

На правах рукописи



СОШИТОВА Наталья Павловна

**Выявление нарушений гемостаза при сепсисе  
с помощью метода пространственного роста сгустка**

03.01.02 – биофизика

14.01.21 – гематология и переливание крови

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва  
2012

Работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении  
Гематологический научный центр  
Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор

**Атауллаханов  
Фазил Иноятович**

доктор медицинских наук

**Галстян  
Геннадий Мартинович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор, директор  
Алтайского филиала ФГБУ Гематологический  
научный центр МЗСР РФ

**Момот  
Андрей Павлович**

доктор биологических наук, профессор,  
заместитель директора по науке  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Центр теоретических проблем  
физико-химической фармакологии РАН

**Радкевич  
Людмила Александровна**

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и  
иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения и социального  
развития Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «06» июня 2012 года в 13 часов  
на заседании Диссертационного совета Д 208.135.02 при ФГБУ Гематологический  
научный центр МЗСР РФ по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д.4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ Гематологический научный  
центр МЗСР РФ.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2012 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

**Е.Е. Зыбунова**

2012 А  
12253

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы.

Нарушения гемостаза при сепсисе характеризуются активацией свертывания, снижением активности системы естественных антикоагулянтов и подавлением системы фибринолиза. Возникающее в результате диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС) является частым осложнением сепсиса, ведет к появлению тромбов в микрососудистом русле и, как следствие, к нарушению работы отдельных органов и систем, развитию полиорганной недостаточности, что значительно отягощает состояние больных. Важная роль, которую играют нарушения в системе гемостаза при сепсисе, делает необходимым мониторинг за показателями этой системы, а воздействия на отдельные ее звенья позволяют улучшить течение и прогноз при сепсисе.

Современные диагностические методы малочувствительны к активации свертывания при сепсисе. Большинство клоттинговых тестов направлены на выявление, прежде всего, гипокоагуляции и проводятся в условиях максимальной активации свертывания, поэтому могут не регистрировать гиперкоагуляцию в системе гемостаза. Из-за потребления факторов свертывания крови при сепсисе времена свертывания в этих тестах, несмотря на активацию свертывания, могут быть удлинены, а не укорочены. О гиперкоагуляции и тромбообразовании свидетельствует повышение концентрации в плазме крови Д-димеров, однако этот тест неспецифичен и отражает уже состоявшееся тромбообразование. Такие глобальные тесты свертывания, как тромбозластография (ТЭГ) и тест генерации тромбина, выявляют при сепсисе замедление фазы активации свертывания с последующей нормальной либо ускоренной фазой распространения процесса. Гипокоагуляция, согласно ТЭГ, чаще наблюдается у больных с ДВС, аналогичные результаты получены и в исследованиях с помощью теста генерации тромбина. Эти данные не позволяют сделать однозначный вывод о возможности использования глобальных тестов для мониторинга системы гемостаза при сепсисе.

Тест пространственного роста сгустка основан на принципе видеомикроскопического наблюдения за ростом фибринового сгустка в плазме после активации свертывания иммобилизованным на поверхности тканевым фактором. Этот метод моделирует условия протекания процесса свертывания *in vivo*, т.к. отражает как биохимические реакции каскада свертывания, так и процессы диффузии. Данный тест ранее использовался при изучении нарушений свертывания при гемофилиях А и В и других врожденных и приобретенных дефицитах факторов свертывания. Кроме того, он оказался чувствительным к прокоагулянтным изменениям в плазме, вызванным добавлением тромбоцитарных микровезикул, рекомбинантного активированного фактора VII и аптамера – антагониста ингибитора пути тканевого фактора. Эти результаты позволяют предполагать, что тест пространственного роста сгустка может

---

быть чувствителен к изменениям гемостаза, возникающим при сепсисе. Однако данные о применении данного метода для диагностики нарушений системы гемостаза у больных сепсисом отсутствуют.

Цель работы: Исследовать изменения пространственного роста сгустка у больных сепсисом и септическим шоком в процессе их лечения и сравнить информативность нового метода с традиционными методами оценки состояния гемостаза.

Задачи исследования:

1. Исследовать стабильность параметров пространственного роста сгустка к преаналитическому и аналитическому этапам проведения теста, определить диапазоны нормальных значений параметров теста.
2. Исследовать изменения пространственного роста сгустка и показателей стандартных тестов состояния системы свертывания у больных с сепсисом и септическим шоком в процессе их терапии.
3. Сравнить чувствительность метода пространственного роста сгустка с чувствительностью стандартных тестов времени свертывания и тромбозластографии.

