойств крови, повышение агрегации эритроцитов и тромбоцитов, показали положительное влияние волн данного диапазона на восстановление функционального состояния эритроцитов и тромбоцитов, а также реологических параметров крови [11, 13, 14]. Одной из актуальных и сложных задач является проведение ряда экспериментальных исследований, демонстрирующих влияние ТГЧ-излучения на частоту МСИП NO на биологические объекты в условиях *in vivo*.

Отсутствие однозначных зависимостей между экспозицией и эффектом можно считать одной из принципиальных особенностей ТГЧ-воздействия на живые объекты [10, 24]. В медицинской практике с учётом данной особенности выработались требования по ограничению длительности сеансов терапевтического КВЧ-воздействия, длительности промежутков между сеансами, количеству циклов в терапевтическом курсе [12]. Это послужило основанием для разработки оптимального режима ТГЧ-облучения на частотах МСИП NO, при котором происходит полное или частичное восстановление ряда реологических показателей гомеостаза организма. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение влияния ТГЧ-облучения на частотах МСИП NO на качественный и количественный состав эритроцитов крови белых крыс, находящихся в состоянии иммобилизационного стресса, и разработка оптимального режима ТГЧ-облучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы образцы цельной крови 75 беспородных крыс-самцов весом 180–220 г. Нарушения реологических свойств крови, характерные для больных нестабильной и стабильной стенокардией, моделировали посредством иммобилизационного стресса [18]. Исследования проводили на пяти группах животных: I группа (*n=15*) — группа контроля; II группа (*n=15*) — животные в состоянии иммобилизационного стресса; III, IV и V группы (в каждой *n=15*) — животные, подвергавшиеся ТГЧ-облучению в течение 5, 15 и 30 минут на фоне иммобилизационного стресса. Облучение животных проводили малогабаритным медицинским аппаратом «КВЧ-NO», разработанным в медико-технической ассоциации КВЧ (Москва) совместно с ФГУП «НПП-Исток» (Фрязино) и ОАО ЦНИИИА (Саратов). Структура молекулярного ТГЧ-спектра ЭМИ оксида азота формируется этим генератором в соответствии с методами, предложенными и реализованными в квазиоптическом КВЧ генераторном комплексе моделирования детерминированных шумов для биофизических исследований, разработанным в ОАО ЦНИИИА.

Облучали предварительно депилированную поверхность кожи площадью 3 см^3 над областью мечевидного отростка грудины с частотой подаваемой модуляции 150,176–150,664 ГГц. Облучатель располагали на расстоянии 1,5 см над поверхностью тела животного. Мощность излучения генератора составляла 0,7 мВт/см^2. Доза облучения определялась плотностью мощности, падающей на кожу, и заданным временем облучения. Продолжительность однократного облучения составляла 5, 15 и 30 минут. Отбор проб крови производили пункцией правых отделов сердца. В качестве стабилизатора крови использовали гепарин в дозе 40 ЕД/мл.

Подсчет количества эритроцитов проводили унифицированным методом в счетной камере Горяева. Величину гематокрита (Ht) определяли микрометодом. Содержание гемоглобина исследовали с помощью гемометра Сали. Диаметр эритроцитов в окрашенном мазке крови измеряли с помощью окуляр-микрометра. На основании полученных данных вычисляли следующие индексы: цветовой показатель, среднее содержание гемоглобина в эритроците, среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците, средний объем и средний диаметр эритроцитов.

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи программ Microsoft Excel 2000 и пакета программ Statistica 6.0. Проверяли гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро-Уилкса). В случае нормальных распределений для сравнения значений использовали t-критерий Стьюдента; в случае распределений, отличных от нормальных, — U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 1.

Влияние ТГЧ-облучения на частотах МСИП оксида азота на количественный состав эритроцитов крови белых крыс-самцов

Показатели	Контроль	Стресс	Облучение на фоне иммобилизационного стресса в течение (минут)		
			5	15	30
Количество эритроцитов (10^{12}/л)	4,5 (4,0; 5,0)	5,9 (5,3; 6,3) Z=4,65 p <0,05	6,5 (5,8; 7,0) Z=5,13 p <0,05 Z_1=2,03 p_1 <0,05	4,7 (4,2; 5,0) Z=1,13 p>0,05 Z_1=4,29 p_1 <0,05 Z_2=4,92 p_2 <0,05	5,4 (4,7; 6,0) Z=3,44 p <0,05 Z_1=1,78 p_1>0,05 Z_2=3,43 p_2 <0,05 Z_3=3,0 p_3 <0,05
Гематокрит (об. %)	31,6 (30,0; 35,0)	35,7 (30,0; 38,0) Z=1,97 p <0,05	36,3 (30,0; 40,0) Z=2,75 p <0,05 Z_1=1,24 p_1>0,05	4,7 (4,2; 5,0) Z=0,46 p>0,05 Z_1=1,84 p_1>0,05 Z_2=3,03 p_2 <0,05	34,6 (30,0; 36,0) Z=2,02 p <0,05 Z_1=0,13 p_1>0,05 Z_2=1,12 p_2>0,05 Z_3=1,97 p_3 <0,05
Содержание гемоглобина (г/л)	107,0 (100,0; 110,0)	101,5 (90,0; 115,0) Z=1,25 p>0,05	107,8 (100,0; 110,0) Z=0,49 p>0,05 Z_1=1,37 p_1>0,05	107,1 (100,0; 110,0) Z=0,28 p>0,05 Z_1=1,29 p_1>0,05 Z_2=0,28 p_2>0,05	110,3 (100,0; 120,0) Z=1,05 p>0,05 Z_1=1,83 p_1>0,05 Z_2=0,85 p_2>0,05 Z_3=1,08 p_3>0,05

Примечание: Z и p — по сравнению с группой контроля; Z_1 и p_1 — по сравнению с иммобилизационным стрессом; Z_2 и p_2 — по сравнению с 5-ти минутным облучением; Z_3 и p_3 — по сравнению с 15-ти минутным облучением.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Женевской конвенции «*International Guiding Principles for Biomedical Rescarch Jnvolving Animals*».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследований свидетельствовали о статистически достоверном увеличении количества эритроцитов (*p <0,05*) и Ht (*p <0,05*) у крыс, подвергшихся иммобилизационному стрессу по сравнению с животными контрольной группы (**табл. 1**). Цветовой показатель, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците при этом статистически достоверно (*p <0,05*) снижались, средний объём эритроцитов также уменьшался (*p <0,05*), а средний диаметр эритроцитов статистически достоверно увеличивался (*p <0,05*) по сравнению с животными группы контроля (**табл. 2**, **3**). Уровень гемоглобина в крови статистически достоверно не менялся (*p>0,05*).

Воздействие ТГЧ-излучения на частотах МСИП NO в течение 5 минут на животных, находившихся в состоянии иммобилизационного стресса, не вызывало изменений исследуемых показателей. Об этом свидетельствовало отсутствие статистически достоверных различий качественного и количественного состава эритроцитов крови данной группы по сравнению с животными, находившихся в состоянии иммобилизационного стресса, но при этом отмечали статистически достоверные различия показателей по сравнению с данными контрольной группы.

Анализ качественного и количественного состава эритроцитов у животных, облученных ТГЧ-излучением на частотах МСИП NO в течение 15 минут на фоне иммобилизационного стресса, показал полное восстановление количества эритроцитов, Ht, цветового показателя, среднего содержания гемоглобина и средней концентрации гемоглобина в эритроците, среднего объёма и среднего диамет-

Таблица 2.

Влияние ТГЧ-облучения на частотах МСИП оксида азота на качественный состав эритроцитов крови белых крыс-самцов

Показатели	Контроль	Стресс	Облучение на фоне иммобилизационного стресса в течение (минут)		
			5	15	30
Средний объем эритроцитов (мкм^3)	70,0 (63,8; 75,0)	60,8 (51,7; 61,4) Z=3,27 p <0,05	56,8 (51,7; 58,8) Z=3,93 p <0,05 Z_1=0,64 p_1>0,05	67,9 (61,4; 73,2) Z=0,95 p>0,05 Z_1=3,12 p_1 <0,05 Z_2=3,62 p_2 <0,05	64,4 (58,3; 66,7) Z=2,43 p <0,05 Z_1=2,12 p_1 <0,05 Z_2=2,2 p_2 <0,05 Z_3=1,75 p_3>0,05
Средний диаметр эритроцитов (мкм)	6,6 (6,5; 6,8)	6,8 (6,7; 7,0) Z=2,95 p <0,05	6,9 (6,8; 7,1) Z=3,53 p <0,05 Z_1=0,99 p_1>0,05	6,6 (6,4; 6,8) Z=0,37 p>0,05 Z_1=2,96 p_1 <0,05 Z_2=3,5 p_2 <0,05	7,0 (6,8; 7,1) Z=3,8 p>0,05 Z_1=1,45 p_1>0,05 Z_2=0,5 p_2>0,05 Z_3=3,75 p_3 <0,05

Примечание: Z и p — по сравнению с группой контроля; Z_1 и p_1- по сравнению с иммобилизационным стрессом; Z_2 и p_2- по сравнению с 5-ти минутным облучением; Z_3 и p_3- по сравнению с 15-ти минутным облучением.

ра эритроцитов. Это подтверждалось отсутствием статистически достоверных различий (*p>0,05*) изученных показателей по сравнению с данными группы контроля.