Научная новизна. В работе оценен диагностический потенциал пространственно гетерогенной экспериментальной модели свертывания крови, изначально разработанной как модель для фундаментальных и прикладных научных исследований. Исследованы изменения динамики пространственного роста сгустка у 16 больных с сепсисом и септическим шоком на протяжении месяца с момента выявления инфекции, измерена стационарная скорость роста сгустка – показатель, учитывающий принципиальную особенность протекания свертывания крови в организме – пространственную неоднородность. Показано, что увеличение стационарной скорости роста сгустка ассоциируется с последующим увеличением в плазме крови концентрации Д-димеров. Таким образом, появление гиперкоагуляции в тесте пространственного роста сгустка в свободной от тромбоцитов плазме по времени опережает повышение концентрации Д-димеров в плазме у больных с сепсисом и септическим шоком и позволяет раньше выявить протромботические состояния.

Научно-практическое значение. Возможность выявлять с помощью пространственного роста сгустка гипо- и гиперкоагуляцию, а также изменения, возникающие при проведении антикоагулянтной терапии, открывает широкий спектр для применения этого метода как для проведения исследований системы гемостаза у больных со склонностью к кровоточивости либо тромбообразованию так и для изучения действия препаратов, воздействующих на свертывание крови.

Положения, выносимые на защиту.

1. Диапазоны нормальных значений параметров пространственного роста сгустка: лаг период от 0.4 до 0.8 мин, начальная скорость от 41 до 51 мкм/мин, стационарная - от 22 до 28 мкм/мин.

2. Параметры пространственного роста сгустка стабильны на этапах подготовки образца и постановки теста. Относительные погрешности определения начальной и стационарной скоростей роста сгустка в тесте не превышают 8%.

3. У больных с сепсисом традиционные клоттинговые тесты, а также параметры ТЭГ не отражают активацию свертывания крови.

4. Пространственный рост сгустка отражает развитие гиперкоагуляции у больных с сепсисом и септическим шоком и гипокоагуляцию на последней стадии ДВС при коагулопатии потребления.

5. Пространственный рост сгустка регистрирует развитие гиперкоагуляции у больных с сепсисом и септическим шоком раньше, чем в плазме крови выявляется повышение концентрации Д-димеров. Средняя концентрация Д-димеров в плазме у больных, у которых по данным теста пространственного роста сгустка была зарегистрирована гиперкоагуляция, достоверно выше, чем у больных, у которых по данным этого теста выявлялась норма- либо гипокоагуляция (457 мкг/л и 234 мкг/л, соответственно;  $p < 0.05$ ).

Апробация работы состоялась 19 сентября 2011 года на заседании проблемной комиссии "Биохимия, биофизика и реология крови" в ФГБУ Гематологический научный центр МЗСР РФ.

Результаты диссертационной работы представлены на научных конференциях: 5-я Всероссийская конференция "Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечнососудистой хирургии" (Москва, 3-5 февраля 2011), Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Современные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 24-25 марта 2011), 16th Congress of the European Hematology Association (Лондон, Великобритания, 9-12 июня 2011), XXIII Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (Киото, Япония, 23-28 июля 2011).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных работ. Статей в рецензируемых журналах – 2; публикаций в трудах конференций и съездов – 10.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав, выводов, практических рекомендаций, приложения и библиографического указателя, включающего 157 источников. Текст диссертации иллюстрирован 6 таблицами и 28 рисунками.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

*Материалы.* Для проведения теста пространственного роста сгустка использовались следующие реагенты, полученные из ресурсов, указанных в скобках: полиэтиленимин (ICN Biomedicals, США), 10% раствор молочной кислоты (Лабхим, Россия), рекомбинантный фактор VIIa (Novo Nordisk, Дания), тромбопластин (Репам, Россия), хромогенный субстрат для фактора Ха S-2765 (Chromogenix, США), глутаровый альдегид 25% (TED Pella, США), фактор X (Enzyme Research Laboratories, США) и Патромбин SL, Тромборель С, Тромбин-тест, реагент Д-димер (Dade Behring, Германия). Остальные реагенты, используемые в работе, были производства фирмы Sigma-Aldrich (США). Ингибитор фактора XIIa – КТИ – был получен в Институте белка РАН (Россия).

Для проведения контрольных тестов и определения диапазонов норм параметров пространственного роста сгустка использовано 56 образцов плазмы здоровых доноров и 15 образцов плазмы больных различными заболеваниями без признаков инфекции.

Изменения параметров пространственного роста сгустка при сепсисе изучено у 16 больных гемобластомами (3 женщины и 13 мужчин), у которых течение миелотоксического агранулоцитоза осложнилось развитием сепсиса, септического шока. Больные включались в исследование не позже 24 - 48 часов после появления признаков инфекции. После включения в исследование больные обследовались ежедневно в течение первых пяти дней, а затем раз в неделю на протяжении 28 дней. Часть больных получала антикоагулянтную терапию (антитромбин III, активированный протеин С, неактивированный протеин С и/или гепарин). Обследование больных включало: тест пространственного роста сгустка, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбин по Квику (ПВ), тромбиновое время (ТВ), ТЭГ и тест на Д-димеры, активность факторов и ингибиторов свертывания крови, выполнялся клинический анализ крови.

*Подготовка плазмы крови.* Кровь получали путем венепункции и забирали в силиконовые пробирки, содержащие 3.8% раствор цитрата натрия, соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1. После перемешивания часть крови забиралась для выполнения ТЭГ. Оставшуюся часть заготовленной цитратной крови использовали для приготовления свободной от тромбоцитов плазмы. Для этого из крови отделяли эритроциты путем центрифугирования в течение 15 минут при 1600g, затем отбирали бедную тромбоцитами плазму - надосадок. Полученную бедную тромбоцитами плазму центрифугировали 5 минут при 10000g для удаления тромбоцитов. рН плазмы стабилизировали в диапазоне 7.2-7.4.

*Коагулологические тесты и ТЭГ.* Определение АЧТВ, ПВ, ТВ и концентрации Д-димеров проводилось на образцах бедной тромбоцитами плазмы на автоматическом

коагулометре «Sysmex CA-1500» (Sysmex Corporation, Япония). ТЭГ выполняли на тромбоэластографе TEG 5000 с использованием одноразовых чашечек с гепариназой (Haemonetics Corporation, США). Тест выполнялся через 10-40 мин после взятия крови. Анализировались следующие параметры ТЭГ: R - время реакции, к - время свертывания,  $\alpha$  - угол наклона восходящей части ТЭГ и MA - максимальная амплитуда.

*Пространственный рост сгустка.* Тест выполнялся на приборе Тромбоимаджер («ООО» Гемакор, Россия). Особенностью метода является локальная активация свертывания поверхностью с иммобилизованным тканевым фактором и регистрация растущего фибринового сгустка в перемешиваемом тонком слое свободной от тромбоцитов плазмы, содержащей ингибитор контактной активации, по светорассеянию, методом темного поля (рис. 1А). За 10 мин до постановки теста к 300 мкл плазмы добавляли 12 мкл 10 мг/мл раствора КТИ. Активатор помещался в буфер (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7.2-7.4) для предотвращения формирования пузырей у активатора. Раствор 1 М CaCl<sub>2</sub>, активатор в буфере и плазма инкубировались при 37°C 10 мин. Тонкая плоская измерительная кювета помещалась в термостат прибора при 37°C. Затем плазма рекальцифицировалась добавлением 6 мкл 1 М CaCl<sub>2</sub>, и 300 мкл плазмы помещалось в кювету. Активатор вынимался из буфера, излишки которого удалялись фильтровальной бумагой, и помещался в кювету для запуска свертывания. Фотографии растущего сгустка выполнялись каждые 15с в течение 60 мин.

*Обработка экспериментальных кадров и анализ данных.* На основании серии фотографий для каждого эксперимента рассчитывались параметры пространственного роста сгустка. Первый кадр серии считался фоновым, и при обработке из интенсивности каждого пикселя каждого кадра вычиталась интенсивность соответствующего пикселя фонового кадра. Вдоль линии, перпендикулярной к активатору, рассчитывались профили роста сгустка (рис. 1Б) как средняя интенсивность светорассеяния в зависимости от расстояния от активатора. Для каждого профиля рассчитывался размер сгустка как координата, при которой интенсивность светорассеяния равнялась 50% от максимальной, что соответствует превращению половины всего фибриногена в фибрин. На основании зависимостей размера сгустка от времени определяли следующие параметры (рис. 1В): лаг период (задержка между моментом контакта плазмы с активатором и началом роста сгустка); начальная скорость роста сгустка (тангенс угла наклона прямой, аппроксимирующей участок зависимости размера сгустка от времени с момента начала роста сгустка и последующие 10 минут); стационарная скорость (тангенс угла наклона прямой, аппроксимирующей участок зависимости размера сгустка от времени между 10-й и 40-й минутами после начала роста сгустка). При постановке каждого теста рассчитывались 3 значения каждого из параметров в разных областях активатора и усреднялись для вычисления среднего. Состояние гиперкоагуляции также