Однако, при облучении животных, подвергшихся иммобилизационному стрессу, ТГЧ-волнами в течение 30 минут не наблюдали статистически достоверных различий количества эритроцитов, Ht, средней концентрации гемоглобина и среднего диаметра эритроцитов по сравнению с животными, подвергшихся иммобилизационному стрессу (**табл. 1**, **2**, **3**). Уровень среднего объёма эритроцитов, среднего содержания гемоглобина в эритроците и цветовой показатель приближались к цифрам контрольной группы (**табл. 2**, **3**).

ОБСУЖДЕНИЕ

Реологические свойства крови характеризуются следующими понятиями и показателями: условиями потока, при которых существует течение жидкости, определяемые геометрией сосудистого русла и прилагаемыми условиями, потоковыми свойствами частиц и текучестью крови [19]. Основную роль в патогенезе и в ухудшении реологии крови играют эритроциты, так как они составляют большую часть форменных элементов. Гематокрит, или объемная концентрация эритроцитов, почти полностью определяет значение вязкости крови у здоровых людей [22]. Изменение концентрации гемоглобина в эритроците также приводит к нарушению реологических свойств эритроцитов в силу того, что гемоглобин взаимодействует с мембраной эритроцитов и влияет на его деформируемость [23, 31]. Изменение формы эритроцитов играет основную роль в их агрегации [16]. В результате проведенных нами экспериментальных исследований у самцов белых крыс при наличии у них иммобилизационного стресса обнаружено значительное повышение количества эритроцитов, что могло быть связано со значительным выбросом крови из органов-депо, а из костного мозга — незрелых эритроцитов с увеличенным среднем диаметром, что приводило к росту показателя гематокрита. Одновременно снижалось содержание гемоглобина в эритроците, увеличивалась их деформируемость и способность к агрегации. Полученные нами результаты не противоречат данным других авторов [32, 33, 35].

Установлено что под влиянием NO происходит снижение агрегационной способности эритроцитов как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [34], изменение геометрии сосудов вследствие их дилатации [25, 27, 28, 30], то есть эндогенный NO во многом определяет реологические свойства крови, которые,

Таблица 3.

Влияние ТГЧ-облучения на частотах МСИП оксида азота на показатели гемоглобина эритроцитов крови белых крыс-самцов

Показатели	Контроль	Стресс	Облучение на фоне иммобилизационного стресса в течение (минут)		
			5	15	30
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (мг)	24,4 (22,0; 26,5)	17,3 (16,4; 18,8) Z=5,37 $p<0,05$	16,9 (15,7; 17,7) Z=5,36 $p<0,05$ $Z_1=1,23$ $p_1>0,05$	23,2 (21,3; 26,2) Z=0,96 $p>0,05$ $Z_1=4,97$ $p_1<0,05$ $Z_2=5,01$ $p_2<0,05$	20,7 (18,3; 21,3) Z=3,38 $p<0,05$ $Z_1=3,45$ $p_1<0,05$ $Z_2=4,03$ $p_2<0,05$ $Z_3=2,84$ $p_3<0,05$
Среднее концентрация гемоглобина в эритроците (%)	34,4 (32,5; 36,7)	29,4 (25,2; 33,3) Z=2,84 $p<0,05$	30,6 (27,5; 33,3) Z=2,91 $p<0,05$ $Z_1=0,31$ $p_1>0,05$	34,3 (33,3; 36,7) Z=0,25 $p>0,05$ $Z_1=2,79$ $p_1<0,05$ $Z_2=3,14$ $p_2<0,05$	32,3 (28,6; 33,3) Z=1,74 $p>0,05$ $Z_1=1,43$ $p_1>0,05$ $Z_2=1,15$ $p_2>0,05$ $Z_3=1,89$ $p_3>0,05$
Цветовой показатель	1,0 (0,9; 1,1)	0,7 (0,7; 0,8) Z=5,36 $p<0,05$	1,0 (0,9; 1,1) Z=0,95 $p>0,05$ $Z_1=5,0$ $p_1<0,05$ $Z_2=3,0$ $p_2<0.05$	0,7 (0,7; 0,7) Z=5,38 $P<0,05$ $Z_1=1,3$ $P_1>0,05$	0,9 (0,8; 0,9) Z=3,15 $p<0,05$ $Z_1=3,38$ $p_1<0,05$ $Z_2=4,0$ $p_2<0,05$ $Z_3=2,42$ $p_3<0,05$

Примечание: Z и p — по сравнению с группой контроля; Z_1 и p_1 — по сравнению с иммобилизационным стрессом; Z_2 и p_2 — по сравнению с 5-ти минутным облучением; Z_3 и p_3 — по сравнению с 15-ти минутным облучением.

в первую очередь, зависят от качественного и количественного состава эритроцитов.

При длительном стрессорном воздействии происходит снижение продукции эндогенного NO и уменьшение его регуляторных функций [17]. Восстановление качественного и количественного состава эритроцитов у животных при иммобилизационном стрессе под действием ТГЧ-излучения на частоте МСИП оксида азота может быть обусловлено повышением активности эндогенного NO или увеличением его синтеза за счет воздействия ЭМИ ТГЧ непосредственно на ферменты NO-синтетазы [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что изменение качественного и количественного состава эритроцитов, а, следовательно, и ухудшение реологических свойств крови при иммобилизационном стрессе, характерное для больных стабильной и нестабильной стенокардией, частично или полностью восстанавливаются при ТГЧ-облучении на частотах МСИП NO. Наиболее эффективным в этом отношении является 15-минутный режим облучения. При 5-ти и 30-ти минутных режимах облучения выраженность восстанавливающего эффекта на исследуемые показатели эритроцитов было менее значительно.

Указанный факт позволяет ставить вопрос о клинической апробации метода ТГЧ-терапии у больных с различными заболеваниями, при которых наблюдаются нарушения реологических свойств крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Антонов А. М., Беликина Н. В., Георгиева С. А. и соавт. Адаптационные реакции организма и система свертывания крови//X съезд всесоюзного физиологического общества им. И. П. Павлова, 1964. — Т. II. — С. 47.*
2. *Башаринов А. Е., Тучков Л. Г., Поляков В. М. и соавт.*

Измерение радиотепловых и плазменных излучений в СВЧ-диапазоне. — М.: Советское радио, 1968. — 380 с.

3. *Бецкий О. В. Миллиметровые волны в биологии и медицине//Радиотехника и электроника. — 1993. — Т. 38, № 10. — С. 1760-1782.*
4. *Бецкий О. В. Миллиметровые волны в биологии и медицине//Радиотехника и электроника. — 1993. — № 2. — С. 108.*
5. *Бецкий О. В. Механизмы первичной рецепции низкоинтенсивных миллиметровых//Радиотехника и электроника волн у человека. — 1995. — № 4. — С. 135.*
6. *Бецкий О. В., Девятков Н. Д., Кислов В. В. Миллиметровые волны низкой интенсивности в биологии и медицине//Биомедицинская радиоэлектроника. — 1998. — № 4. — С. 13-29.*
7. *Бецкий О. В., Креницкий А. П., Лебедева Н. Н. и соавт. Биофизические эффекты волн терагерцового диапазона и перспектива развития новых направлений в биомедицинской технологии: «Терагерцовая терапия» и «Терагерцовая диагностика»//Биомед. технологии и радиоэлектроника. — 2003. — № 12. — С. 7-9.*
8. *Волин М. С., Дэвидсон К. А., Каминска П. М. и соавт. Механизмы передачи сигнала оксиданта — оксид азота в сосудистой ткани//Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 958-965.*
9. *Девятков Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О. В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. — М.: Радио и связь, 1991. — С. 168.*
10. *Девятков Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О. В. Особенности медико-биологического применения мм волн. — М.: ИРЭ РАН, 1994. — С. 164.*
11. *Киричук В. Ф., Волин М. В., Кренецкий А. П. и соавт. Тромбоциты в реакциях системы гемостаза на КВЧ-воздействие. — Саратов: Сар. ГМУ, 2002.*
12. *Киричук В. Ф., Головачева Т. В., Чиж А. Г. КВЧ-терапия. — Саратов: СарГМУ, 1999.*
13. *Киричук В. Ф., Креницкий А. П., Майбородин А. В. и соавт. Оксид азота и электромагнитное излучение КВЧ//Биомед. технология и радиоэлектроника. — 2002. — № 10. — С. 95-108.*
14. *Киричук В. Ф., Малинова Л. И., Кренецкий А. П. и соавт. Реология крови и КВЧ-воздействие. — Саратов: Сар. СГМУ, 2003.*
15. *Креницкий А. П., Майбородин А. В., Бецкий О. В. и соавт. Квазиоптический КВЧ-генераторный комплекс моделирования детерминированных шумов для биофизических исследований//Биомед. технологии и радиоэлектроника. — 2003. — № 2. — С. 17-24.*
16. *Левин Г. Я., Шереметьев Ю. А., Яхно В. Г. Новый подход к изучению агрегации эритроцитов//Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1982. — Т. 93, № 3. — С. 94-96.*
17. *Малышев Н. Ю., Манухина Е. Б. Стресс, адаптация и оксида азота//Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 992-1006.*
18. *Реутов В. П. Оксид азота и NO-синтетазы в организме млекопитающих при различных физиологических состояниях//Биохимия. — 2000. — Т. 65, № 4. — С. 485-503.*
19. *Ройтман Е. В., Фирсов Н. Н., Дементьева М. Г. и соавт. Термины, понятия и подходы к исследованиям реологии крови в клинике//Тромбоз, гемостаз и реология. — 2000. — № 3. — С. 5-12.*
20. *Северина И. С. Растворимая форма гуанилатициклазы в молекулярном механизме физиологических эффектов оксида азота и в регуляции процесса агрегации тромбоцитов//Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1995. — № 3. — С. 230-235.*
21. *Северина И. С. Растворимая гуанилатцаклаза в молекулярном механизме физиологических эффектов оксида азота//Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 17. — С. 939-997.*
22. *Цюрюпанович В. П. Вязкость крови у практически здоровых лиц и её зависимость от величины гематокритного показателя, содержания эритроцитов и их среднего объема//Здравоохр. Казахстана. — 1979. — № 10. — С. 71-72.*
23. *Baker R. F., Clark L. J. Assay of red cell membrane deformability couth some applications//Biomed. Biochim. Acta. — 1983. — Vol. 42, № 11-12. — P. 91-96.*
24. *Belyaev J. Y., Alipov Y. D., Sheglov V. S. Chromosome DNA as a target of resonant interaction between E. coli cells and low — intersity millimeter waves//Electro and magnetobiology. — 1992. — № 11 (2). — P. 97-108.*
25. *Ignarro L. D. Biosynthesis and metabolism of endothelium — derived nitric oxide//Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. — 1990. — № 30. — P. 535-560.*
26. *Ignarro L. D., Buga G. M., Wood K. C. Activation of purified soluble guanylate cyclase by arachidonic acid requires absence of enzyme-bound hem//Biochim. Biophys. Acta. — 1987. — № 928. — P. 160-170.*
27. *Ignarro L. D., Buga G. M., Wood K. C. and al. Endothelium — derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide//Proc. Nat. Acad. Shi. USA. — 1987. — № 84. — P. 9265-9269.*
28. *Ignarro L. D., Lippton H., Edwards J. C. et al. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermedi-*

ates//J Pharmacol. Exp. Ther. — 1981. — № 218. — P. 739-749.

29. *Ignarro L. D., Murad F Nitric oxide: biochemistry, molecular biology and therapeutic implication//Adv. Pharmacol. — 1995. — № 34. — P. 1-516.*
30. *Furchgott R. F., Jothianandan D Endothelium — dependent and independent vasodilation involiving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxid and light//Blood Vassels. — 1991. — № 28. — P. 52-61.*
31. *Glaser R., Henrich H., Brumen M. et al. Ionic states and metabolism of erythrocytes//Biomed. Biochim. Acta. — 1983. — Vol. 42, №11, 12. — P. 77-80.*
32. *Kowabata A., Hata T Characterization of platelet hypofunction in rats under SART stress (repeated cold stress)//Thromb. Res. — 1993. — Vol. 69, № 2. — P. 197-207.*
33. *Naesh O., Haedersdal C., Hindberg J Platelet activation in mental stress//Clin. Physiol. — 1993. — Vol. 13, № 3. — P. 299-307.*
34. *Starzik P Effect of nitric oxide and prostacycline on deformability and aggregability of red blood cells of rats in vivo and in vitro//J Physiol. Pharmacol. — 1999. — № 50. — P. 629-637.*
35. *Takeda H. Stress — induced gastric mucosal lesion and platelet aggregation in rats//Clin. Gastroenterol. — 1992. — Vol. 14, № 11. — P. 145-148.*

ПРАКТИКА

Современные представления о преаналитике коагулологических исследований

В. А. Крюкова
Медицинская компания ОМБ

Modern conception about the impact of coagulation tests preanalytical variables

V. A. Krjukova
OMB medical company

The article is devoted to modern conception of preanalytical factors influences to the coagulation researches results quality. In this review the basic problems of correct preanalytical stage realization is considered for modern system of clinical coagulation tests. The main principles of preanalytical scheme: blood collection, blood sample storage, transportation, centrifugation and storage of the specimens for analysis, are discussed in detail for various variants of coagulation tests.

In the present article data about major factors of preanalytical coagulation tests interferences, connected to temperature, pH, mechanical influence, anticoagulants, patient blood properties, are systematized. Also difficult cases of coagulation preanalytical stage during anticoagulant therapy are considered. In the article special attention is given to detailed description of a modern technology for primary blood specimen preparation. The opportunities and advantages of vacuum blood collection systems in improvement of various coagulation tests quality are demonstrated.

In the article detailed data analysis of prevention preanalytical interferences by the choice of blood tubes type, material and internal components (a bilayer wall, sodium citrate sol., «CTAD»-system, EDTA, Aprotinin, etc.) is given. Data are systematized in two tables, in which are proposed choice variants of blood collection tubes and specific preanalytical scheme for each type coagulation researches.

Key words: *коагулология — преаналитические факторы — вакуумные коагулологические системы взятия крови — активация тромбоцитов — цитрат натрия — «CTAD» — система — coagulogy — preanalytic interferences — vacuum coagulation tubes for blood collection — platelet activation — sodium citrate — «CTAD»-system)*

ВСТУПЛЕНИЕ

Обеспечение качества преаналитической стадии коагулоло гических исследований является сложной темой, недостаточно отраженной как в справочной и методической отечественной литературе, так и в описании самих тестов по исследованию гемостаза. Хотя с каждым годом в практику специализированных лабораторий внедряется все больше тестов и потребности в них из-за распространения использования антикоагулянтов непрямого действия в последнее время существенно возросли.

Целью данной статьи является анализ основных вопросов, которые могут возникнуть у специалистов, работающих в области коагулологии, при внедрении в практику новых современных технологий подготовки к анализу проб в этой области клинических и лабораторных исследований. И в частности, возможностям и преимуществам в улучшении качества различных тестов коагулологического исследования при использовании современных вакуумных систем взятия крови.

Мы попытались в данной статье систематизировать данные по преаналитике коагулологических исследований и выработать определенные рекомендации по постановке преаналитического режима для разных типов тестов.

Современные коагулологические исследования в клинике

В настоящее время эта область клинической и лабораторной диагностики весьма интенсивно развивается. Так как фармакологическая коррекция гемостазиологических и реологических нарушений вышла за пределы специализированных гематологических центров, где занимались, в основном, наследственными патологиями гемостаза или хиругических и реанимационных отделений, где корректировали острые нарушения гипо- или гиперкоагуляции в соответствии с клинической задачей.

Внедрение в широкую кардиологическую практику антикоагулянтов непрямого действия с профилактическими целями сейчас требует значительно более широкого распространения коагулологических исследований, вплоть до районных поликлиник. В нашей стране существует серьезная, признанная в мире научная школа по данной теме, создавшая свои тесты для клинических исследований, разрабатывается собственное оборудование. В ряде лабораторий уже появились автоматические коагулолометрические анализаторы, которые, кроме клоттинговых, выполняют тесты с использованием других современных методов детекции — с использованием хромогенных субстратов или иммунохимических реагентов. В настоящее время серьезно обсуждается стандартизация данного сложного вида лабораторной диагностики. Но при этом до сих пор не возникло такого же серьезного отношения к оптимизации и стандартизации преаналитического этапа этих исследований и во всех методических руководствах оговаривается только стабилизация крови цитратом натрия. Существуют также не отвечающие современным данным рекомендации по охлаждению взятых проб крови.

Сложность правильной постановки преаналитического этапа коагулологического исследования.

Можно считать, что по преаналитической стадии выполнения коагулологические клинико-лабораторные тесты являются одними из самых сложных по постановке методов на всех этапах: от прокола вены до получения различных вариантов материала, предназначенного для лабораторного анализа и его сохранения до момента постановки теста. Это связано с тем, что в клиническом исследовании гемостаза существует очень много факторов, которые влияют на качество его конечных результатов. При этом существующем разнообразии факторов ситуация усложняется тем, что:

— сама исследуемая система представляет собой сложно организованный объект, включающий в себя компоненты разного типа, которые связаны множеством прямых и обратных связей, обладают прямым и обратным действием, с реакциями от очень быстрых (каскадного типа) до очень медленных (фибринолиз);
— это совершенно отдельная область диагностики, и разработки, сделанные, например, для методов клинической биохимии, здесь не подходят;
— это единственная область, где сочетается исследование как клеточных, так и молекулярных компонентов, а также используются интегральные тесты, включающие оба этих звена, что часто требует и разных режимов подготовки пробы;
— существует значительное число тестов, их разных вариантов, модификаций и комбинаций и при этом для каждого варианта различные факторы влияют на результат в рамках одного исследования, что может потребовать и разных режимов подготовки пробы;
— сейчас в практике КДЛ существует многовариантность этого типа исследований от одиночного определения протромбинового индекса (ПИ) до комплексного применения многих тестов, включая специфические маркеры и функциональные исследования тромбоцитов, и каждая лаборатория выбирает самостоятельно и перечень тестов и их методологию;
— эти тесты очень специфичны по используемым реактивам, по способам проведения (так базовым для многих из них является регистрация «времени реакции») и по способам детекции, и поэтому возможные преаналитические факторы влияния на результат могут быть очень разнообразны;
— нет полностью устоявшихся и регламентированных тестов, поэтому реально возникновение новых требований к преаналитике данных исследований.

Какие требования существуют для правильной постановки преаналитического этапа коагулологического исследования.

Основными принципами, по которым строится преаналитическая стадия любого лабораторного клинико-диагностического исследования, являются следующие:

1. правильное взятие материала для исследования,
2. правильный выбор типа и принцип использования «первичного контейнера» для взятия и транспортировки материала,
3. правильные условия хранения и транспортировки «первичной пробы» (температура, свет, механические воздействия, допустимое время инкубации),
4. правильные условия центрифугирования и по-

лучения различных вариантов «вторичного материала» (режимы и температура),

5. правильные условия работы с отцентрифугированным «первичным» материалом
6. правильные условия отбора и хранения «вторичного материала» (тип контейнера, воздух, свет, добавки, температура, время).