характеризовалось образованием спонтанных фибриновых сгустков вдали от активатора свертывания. Для описания процесса появления спонтанных сгустков строилась зависимость средней интенсивности светорассеяния в области их формирования от времени (рис. 1В) и вычислялось время их появления как время достижения 5% от максимальной интенсивности светорассеяния. Для определения диапазонов нормальных значений параметров пространственного роста сгустка тест был проведен на плазмах 15 здоровых доноров (возраст 23-62 года, среднее 29, медиана 26; 8 женщин и 7 мужчин). Диапазоны норм были приняты равными средним значениям рассматриваемых параметров  $\pm$  стандартное отклонение.

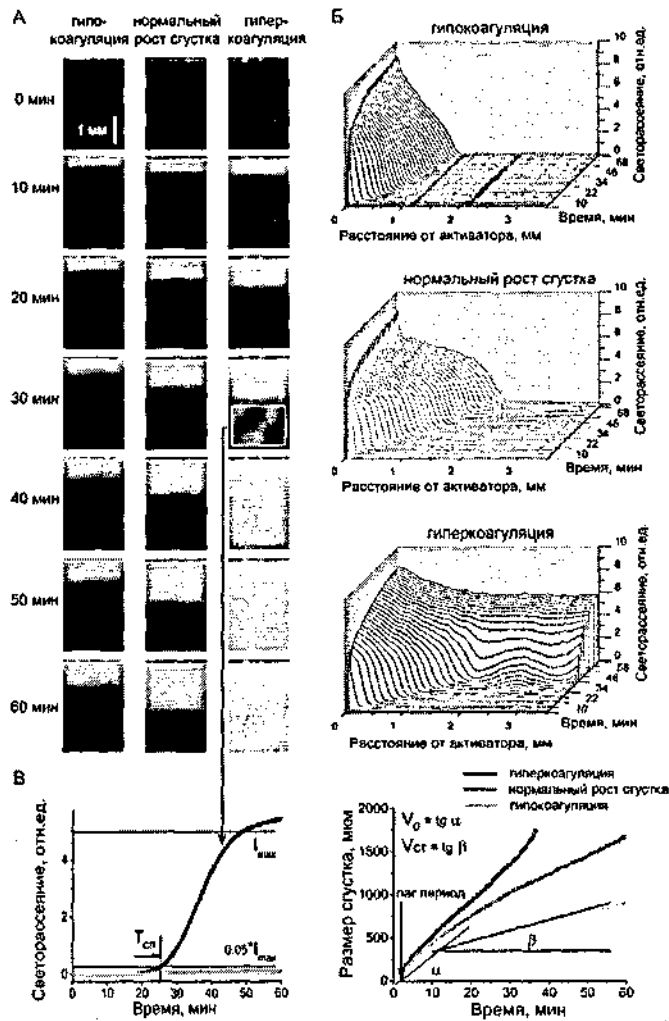
*Статистическая обработка результатов.* Анализ статистических различий выполнялся по двухвыборочному t-критерию Стьюдента для двух независимых выборок и по U-критерию Манна-Уитни с уровнем статистической значимости (p) равным 0.05. Корреляция между данными оценивалась по коэффициенту корреляции Спирмена. При статистическом анализе данных вычислялись среднее значение, медиана и стандартное отклонение.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

*Пространственный рост сгустка в норме и при нарушениях свертывания.* Поскольку метод пространственного роста сгустка является новым, приводятся результаты исследования этим методом в различных ситуациях. На рисунке 1А приведены примеры фотографий пространственного роста сгустка при выполнении теста с образцами плазмы здорового донора и больных с гипо- и гиперкоагуляцией. Поскольку фибрин хорошо рассеивает излучение в видимом диапазоне, сгусток выглядит на фотографиях как увеличивающаяся светлая область на фоне темной, несвернувшейся плазмы. После приведения плазмы в контакт с поверхностью с нанесенным тканевым фактором с высокой плотностью, фибриновый сгусток через небольшой промежуток времени начинает формироваться на активаторе, затем он постепенно распространяется от активатора вглубь плазмы, одновременно уплотняясь. В норме сгусток растет только от активатора, однако при гиперкоагуляции может наблюдаться феномен активатор-независимого свертывания – появление и рост фибриновых сгустков вдали от активатора в объеме плазмы. Такие сгустки обозначаются как спонтанные сгустки, а сам феномен – образование спонтанных сгустков (область их появления выделена на рисунке белым прямоугольником).