Для того, чтобы создать такую схему для коагулологического исследования, следует правильно рассмотреть и учесть ряд моментов, которые основываются на проблемах и специфике данного типа исследования, подробно изложенных в предыдущей части. Различные тесты из исследования одного пациента могут потребовать и разных вариантов преаналитического этапа по следующим моментам:

— необходимому объему исследуемого материала,
— стабилизаторам для взятия крови,
— материалам контейнеров для пробы,
— времени хранения и транспортировки пробы,
— температуре хранения и транспортировки пробы,
— условиям центрифугирования (температура, время, G, повторность),
— условиям работы с полученным «вторичным материалом» разного типа, (тип контейнера, температура, время, стабилизаторы),
— автоматизации теста и типам приборов для исследования,
— трудоемкости выполняемого регламента и соответствующего обучения и организации работы персонала на всех этапах.

В настоящее время наиболее полно эти моменты отражены в инструкциях на каждый конкретный тест, но, как правило, современной обобщенной информации на эту тему нет ни в справочниках, ни в руководствах по КЛД. Создание таких обобщенных методических рекомендаций по преаналитике коагулологических тестов является актуальной задачей настоящего момента.

Современные представления о подготовке пробы крови для коагулологического исследования

В данной главе мы постарались максимально подробно обсудить все основные моменты, связанные с выработкой подхода к созданию обобщенной современной схемы преаналитического этапа подготовки к коагулологическому исследованию на основании изложенных в предыдущей главе принципах.

Взятие пробы крови для коагулологического исследования

В отечественных руководствах это наиболее затронутая тема из преаналитического регламента. Для того, чтобы активация тромбоцитарного звена гемостаза и последующих процессов была минимальна, в этом случае существуют особые требования к венопункции [1, 2, 3].

Кровь у пациента должен отбирать специально обученный персонал. По возможности проба должна быть взята утром, натощак, путем пункции крупной вены. Для минимального повреждения форменных элементов крови следует использовать иглу с максимально большим просветом. Не следует использовать шприцы для этого типа проб. Наложение жгута должно быть не более 1 мин. Общее время венопункции также должно быть минимальным. Первая порция крови должна быть удалена, так как она содержит тканевый тромбопластин и активация внешнего пути свертывания в пробе приведет к искусственному укорочению времени тестов. В отечественных руководствах рекомендуется «спускать» первые 200–1000 мкл крови на марлевый тампон [3, 4], хотя это противоречит всем современным гигиеническим требованиям. Кровь требуется набирать в пробирку со стабилизатором (цитрат 3,8 %), прямотоком через иглу, что создает опасность инфицирования для персонала и пациента. Дополнительной проблемой для персонала является также необходимость строгого соблюдения соотношения «9:1» для объемов крови и цитрата, так как его нарушение приводит к существенному влиянию на результаты теста. Понятно, как трудно набрать до метки кровь разной вязкости «прямотоком» через иглу у разных пациентов, с разным кровяным давлением. В обычной практике отечественные коагулологические лаборатории практически не могут контролировать данный тип влияний, так как кровь отбирает процедурная сестра, которая часто не имеет информации об особенностях взятия крови для исследования гемостаза.

С учетом всех вышеизложенных требований, единственный способ, позволяющий безопасно и стандартизировано получить пробы венозной крови для коагулологических исследований — применение современных вакуумных систем для взятия крови [2], состоящих из следующих компонентов:

— двухсторонней иглы, имеющей специальную заточку, обеспечивающую минимальную травму стенки пунктируемого сосуда, исключающую попадание тромбопластина в пробу,

— держателя и специальной вакуумной пробирки, уровень разрежения в которой определяет точный объем пробы, который будет отобран.

Таким образом, наряду с выполнением правил эпидемиологической безопасности, использование вакуумных систем обеспечивает точное дозирование пробы крови с соблюдением соотношения объема крови и стабилизатора, минимальную травму клеток и активацию тромбоцитов.

Эта система также позволяет оптимизировать мультипробирочное взятие крови, что затруднительно сделать с нужной скоростью при взятии крови прямотоком. Подробнее процедура взятия крови в этом случае будет представлена ниже.

Выбор пробирки для коагулологического исследования

Выбор первичной пробирки для взятия крови для выполнения коагулологического исследования является наиболее важным моментом в преаналитическом этапе этих исследований. Важными разделами являются свойства материала пробирки, ее объем, наполнители, их количество и последовательность взятия крови в них при использовании разных пробирок для разных тестов.

Материал пробирки, ее объем и размер

Много лет лаборатории использовали для взятия крови стеклянные пробирки, которые не только были опасны для персонала (так как могли, например, разбиться при центрифугировании), но и должны были специальным образом обрабатываться для повторного использования, что могло существенно исказить результаты коагулологического теста. Несмотря на применение цитрата натрия в качестве стабилизатора, стекло вызывало «*in vitro*» активацию тромбоцитов, соответственно изменяя время свертывания крови и уровень отдельных факторов. Для того, чтобы предотвратить это влияние, стекло покрывали слоем силикона. Данный трудоемкий процесс мог быть использован для научной работы, но был плохо применим для рутинных клинических исследований.

В дальнейшем появились специальные пробирки, уже покрытые слоем силикона. Вакуумные пробирки такого типа много лет они являлись стандартом в коагулологических исследованиях. Однако уже упомянутым недостатком стеклянных пробирок является механическая хрупкость и соответствующая опасность для персонала при работе с кровью.

Внедрение пластиковых пробирок в клиническую лабораторную диагностику решило проблему безопасности персонала, облегчило условия транспортировки проб и их центрифугирования. Хотя на первом этапе, после появления этого типа пробирок, появились сообщения о ряде негативных влияний на результаты, связанных с ними. В частности, сообщалось об удлинении времени клоттинговых тестов, а также и об изменении уровня отдельных факторов коагуляции. Обсуждался вопрос о поверхностной in vitro активации факторов, взаимодействии материала пробирки с антитромботическими агентами, а также о возможных проблемах проницаемости пластиков для жидкостей и газов, что может вызывать интерференции за счет изменения объемного соотношения «9:1» для крови и цитрата натрия, рабочей концентрации цитрата натрия или pH пробы [5].

Основным материалом для производства пластиковых вакуумных систем является полиэтилентерефталат. Это связано с его малой газопроницаемостью при хорошей механической устойчивости. Этот материал в целом не уступает в свойствах гемосовместимости силикону или полипропилену и не вызывает существенной активации тромбоцитов. Поэтому наиболее вероятной причиной отрицательных влияний на результаты теста является все же «испарение жидкости» при хранении пробирок, вызывающее увеличение концентрации цитрата натрия в них. Вопрос о влиянии концентрации цитрата натрия на некоторые типы коагулологических тестов будет рассмотрен ниже.

Производители вакуумных систем для взятия крови уделяют большое внимание выработке оптимального варианта взятия материала для каждой области лабораторных исследований, чтобы избежать возможных отрицательных влияний на результаты каждого теста. Частично проблема «испарения жидкости» решается при использовании специально разработанных «антиаэрозольных» крышек для пластиковых пробирок. В последние годы проблема стабильности концентрации цитрата натрия в вакуумных пробирках и также возможной активации тромбоцитов была решена путем разработки специальной пробирки с двухслойной стенкой типа «Сэндвич» [6]. Основным достоинством этих пробирок является внутренний слой из полипропилена, который предотвращает испарение жидкости, и объем цитрата натрия остается стабильным в течение длительных сроков хранения (до 12 месяцев). Полипропилен также обеспечивает отсутствие контактной активации тромбоцитов на стенке пробирки и является наиболее оптимальным вариантом для коагулологических тестов.

Вакуумные системы для взятия крови позволяют при одинаковых внешних размерах проводить взятие крови разного объема при точном выполнении условия о сохранении соотношения «9:1». Это осуществляется стандартизацией уровня разрежения в вакуумной пробирке и, соответственно, объема крови и заданного объема жидкого стабилизатора. Для потребителя существует возможность точно рассчитать объем отбираемой для исследования крови в соответствии с типом тестов, выбрав пробирки разного типа от 1 до 10 мл (с интервалом в 0,5–1 мл) и с разным типом наполнителей и разными свойствами пробирки. При этом размеры пробирок являются стандартными, что позволяет их удобно транспортировать в специальных контейнерах и правильно центрифугировать в подвесных роторных системах.

Объем пробирок должен быть выбран, исходя из точного расчета количества плазмы крови, необходимого на каждый тест, так как особенностью многих коагулологических тестов (особенно рутинных) является достаточно большой объем материала для исследования.

Особо следует обратить внимание на пробы маленького объема (1–2 мл), в том числе педиатрические. Необходимо учитывать, что могут возникнуть отрицательные влияния на результаты теста, связанные с активацией тромбоцитов на поверхности пробирок, если соотношение объем пробы к поверхности будет уменьшено, так как вакуумная пробирка имеет при малом эффективном объеме пробы стандартный размер, вмещающий 4–5 мл жидкости. Выход в плазму крови тромбоцитарного фактора 4 может нейтрализовать часть свободного гепарина и привести к укорочению АЧТВ [7]. Поэтому в этих случаях рекомендуется использовать двухслойные пробирки с внутренним слоем из полипропилена.