На рисунке 1Б приведены профили роста сгустка для тестов, представленных на панели А. По профилям роста сгустка видна разница в характере роста сгустка в пространстве в норме и при патологиях. В случае нормального роста сгустка и гиперкоагуляции, профили растущего сгустка имеют плато – то есть интенсивность светорассеяния растущего сгустка выглядит как ступенька, а при гипокоагуляции такая ступенька отсутствует и профили имеют пологий, «диффузный» вид.





**Рис. 1. Пространственный рост сгустка: чувствительность к различным состояниям системы свертывания.** (А) Фотографии растущего сгустка в образцах плазмы здорового донора и больных с гипо- и гиперкоагуляцией. Активатор с нанесенным тканевым фактором виден сверху каждой фотографии как горизонтальная черная полоска. Белый прямоугольник обозначает область образования спонтанных сгустков. (Б) Профили роста сгустка для экспериментов на панели (А). (В) Зависимость светорассеяния в области роста спонтанных сгустков от времени (слева) и зависимость размера сгустка от времени (справа) для экспериментов на панели (А). Основные параметры пространственного роста сгустка:  $V_0$  - начальная скорость роста сгустка,  $V_{ст}$  - стационарная скорость роста сгустка,  $T_{сп}$  - время возникновения спонтанных сгустков.

На профилях, соответствующих пространственному росту сгустка в плазме больного с гиперкоагуляцией, видно появление со временем дополнительного центра образования сгустка вдали от активатора. В случае выраженной гиперкоагуляции весь объем образца плазмы может свернуться за время эксперимента. Состояния гипо- и гиперкоагуляции характеризуются пониженными и повышенными скоростями роста сгустка, соответственно (рис. 1Б).

Слева на рисунке 1В показана зависимость средней интенсивности светорассеяния в области образования спонтанных сгустков от времени. В случае нормального роста сгустка и гипокоагуляции спонтанные сгустки не образуются в течение всего времени эксперимента. При гиперкоагуляции спонтанные сгустки начинают активно появляться и расти через некоторое время после начала исследования. В качестве характерного времени возникновения спонтанных сгустков было принято время достижения 5% от максимальной интенсивности светорассеяния в области образования спонтанных сгустков. В приведенном примере за счет образования спонтанных сгустков весь объем плазмы свернулся меньше, чем через 50 минут от начала эксперимента. На рисунке 1В также представлены основные параметры метода пространственного роста сгустка.

В результате обследования здоровых доноров определены следующие диапазоны нормальных значений параметров пространственного роста сгустка: время задержки роста сгустка - от 0.4 до 0.8 мин, начальная скорость роста сгустка - от 41 до 51 мкм/мин, стационарная скорость роста сгустка - от 22 до 28 мкм/мин. В норме на протяжении всего времени исследования (60 мин) спонтанные сгустки не должны появляться.

*Контрольные исследования для теста пространственного роста сгустка.* Была изучена зависимость пространственного роста сгустка от условий осаждения клеток, пространственный рост сгустка в бедной и свободной от тромбоцитов плазмах, стабильность пространственного роста сгустка на бедной тромбоцитами плазме, пространственный рост сгустка на образцах крови, полученной из разных вен, стабильность пространственного роста сгустка на одном и том же образце плазмы крови, изменения параметров пространственного роста сгустка у здоровых доноров при наблюдении за ними в течение 8 недель. Эти исследования показали, что параметры теста при выполнении его со свободной от тромбоцитов плазмой стабильны и не зависят от процесса приготовления образца плазмы для анализа.

Относительные ошибки определения параметров пространственного роста сгустка на аналитическом этапе составляют 4% для начальной скорости, 7% - для стационарной скорости, 23% - для лаг периода. Относительные погрешности, получаемые при повторном заборе крови, в среднем равны 7% для начальной скорости, 8% - для стационарной скорости, 12% - для лаг периода. Они практически совпадают по величине с разбросами, получаемыми при повторных выполнениях теста на одном и

том же образце плазмы.

При выполнении теста пространственного роста сгустка с бедной тромбоцитами плазмой было показано, что наличие тромбоцитов сказывается на его результатах. Скорости роста сгустка в тесте с бедной тромбоцитами плазмой были значительно выше, чем в тесте со свободной от тромбоцитов плазмой. Средние значения и стандартные отклонения для стационарных скоростей, полученные на образцах бедной и свободной от тромбоцитов плазмы, равны, соответственно,  $28 \pm 5$  мкм/мин и  $23 \pm 4$  мкм/мин ( $p < 0.05$ ). Результаты, получаемые на бедной тромбоцитами плазме, оказались значительно менее стабильными и более чувствительными к процессу подготовки образца, чем результаты на свободной от тромбоцитов плазме. При выполнении теста с бедной тромбоцитами плазмой чаще возникали спонтанные сгустки как у здоровых доноров, так и у больных с различными патологиями.

По результатам исследования пространственного роста сгустка у здоровых доноров на протяжении 8 недель обнаружены значительные колебания всех параметров: лаг период варьировал на 79%, начальная скорость - на 24%, стационарная - на 34%. Эти изменения, в основном, происходили в пределах нормальных диапазонов параметров. Показатели стандартных тестов свертывания находились в пределах нормальных значений на протяжении всего времени наблюдения.

*Пространственный рост сгустка у больных с сепсисом и септическим шоком.* На рисунке 2 представлена динамика параметров гемостаза больного с септическим шоком, у которого развился тромбоз левой внутренней яремной вены на 5 день наблюдения. Больной получал терапию активированным протеином С с первого дня шока. В день окончания курса терапии у него развился тромбоз, и больному с 5 по 22 дни была назначена терапия нефракционированным гепарином, а затем с 23 по 27 день - терапия низкомолекулярным гепарином (фраксипарином). Пространственный рост сгустка выявил у больного гиперкоагуляцию с образованием спонтанных сгустков уже на 4 сутки наблюдения, т.е. за сутки до появления клинических признаков венозного тромбоза.

Среди параметров пространственного роста сгустка для выявления гиперкоагуляции наиболее чувствительной оказалась стационарная скорость роста сгустка. Она была на 80% выше нормы на момент выявления тромбоза, в то время как начальная скорость превышала норму всего на 12%. Образование спонтанных сгустков на рис. 2 характеризуется зависимостью от времени величины  $1/T_{сп}$ , обратной времени появления спонтанных сгустков - чем больше эта величина, тем раньше появляются спонтанные сгустки в тесте, и тем более выражена гиперкоагуляция.