Последние исследования показали, что полимерные пробирки «Сэндвич» — типа являются более приемлемыми для современных тестов, так как вызывают меньшую контактную активацию тромбоцитов, чем аналогичные стеклянные пробирки [8].

РОЛЬ НАПОЛНИТЕЛЕЙ ПРОБИРКИ

Цитрат натрия

Растворы цитрата натрия являются в настоящее время общепринятым стандартом для данного вида исследований. Цитрат натрия действует в пробе как антикоагулянт, связывая ионы кальция, но в отличие от ЭДТА он не вызывает изменения клеток. Используется раствор, при котором происходит дозированное разведение отбираемой в пробирку крови и соответствующее разведение стабилизированной цитратом плазмы. Принятым стандартом для коагулологических исследований в настоящее время следует также считать точное пропорциональное соотношение крови и цитрата натрия «9:1» [9].

Желательным также является добавление нейтральных буферов в систему, так как изменения pH в кислую сторону, которое еще может усилиться из попадания в пробы углекислоты из воздуха, может вызвать нежелательные возможные отрицательные влияния на результаты выполняемых из них тестов. Раствор также должен быть стерильным, так как бактерии вызывают изменения pH пробы и выделяют факторы, которые могут вызвать активацию клеток крови и повлиять на результат. Проблема данных интерференций хорошо известна в тех КДЛ, которые не используют стерильные вакуумные системы для коагулологии. Даже при хранении в холодильнике цитрат быстро меняет свои свойства.

Современные вакуумные пробирки для коагулологии содержат стерильный раствор цитрата натрия, «забуфференый» до оптимального для таких исследований нейтрального pH = 7,1–7,4. В сочетании с точным соблюдением пропорции «9:1», пользователи могут быть уверены, что исследования стандартизованы и будут иметь минимум пробирочных отрицательных влияний на результат. Для вакуумных пробирок фирмы «Greiner Bio One» специальные исследования показали на значительном статистическом материале, что на протяжении всего срока годности пробирок с цитратом натрия (12 мес.), результаты как скрининговых, так и специальных коагулологических тестов не меняются [10].

До сих пор не ясным для пользователей является вопрос о том, какая концентрация цитрата натрия должна быть использована для коагулологического исследования — 3,8 % (129 Ммоль/л) или 3,2 % (109 Ммоль/л). Было доказано, что высокая концентрация цитрата может вызывать изменения в результатах скрининговых протробминовых тестов и АЧТВ при использовании чувствительных реагентов (тромбопластина, актина, инновина) с удлинением времени теста [11, 12]. Причем этот эффект усиливается при хранении пробы. В национальных стандартах США рекомендовано использовать именно концентрацию цитрата натрия 3,2 % для скрининговых тестов [13, 14]. Однако до сих пор разные лаборатории в мире используют разные варианты концентраций. Поэтому производители пробирок оставляют выбор концентрации на усмотрение пользователей и предлагают оба варианта концентраций.

Но все же если используются вакуумные системы взятия крови и сохранение «9: 1» соотношения гарантировано, оптимально использовать концентрацию цитрата натрия 3,2 %, как вызывающую меньшее отрицательное влияние на результаты таких тестов, как МНО (INR) или определение протромбинового времени, что сейчас особенно важно при проведении контроля за анатикоагулянтной терапией.

Объемное соотношение цитрата натрия и крови следует откорректировать в тех случаях, когда гематокрит пациента выше 55 %. При этом «эффективный объем цитрата» для получающегося объема плазмы оказывается избыточным и вызывает удлинение времени клоттинговых тестов (АЧТВ) [15]. В этих случаях рекомендуется рассчитать оптимальный объем цитрата натрия (X) по формуле и корректно взять кровь:

$$X = (100 - Ht) \times V / (595 - Ht),$$

где Ht — гематокрит, V — объем пробы крови

В отечественных руководствах этой коррекции уделяют очень большое внимание. Даже приводится отдельная таблица пересчета объема цитрата натрия в зависимости от гематокрита пациента [16]. Однако эти данные приводятся только для концентрации цитрата 3,8 Ммоль/л. Причиной удлинения АЧТВ и ПВ при этом является избыточное связывание ионов кальция в плазме из-за избытка цитрата [15]. Переход в работе на более низкую концентрацию цитрата при точном дозировании крови в вакуумных системах в целом должно снизить это возможные отрицательные влияния на результаты АЧТВ теста. При этом только в редких случаях данная коррекция действительно будет необходима. Для определения же отдельных факторов свертывания другими методами данное разведение цитратной плазмы не имеет значимого отрицательного влияния.

Отдельной проблемой является проведение клоттинговых тестов у новорожденных, где из-за гипокоагуляции рекомендуется снизить соотношение крови и цитрата до «1: 19» В этом случае, возможно, следует использовать «открытые системы» взятия крови и на заданный в пробирке объем цитрата добавить откорректированный объем крови, умножив предлагаемый объем на 2,1.

Буферная стабилизационная система «CTAD».

Буферная стабилизационная система «CTAD» является новой разработкой для улучшения исследования плазменного звена гемостаза. Она предназначена для чувствительных тестов и удлиненных сроков транспортировки. В дополнение к буферному раствору цитрата натрия пробирка содержит смесь «Теофиллин, Аденозин, Дипиридамол». Данные вещества ингибируют активацию тромбоцитов «в пробирке». Это предотвращает выход тромбоцитарных факторов свертывания после активации тромбоцитов на искусственных поверхностях системы взятия крови и пробирки, контакте с воздухом и механических воздействиях.

«CTAD» — пробирки рекомендуется использовать для особо чувствительных тестов: как факторы тромбоцитов, концентрация свободного гепарина, ингибитор активатора плазминогена и другие, кроме тестов по исследованию функций тромбоцитов. Особо рекомендовано использовать эти пробирки для пациентов, получающих активную антикоагулянтную терапию. Эти пробирки также имеют двухслойную стенку типа «Сэндвич», что дополнительно снижает активацию тромбоцитов и улучшает условия хранения проб крови.

Производители современных тестов специально рекомендуют использовать пробирки, содержащие стабилизаторы тромбоцитов, например «CTAD», для определения некоторых аналитов. Особенно таких, как «Ингибитор активатора плазминогена первого типа (PAI-1)», который сейчас является новым маркером вероятности развития тромботических осложнений в тяжелых клинических ситуациях [17].

Этот тип наполнителя вакуумных пробирок также оптимален во всех случаях, когда выполняются редко используемые тесты и проба пациента должна быть сохранена без изменений до момента анализа. Преаналитическая подготовка образца для исследования в этом случае требует высокоскоростного центрифугирования с получением свободной от тромбоцитов плазмы без их повреждения для глубокого (ниже «–20°С») замораживания, например, для анализа таких нестойких факторов коагуляции, как факторы V и VIII [18].

К2-ЭДТА

Пробирки именно 1,8 мг/мл К2-ЭДТА вместо К3-ЭДТА должны быть использованы для исследования морфологии тромбоцитов и для тромбоцитограммы, которое проводятся одновременно с исследованиями функций тромбоцитов. Было показано, что К3-ЭДТА вызывает отрицательное влияние на состояние клеточных мембран тромбоцитов, с соответствующим изменением их формы и размера [19].

К2-ЭДТА-пробирки также могут быть использованы для некоторых других тестов, таких как измерение активности «Активатора плазминогена» (PA). Пробирки содержат равномерно нанесенную на стенку пробирки сухую соль К2-ЭДТА, концентрации которой достаточно для торможения активности фермента PA [15].

ЭДТА-Апротинин

Особый тип взятия крови может потребоваться при необходимости проведения мониторинга активной противотромботической и фибринолитической терапии препаратами стрептокиназы или урокиназы. Эти препараты являются сильными протеолитическими ферментами и, находясь в пробе крови, могут сильно исказить результаты коагулологических тестов.

Поэтому при тромботической терапии стрептокиназой или урокиназой для мониторинга кровь рекомендуется отбирать в пробирки, содержащие смесь соли ЭДТА (4,2 ммоль/л) в комбинации Апротинином [20]. Существует вариант такой вакуумной пробирки, которую используют для взятия крови для тестов на нестабильные пептиды и гормоны. Апротинин является ферментным ингибитором. Поэтому он немедленно ингибирует активацию плазмина, вызванную внутривенными ферментными лечебными препаратами, и позволяет стабилизировать кровь таких пациентов для коагулологического анализа.

Активаторы свертывания

Естественно, исследование коагулологических параметров не может быть проведено в сыворотке. Даже при определении отдельных белковых факторов коагуляции при помощи высокоспецифичных методов иммуноферментного анализа производителями тестов не рекомендуется использовать в качестве рабочего материала сыворотку, что указано, например, в инструкции набора для определения «D-димера», маркера оценки системы фибринолиза.

Но есть одно важное исключение из общего ряда коагулологических тестов, для которого нельзя использовать цитратную плазму. Это тесты для определения Продуктов деградации фибриногена и фибрина (ПДФ-продукты), других маркеров фибринолитической системы. Поэтому кровь для определения ПДФ-продуктов отбирают в вакуумную пробирку с кремниевым активатором свертывания, куда потом добавляют смесь из 10 ед. тромбина и 1835 ед. соевого ингибитора трипсина [15].