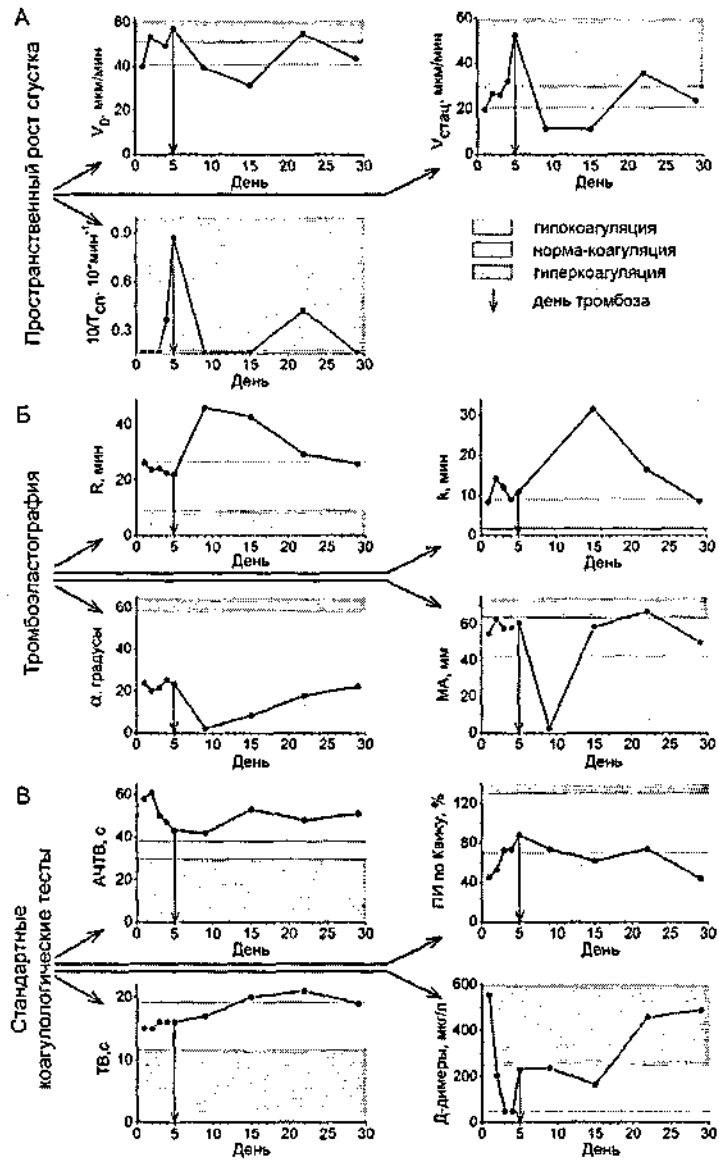


Рис. 2. Динамика параметров коагулологических тестов у больного с септическим шоком.

Концентрация Д-димеров в плазме оставалась в пределах нормальных значений на момент тромбоза и повысилась лишь на 22 сутки. Значения тестов АЧТВ, протромбина по Квику, ТВ и ТЭГ были на момент выявления тромбоза в пределах соответствующих диапазонов норм. Таким образом, пространственный рост сгустка оказался более чувствительным методом выявления активации системы свертывания крови при сепсисе, чем стандартные клоттинговые тесты свертывания, ТЭГ, а также тест на Д-димеры.

После назначения гепарина по данным пространственного роста сгустка, АЧТВ и ТЭГ выявляли гипокоагуляцию. В день перерыва в антикоагулянтной терапии с помощью теста пространственного роста сгустка вновь выявили гиперкоагуляцию, а в конце периода наблюдения параметры теста вернулись в область нормальных значений.

Значения тестов времени свертывания (АЧТВ, протромбин по Квику, ТВ) на протяжении всего периода наблюдения находились в области нормы либо регистрировали гипокоагуляцию. Аналогичная динамика показателей клоттинговых тестов и ТЭГ наблюдалась у всех больных, включенных в исследование. Из всех общепринятых тестов для выявления активации свертывания при сепсисе наиболее чувствительным было исследование плазменной концентрации Д-димеров. Но повышение плазменной концентрации Д-димеров отражает процесс лизиса тромбов и, следовательно, свидетельствует об уже состоявшемся тромбообразовании, т.е. является поздним маркером.

По результатам пространственного роста сгустка состояние гиперкоагуляции наблюдалось в 36 из 116 (31%) случаев, при этом в 33 из 36 (92%) случаев увеличение скоростей сопровождалось наличием спонтанных сгустков.

Пространственный рост сгустка позволял отслеживать эффекты, вызванные назначением и отменой антикоагулянтов (гепарина, антипротромбина III).

*Динамика стационарной скорости роста сгустка и плазменной концентрации Д-димеров у больных с гиперкоагуляцией.* Всего по результатам исследования пространственного роста сгустка у 6 больных наблюдалось развитие гиперкоагуляционного состояния. У 5 из 6 гиперкоагуляция подтвердилась последующим увеличением концентрации Д-димеров в плазме крови (рис. 3А). При этом резкого повышения уровня Д-димеров не наблюдалось, если параметры пространственного роста сгустка у этих больных находились в области нормальных значений или гипокоагуляции. На рисунке 3А показана динамика стационарной скорости роста сгустка и концентрации Д-димеров в плазме для этих 5 больных. На рисунке 3Б приведено сравнение концентраций Д-димеров в плазме крови между группами больных с гиперкоагуляцией, либо нормальными значениями и гипокоагуляцией, оцененными по тесту пространственного роста сгустка.

Статистическое сравнение проводилось на основании 39 пар данных по плазменным концентрациям Д-димеров и стационарным скоростям, полученных при наблюдении за 6 больными с гиперкоагуляцией.