Сорбенты гепарина

Добавки также могут быть внесены на следующем после центрифугирования во вторичную пробирку со стабилизированной цитратом плазмой. Одним из таких важных методов является сорбция гепарина при помощи специальных сорбентов «Гепасорб»[21]. Присутствие гепарина в плазме крови пациента, получающего лечение этим препаратом, существенно осложняет проведение ему коагулологического исследования. Кроме скрининговых тестов показано отрицательное влияние на результаты тестов измерения концентрации фибриногена [22]. Специфический сорбент связывает в пробирке введенный пациенту гепарин, который удаляется в осадок при центрифугировании. Это позволяет при определении тромбинового времени провести мониторинг гепаринотерапии, а так же адекватно определить концентрацию фибриногена и активность AT III в этих пробах.

Пробирки без добавок и пробирки, содержащие гепарин лития

В настоящее время вновь стал появляться интерес клиницистов к интегральным коагулологическим тестам, когда реакция свертывания происходит в цельной крови, а не в плазме. Это связано с тем, что большинство из используемых сейчас тестов оценивают или отдельный фактор, или небольшой участок очень сложной системы, какой является «свертывающая-противосвертывающая система» [23]. Конечно, в современных условиях уже никто не вернется к измерению времени кровотечения или свертыванию капли крови на часовом стекле, но необходимость в подобных интегральных тестах имеется, и они продолжают разрабатываться. Так, разработан тест для оценки первичной функции тромбоцитов, когда оценивают время окклюзии под давлением при активации тромбоцитов в искусственном микрососуде [24]. Также происходит вновь возвращение к методам тромбоэластометрии. Для этих тестов требуется разработка специальной программы подготовки пробы крови из-за их специфики. В проекте соглашения специалистов по клинической гемореологии стран СНГ об унификации методов вискозиметрии и аггрегатометрии в качестве материала для исследования указывается венозная кровь, стабилизированная гепарином (10-20 Ед/мл), трилоном В или ЭДТА. Однако последние два агента известны своим влиянием на состояние клеточных мембран и, по современным данным, не подходят для использования в динамических тестах с участием клеток.

Идеальным было бы сохранение образца цельной крови без добавок до момента его исследования. Вакуумные двухслойные пробирки с внутренней полипропиленовой стенкой без добавок являются наиболее подходящим вариантом для взятия цельной крови для такого исследования, если можно обеспечить короткий промежуток времени между взятием крови и проведением анализа, так как они вызывают наименьшую активацию тромбоцитов. При невозможности быстрого проведения тестов оптимальным будет взятие крови в вакуумные пробирки с гепарином лития, которые обычно используют для анализа электролитов.

Взятие крови в двухслойные вакуумные пробирки с внутренней полипропиленовой стенкой без добавок также подходит для выполнения быстрых тестов на активированное время свертывания (ACT). Эти тесты используют для контроля введения гепарина при лечении больных при помощи искусственных органов и во время операций и на открытом сердце с использованием систем искусственного кровообращения. Тест основан на строго стандартизированной активации свертывания в цельной крови при помощи специальной добавки — целлита, а также смеси «целит-каолин-стеклянные шарики» для больших доз гепарина. В специальном анализаторе определяют начало и конец образования сгустка. В силу известной канцерогенности компонентов пробирок для данного теста, в частности целлита, пробы крови должна быть сначала набрана промежуточную пробирку или шприц и потом перенесена в тест-пробирку. При этом преаналитическая активация тромбоцитов должна быть минимальной [25].

В **таблице 1** приведены возможные варианты выбора первичных вакуумных пробирок разного типа для разных коагулологических тестов. В ней суммированы приведенные в предыдущей главе сведения. В тех случаях, когда указано несколько типов пробирок, пользователь может выбрать вариант для своих конкретных преаналитических условий, времени хранения проб, необходимости замораживания. При необходимости длительного срока хранения пробы и необходимости использования высокоскоростного центрифугирования для отделения тромбоцитов желательно выбрать пробирки со «CTAD» — системой. Желательно также выбирать, за исключением педиатрических проб, тот тип пробирки, в котором их общий объем заполнения максимален для данного размера, например:

- 3,5 мл — для двухслойных пробирок размера 13×75 мм,
- 5,0 мл — для стандартных пробирок размера 13×75 мм,
- 9,0 мл — для стандартных пробирок размера 16×100.

Это позволит максимально уменьшить отрицательные влияния, связанные с контактной активацией тромбоцитов в пробах крови.

Последовательность пробирок при взятии крови

Возможности вакуумного взятия крови и современный выбор пробирок позволяют вместо одной пробирки для всех тестов взять несколько с разными наполнителями и сразу в разных преаналитических режимах их обрабатывать, сохранив общий объем крови небольшим. Коагулологические тесты являются чувствительными к большинству других добавок (гепарин, ЭДТА, активаторы свертывания), которые могут содержать вакуумные пробирки, предназначенные для других областей лабораторной клинической диагностики. Поэтому важным принципом является последовательность взятия крови при выполнении данного типа исследований.

Таблица 1.

Основные современные коагулологические методы и рекомендованный для них тип пробирок фирмы Greiner Bio One

Тесты плазменного звена коагуляции	Тесты тромбоцитарного звена коагуляции	Тесты системы фибринолиза
Скрининг-тесты (Тип пробирки — «Стандартная с 3,2 %-натрия цитратом») -Протромбиновое время или МНО (внешний путь) -Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)(внутренний путь) -Тромбиновое время (формирование фибрина из фибриногена) -Рептилазное (батроксобин) время **Определение факторов коагуляции (V,VII, VIII, IX, XI, XII, XIII) (Тип пробирки — «С двойной стенкой и CTAD-системой.») «С двойной стенкой и 3,2 %-натрия цитратом»)** -активность -концентрация **Маркеры активации коагуляции (Тип пробирки — «С двойной стенкой и CTAD системой ») «С двойной стенкой и 3,2 %-натрия цитратом»)** -Протромбиновый фрагмент 1+2 -Тромбин-антитромбин III комплекс (ТАТ) -Фибрин-мономеры -Фибринопептиды - D-димер **Ингибиторы (Тип пробирки — «С двойной стенкой и CTAD системой ») «С двойной стенкой и 3,2 %-натрия цитратом»)** -Антитромбин III -Протеин С -Протеин S -патологические ингибиторы	**Тромбоцитограмма (Тип пробирки — «Стандартная с К2-ЭДТА»)** -число -средний объем -распределение по размерам **Тромбоцитарные факторы (Тип пробирки — «С двойной стенкой и CTAD системой »)** -Тромбоцитарный фактор 3 -Тромбоцитарный фактор 4 -Бета2-тромбоглобулин **Тесты исследования функции тромбоцитов (Тип пробирки — «С двойной стенкой и 3,2 %-натрия цитратом»)** -время свертывания -адгезия -активация с увеличением поверхности -аггрегация -ретракция **Интегральные тесты (Тип пробирки — «С двойной стенкой и без добавок»** -Время свертывании -Активированное время свертывания **(Тип пробирки — «С двойной стенкой и без добавок» « С Li-гепарином для плазмы»)** -интегральный тромбоцитарный тест -тромбоэластометрия **Специальные тесты (Тип пробирки — «С двойной стенкой и CTAD системой »)** -свободный гепарин	**Скрининг-тесты (Тип пробирки — «Стандартная с 3,2 %-натрия цитратом»)** -Фибриноген дифференциальный тест -Фибринолитическая активность - Эуглобулиновый лизис -Тромбиновое время (формирование фибрина из фибриногена) -Рептилазное (батроксобин) время **Определение факторов фибринолиза (Тип пробирки — «С двойной стенкой и CTAD системой ») «С двойной стенкой и 3,2 %-натрия цитратом»)** -Плазминоген -Тканевый плазминогеновый активатор (t-PA) **Маркеры активации фибринолиза (Тип пробирки — «С двойной стенкой и CTAD системой »)** -D-димер -Комплекс Плазмин-а2-антиплазмин (PAP) **(Тип пробирки — «С активатором свертывания для сыворотки»)** -продукты деградации фибрина -продукты деградации фибриногена (ПДФ) **Ингибиторы (Тип пробирки — «С двойной стенкой и CTAD системой »)** -а2—Антиплазмин -Ингибитор активатора плазминогена (PAI) -С1 – ингибитор

Оптимальным вариантом будет, если коагулологические пробирки будут следовать за пробиркой «без добавок» и перед пробиркой «для сыворотки». При этом первая в панели пробирка «без добавок» в большинстве случаев, кроме ПЦР-исследований, не используется для анализа. Но она необходима для предотвращения контаминации следующих за ней коагулологических проб тканевым тромбопластином после венепункции и заменяет метод «первой порции крови на марлевый тампон», приводимый в отечественных руководствах.

Можно также использовать стандартные пробирки для получения сыворотки в качестве первых в серии, если кроме коагулологического, больному назначены и биохимические анализы. Для отдельных скрининговых клоттинговых тестов, как протромбиновое время, пробирка с цитратом для коагулологии может быть первой, без использования пустой. При этом пробирки для более чувствительных коагулологических тестов будут следовать за ней, и возможных отрицательных влияний на результаты теста не будет.

Следует также учитывать, что отрицательное влияние, связанное с попаданием в пробу крови тканевого тромбопластина, уже значительно снижена при использовании современных игл с особой низко травматической заточкой, какие используются в современных вакуумных системах. Увеличение объема заполнения в первой из ряда коагулологических пробирок также снижает риск данного отрицательного влияния.

Кроме пробирок, содержащих цитрат натрия и «CTAD», в коагулологическом исследовании могут быть необходимы также другие типы пробирок для отдельных тестов — с ЭДТА для тромбоцитограммы и с активаторами свертывания для ПДФ продуктов, а также, возможно, с гепарином лития для тромбоэластографии.

В **таблице 2** приведены предполагаемые нами возможные варианты схем взятия крови для разных вариантов проведения коагулологического исследования с правильной последовательностью взятия крови в вакуумные пробирки разного типа.

Обработка пробы крови.
Условия для первичной пробы крови (температура, механические воздействия, время до анализа, контакт с воздухом) являются очень важными для правильного выполнения коагулологических тестов. О возможных отрицательных факторах должны иметь представление не только сотрудники лаборатории, где выполняется данный вид анализов, но и медицинские работники, осуществляющие взятие крови и доставку ее в лабораторию.

Использование вакуумных систем в значительной степени стандартизирует саму процедуру взятия крови и позволяет избежать многих интерференций. Именно для коагулогических тестов обязательным условием должна быть отметка времени взятия крови на каждой пробирке.

На месте персонал должен проверить правильность заполнения пробирки до метки (в случае исследования гемостаза это особенно важно). После этого следует осторожно перемешать пробу, 4–5-кратным покачиванием, не переворачивая и не взбалтывая (несоблюдение этих правил именно для коагулологических проб может стать источником для существенных искажений результатов, так как приводит к активации тромбоцитов).

Время транспортировки проб крови в специализированную коагулологическую лабораторию должно быть максимально коротким и не превышать 45 мин [11, 13]. В отдельных случаях сложных тестов, выполняемых только в крупных лабораториях это время может быть удлинено при взятии проб в пробирки «Сэндвич» — типа и в пробирки со стабилизатором СТАД, но возможность временных отрицательных влияний на результаты конкретного теста должна быть проверена.

Важным моментом является герметичность пробирок. На всех этапах допускается транспортировка и хранение коагулологических проб только в закрытых пробирках, чтобы избежать испарения летучих карбоновых кислот, приводящего к изменению pH в пробе. Контакт с воздухом также приводит к активации тромбоцитов [8].

Любой ценой также следует избегать воздействия высокой температуры и прямого действия солнечных лучей [15], поэтому лучше сразу поместить пробы в термоконтейнер без охлаждения. К сожалению, предыдущие требования плохо отражены в отечественных руководствах по коагулологическим исследованиям. Нет также четкости в регламенте на температуру транспортировки проб, но есть ошибочные рекомендации по их охлаждению. Хотя по современным данным из-за возможной «холодовой» активации факторов VII, XI и XII может произойти сокращение времени свертывания в соответствующих скрининговых тестах. Поэтому образцы не следует хранить в холодильнике или помещать на лед. [11, 15]

Для рутинных скрининговых тестов и исследований функций тромбоцитов образцы крови следует транспортировать при комнатной температуре (22–24°C), но отдельные типы тестов все же требуют охлаждения. Такие требования возникают для важного диагностического параметра — фактора VIII. Чтобы избежать отрицательных влияний на результаты, пробу крови для теста по определению VIII фактора нужно транспортировать и центри-

Таблица 2.

Предполагаемые варианты схем взятия крови для разных типов коагулологических исследований

1 схема.	**Скрининг тесты плазменного звена коагуляции и фибринолиза** + (возможно) маркер коагуляции АТ III) 1 пробирка: «пустая»* 2 пробирка: с цитратом натрия
2 схема.	**Скрининг тесты плазменного звена коагуляции и фибринолиза** **+ тесты тромбоцитарного звена коагуляции** 1 пробирка: «пустая» 2 пробирка: с цитратом натрия 3 пробирка: с цитратом натрия (для тромбоцитарных тестов)** 4 пробирка: гематологическая с ЭДТА для тромбоцитограммы***
3 схема.	**Развернутое коагулологическое исследование без исследования тромбоцитарного звена коагуляции.** 1 пробирка: «пустая»* 2 пробирка: с цитратом натрия (скрининг тесты) 3 пробирка: с цитратом натрия (для специальных тестов — факторы, маркеры, ингибиторы)** 4 пробирка: (если необходимо) с цитратом натрия и CTAD-системой (для чувствительных тестов и для длительного хранения проб)** 5 пробирка: с активатором свертывания (если необходимо) для определения «продуктов деградации фибриногена и фибрина»****
4 схема.	**Развернутое коагулологическое исследование + исследование тромбоцитарного звена коагуляции.** 1 пробирка: «пустая»* 2 пробирка: с цитратом натрия (скрининг тесты) 3 пробирка: с цитратом натрия (для специальных тестов — факторы, маркеры, ингибиторы)** 4 пробирка: (если необходимо) с цитратом натрия и CTAD-системой (для чувствительных тестов и для длительного хранения проб)** 5 пробирка: с цитратом натрия (для тромбоцитарных тестов)** 6 пробирка: гематологическая с ЭДТА для тромбоцитограммы***

*Примечания: * пробирка может быть также использована для проведения интегральных тестов свертывания крови;*
*** оптимально использовать двухслойные пробирки типа «Сэндвич» с внутренним слоем из полипропилена;*
**** оптимально использовать К2-ЭДТА-пробирки.; **** для этих тестов нельзя использовать стабилизированную цитратом плазму.*

фугировать при температуре не более 4°С, и затем, после центрифугирования, свободную от тромбоцитов плазму для этого теста следует заморозить в низкотемпературном холодильнике.

Разделить стадии инкубации для разных типов тестов по температуре следует во время создания регламентов по взятию крови. Пробирка, в которой проба должна быть охлаждена, следует промаркировать заранее.

Транспортировка проб для коагулологических анализов должна быть максимально осторожной, без взбалтывания и соблюдением всех вышеуказанных правил.

При поступлении образцов крови в лабораторию должна быть проверена пригодность проб для коагулологического анализа. При наличии сгустков, кластерных участков в клеточной суспензии и следов гемолиза результаты тестов будут ошибочны, так как *in vitro* уже произошли изменения параметров свертывающей системы в пробирке.

Эти пробы следует отсеять. Хилезные и окрашенные образцы крови должны обрабатываться и анализироваться осторожно, так как вероятность отрицательных влияний на результат в них существенно возрастает. Такие образцы желательно подвергнуть ультрацентрифугированию с получением свободной от тромбоцитов плазмы для проведения особо чувствительных тестов.

Центрифугирование

Так же, как и для всех предыдущих стадий подготовки пробы для коагулологического исследования, для центрифугирования проб существует своя особая специфика. Так для разных типов тестов этого исследования требуются разные типы материала. Центрифугировать коагулологические пробы крови следует согласно регламенту выполняемого теста с получением соответствующего типа «цитратной плазмы» в центрифугах с подвесным ротором.

Ниже приведены три типа плазмы крови для исследования и правильные режимы их получения при помощи центрифугирования:

Плазма, обогащенная тромбоцитами (PRP) (РЕЖИМ — 5 мин. при 150 g):

Эта плазма используется только для выполнения функциональных тестов тромбоцитов (агрегации, адгезии, трансформации). Оптимальным вариантом является отдельная пробирка с цитратом для этих исследований. Одна часть обогащенной плазмы отбирается для выполнения тестов, а вторая повторно центрифугируется для получения бедной тромбоцитами плазмы (PPP), которая является контролем для данных тестов. Материал нежелательно охлаждать. В российских руководствах рекомендуется также использовать этот материал для определения коалинового времени и некоторых исследований фибринолиза.

Плазма, бедная тромбоцитами (PPP) (РЕЖИМ — 10 мин. при 1500-2000 g):

Эта плазма является основным материалом для скрининговых тестов коагуляции и фибринолиза, а также для определения факторов, маркеров и ингибиторов различных звеньев свертывающей системы при помощи тестов разного типа.

Плазма, свободная от тромбоцитов (PFP) — (РЕЖИМ — 20 мин. при 2000-3000 g):

Эта плазма в целом соответствует бедной тромбоцитами плазме, но содержит менее 5000 тромбоцитов в мкл. Она предназначена для случаев, когда материал требуется заморозить из-за невозможности его быстрого исследования, так как замораживание вызывает травму клеток и выброс их факторов в пробу с соответствующим изменением результатов тестов. Этот вид материала также оптимален для сложных высокочувствительных тестов, таких как ингибиторы факторов и факторы тромбоцитов. Она может быть получена из CTAD-пробирок.

Использование охлаждения при центрифугировании должно проводиться строго для тех отдельных тестов, где это необходимо (фактор VIII). В остальных случаях его следует исключить.

Время и условия хранения вторичного материала

Если скрининговые тесты будут выполнены быстро, отцентрифугированный образец плазмы может хранится при комнатной температуре и плазму можно оставить поверх осадка клеток после центрифугирования перед анализом. Желательно провести все тесты из отобранной после центрифугирования цитратной плазмы в период от 1 до 3 часов после взятия крови. После 4 часов хранения отрицательные влияния, особенно при концентрации цитрата 3,8 %, даже при соблюдении всех остальных правил, существенно возрастают. Для пациентов, получающих терапию гепарином, рекомендуется отцентрифугировать пробы крови и отделить плазму от клеток в течение одного часа после взятия крови и провести тесты не позднее, чем через 2 часа после взятия крови [11, 13, 15].

Хранение вторичного материала для коагулологических тестов желательно проводить в полипропиленовых микро пробирках с герметичными крышками. Объем воздуха под крышкой должен быть минимален. Крышки должны быть плотно закрыты в течение всего времени до начала анализа для предотвращения изменений pH, связанных с испарением летучих карбоновых кислот.

Также следует избегать воздействия высокой температуры (включая прямые солнечные лучи) и желательно вторичные пробирки тоже поместить в термоконтейнер до нала анализа. Из-за возможной «холодовой» активации факторов VII, XI и XII, которая может вызвать снижение времени свертывания в соответствующих скрининговых тестах, образцы не следует хранить в холодильнике. Пробы свободной от тромбоцитов плазмы для хранения более 12 часов следует заморозить в закрытых вторичных пробирках при температуре не менее — 20°С, а для некоторых высокочувствительных тестов и при — 80°С [11, 13, 15].

Замороженные образцы перед анализом следует размораживать быстро на водяной бане при 37оС и тщательно перемешивать, добиваясь, чтобы все криопреципитаты полностью растворились. Повторное размораживание и замораживание образцов не рекомендуется [15].

Следует учесть, что в патологической плазме, содержащей мономеры фибрина, продукты деградации фибрина или гепарин, могут возникнуть отрицательные влияния на результаты тестов, связанные с образованием «гелеподобных структур» или конденсации липопротеидов после размораживания пробы. Так, присутствие фибринмономеров в таких образцах плазмы после размораживания может вызвать удлинение протромбинового времени, АЧТВ и рептилазного времени, а наличие гепарина или ПДФ-продуктов наоборот — укорочение времени в данных тестах [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные коагулологические исследования представляют собой систему из сложных наукоемких методов. Для улучшения качества их выполнения и исключения нежелательных отрицательных влияний на результаты анализов врачам и работникам лабораторий следует серьезно подходить к преаналитической стадии их выполнения и использовать современные материалы и методологии работы с пробами крови пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ковальчук Ю.П., Божкова С.А.- Рекомендации по ведению преаналитического этапа клинических лабораторных исследований - Санкт-Петербург, 2004, стр. 24-25.*
2. *Руководство по проведению преаналитического этапа лабораторных исследований (пособие для врачей по редакцией. профессора. В.Л.Эммануэля) - Санкт-Петербург, 2006, стр. 23-25, 34-39.*
3. *Справочник: Медицинские лабораторные технологии (в двух томах под редакцией А.И. Капищенко) - Санкт-Петербург, «Интермедика», 2002, т.2, стр. 160-162*
4. *Мошкин А.В., Долгов В.В. - Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике: Практическое руководство - Москва, «Медиздат», 2004, стр. 35-39*
5. *Duncan E.M., Casey S.R., Duncan B.M. et al. - Effect of concentration of trisodium citrate anticoagulant on calculation of the international normalized ratio and the international sensitivity index of thromboplastin - Thromb. haemostas., 1994, v.72, suppl.1, p. 84-88*
6. *Vacuette Sandwich coagulation tube - Clinical Documentation «VACUETTE», Greiner Bio One information (GBO.com), 2006*
7. *Siegel J.E., Bernard D.W., Swami V.K. et al. – Monitoring heparin therapy: APTT results from partial vs. full-draw tubes – Am J Clin Pathol, v.110, p.184-187*
8. *Narayanan S.-Inhibition of in vitro platelet aggregation and release and fibrinolis - Ann Clin Lab Sci, 1989, v.19, p. 260-265*
9. *Морозова В.Т., Андреева Н.А. - Лабораторная диагностика нарушений гемостаза (пособие для врачей КЛД кафедры РМАПО МЗ РФ) -Москва, 1997, стр. 22-28, 50-65*
10. *Toulon P, Aillaud M-F, Arnoux D. et al. - Multicenter evaluation of a bilayer polimer blood collection tube for coagulation testing: effect on routine hemostasis test results and on plasma levels of coagulation activation markers - Clinical Documentation «VACUETTE», Greiner Bio One information (GBO.com), 2006*
11. *Worfolk L. - Pre-analytical variables of coagulation testing- «Advance for administrators of the laboratory», Aug. 2003, p. 4-23*
12. *Дугина Т.Н., Косырев А.Б.- Стандартизация протромбинового теста: проблема контрольной плазмы - Лабораторная медицина, 2003, N 6, стр. 12-15*
13. *Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays - NCCLS document H21-A4, 2003, v.23, N 35*
14. *One-stage protrombine time (PT) test and activated partial tromboplastin time (APTT) test - NCCLS document H47-A, 1996, v.21, N 22*
15. *Гудер В.Г., Нарайанан С., Виссер Г., Цавта Б.- Пробы: от пациента до лаборатории - Москва, «Gerda Group», 2001, стр. 52-55.*
16. *Обеспечение качества лабораторных исследований (справочное пособие под редакцией В.В.Меньшикова) - Москва, «Лабинформ», 1999, стр. 252-263.*
17. *Narayanan S. - Preanalytical aspects of coagulation testing - Haematogica, 1995, v. 80, suppl.2, p. 1-6*
18. *Фридецкий Б., Кратохвила И., Горак И. с соавт. - Преаналитический этап лабораторного исследования (перевод с чешского) - Пардубице, 1999, стр. 56 – 59*
19. *Recommendation of the international council for standardization in haematology for EDTA anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing - Am J Clin Patol, 1993, v. 100, p. 371-372*
20. *Narayanan S., Hamasaki N. - Current concepts of coagulation and fibrinolisis - Adv Clin Chem, 1999; v.33, p.133-68*
21. *Долгов В.В., Авдеева Н.А., Щетинкович К.А. - Методы исследования гемостаза (пособие для врачей КЛД кафедры РМАПО МЗ РФ)- Москва, 1996, стр. 26-29*
22. *Procedure for the determination of fibrinogen in plasma - NCCLS document H30-A2, 2003, v.23, N 18*
23. *Исследование системы крови в клинической практике (под редакцией Г.И. Козинца и В.А. Маканина) - Москва, «Триада-Х», 1998, стр. 335-343*
24. *Вельков В.В. - Интегральные тесты гемостаза - Лаборатория, 2005, N4, стр. 9-12*
25. *Espana F., Ratnoff O.D. - Activation of hageman factor (FXII) by sulfatides and other agents in the absence of plasma proteases - J lab clin Med, 1983, v. 102 (4), p. 31-45*

Уважаемый коллега!

С 2006 года подписаться на журнал **«Тромбоз, гемостаз и реология»** возможно по каталогу **Роспечать «Журналы России»**.
Индекс для индивидуальных подписчиков — **18362**, индекс для организаций — **18363**.
Также Вы можете оформить прямую редакционную подписку на журнал **«Тромбоз, гемостаз и реология»** на 2006 год.
Для этого достаточно заполнить размещенный здесь бланк заказа и произвести оплату.
Стоимость подписки на все номера 2006 года (по одному экземпляру №№ 1–4) составляет 200 руб.

Заполните Доставочную карточку и пришлите вместе с квитанцией об оплате письмом по адресу:
Лаборатория экспресс-диагностики РНЦХ РАМН. Россия 119992 Москва, Абрикосовский пер., 2
Свой адрес пишите, пожалуйста, подробно и разборчиво.
В стоимость подписки включена доставка.

Подписка для организаций
Стоимость подписки для организаций составляет 3 000 руб.
Оплата подписки для организаций производится на основании счета. Для этого заполните Доставочную карточку и пришлите ее письмом по адресу:
Лаборатория экспресс-диагностики РНЦХ РАМН. Россия 119992 Москва, Абрикосовский пер., 2
В Доставочной карточке просим Вас подробно и разборчиво указать **1)** Название организации; **2)** Ф.И.О. контактного лица; **3)** номер факса организации, по которому будет выслана копия счета; и **4)** почтовый адрес организации, по которому будет выслан оригинал счета.
При подписке на меньшее число номеров журнала за 2005 год, стоимость одного экземпляра составляет 200 руб.
В стоимость подписки включена доставка.

ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА

	пв	место	литер	**ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА** НА ЖУРНАЛ — ПИ № 779636
	«Тромбоз, гемостаз и реология»			
	ПОДПИСКА на 2006 год			
Куда	Индекс, адрес			
Кому	Фамилия, инициалы			
Оплата 200 руб. произведена	Дата			

РЕДАКЦИОННАЯ ПОДПИСКА

Извещение

ООО «Гемостаз и реология»
получатель платежа

ИНН получателя платежа	7714216791
расчетный счет	№ 40702810600010000962
	в ОАО «Банк Москвы», г.Москва
кор. счет	№ 30101810500000000219
БИК	044525219

Вид платежа	Сумма
Подписка на «Тромбоз, гемостаз и реология» на 2006 г.	
Всего	

Кассир

Дата__________ Плательщик __________________

Квитанция

ООО «Гемостаз и реология»
получатель платежа

ИНН получателя платежа	7714216791
расчетный счет	№ 40702810600010000962
	в ОАО «Банк Москвы», г.Москва
кор. счет	№ 30101810500000000219
БИК	044525219

Вид платежа	Сумма
Подписка на «Тромбоз, гемостаз и реология» на 2006 г.	
Всего	

Кассир

Дата__________ Плательщик __________________

Уважаемый коллега!

С СЕНТЯБРЯ 2003 года журнал «Тромбоз, гемостаз и реология»

РЕФЕРИРУЕТСЯ

Всероссийским Институтом Научной и Технической Информации (ВИНИТИ)

Журнал внесен в отечественные и зарубежные базы данных,
что увеличивает цитируемость статей
и индекс цитируемости их авторов.

Ждем Ваших публикаций!

Редакция.

РЕДАКЦИОННАЯ ПОДПИСКА

Информация о плательщике

(Ф.И.О., адрес плательщика)

(ИНН)

Информация о плательщике

(Ф.И.О., адрес плательщика)

(ИНН)