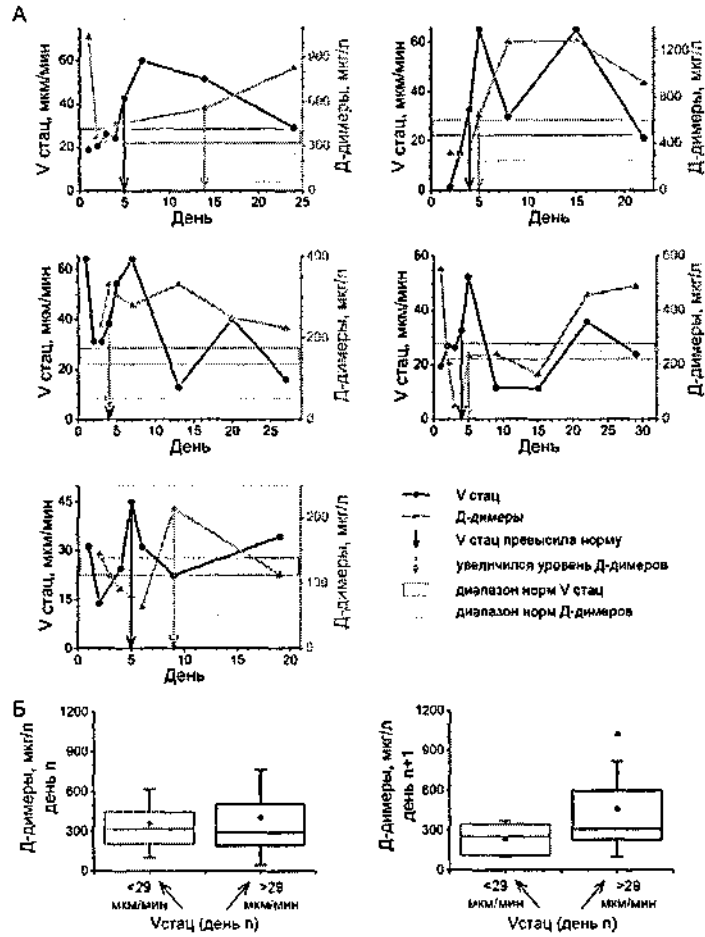


Рис. 3. Сравнение динамики стационарной скорости роста ступки и концентрации Д-димеров. На рисунке 3А представлена динамика стационарной скорости и концентрации Д-димеров в плазме у 5 больных за время наблюдения. На рисунке 3Б - статистическое сравнение плазменных концентраций Д-димеров, разделенных на группы по соответствующим значениям стационарной скорости в тот же день (слева) либо на момент предыдущего измерения (справа). \* -  $p < 0,05$ .

Значения концентраций Д-димеров в плазме в группах, разделенных в соответствии со значениями стационарной скорости роста сгустка, измеренными в тот же день, статистически значимо не отличались. Среднее значение уровня Д-димеров в группе, соответствующей  $V_{стац} \geq 29$  мкм/мин, составляло 402 мкг/л, а в группе, соответствующей  $V_{стац} < 29$  мкм/мин - 359 мкг/л. Значения концентраций Д-димеров в плазме в группах, разделенных в соответствии со значениями стационарной скорости роста сгустка на момент предыдущего измерения, статистически достоверно отличались по U-критерию Манна-Уитни ( $p < 0.05$ ). Средние значения уровней Д-димеров составляли 457 мкг/л и 234 мкг/л для групп, соответствующих по тесту пространственного роста сгустка гиперкоагуляции ( $V_{стац} \geq 29$  мкм/мин) либо норме и гипокоагуляции ( $V_{стац} < 29$  мкм/мин), соответственно.

Таким образом, с помощью теста пространственного роста сгустка гиперкоагуляцию регистрировали раньше повышения концентрации Д-димеров в плазме крови.

*Оценка различий в плазменной концентрации Д-димеров у больных с гипокоагуляцией, либо нормой и гиперкоагуляцией по данным АЧТВ и ТЭГ.* Поскольку клоттинговые тесты и ТЭГ выявляли гиперкоагуляцию достаточно редко (в 1-2 случаях), было решено сравнить концентрации Д-димеров в плазме, соответствующие гипокоагуляции, либо норме и гиперкоагуляции, которые регистрировались по тестам АЧТВ и ТЭГ. Группы Д-димеров разделялись в соответствии со значениями рассматриваемых тестов в этот же день либо на момент предыдущего измерения.

Не найдено статистически значимых различий между плазменными концентрациями Д-димеров как в группах, разделенных в соответствии со значениями АЧТВ и ТЭГ (гипо- либо норма- и гиперкоагуляция), измеренными в тот же день, так и в группах, разделенных в соответствии со значениями параметров этих тестов на момент предыдущего измерения (рис. 4).

Таким образом, ни один из рассматриваемых тестов не выявлял гиперкоагуляцию раньше или одновременно с тестом на уровень Д-димеров в плазме.

*Информативность теста пространственного роста сгустка у больных без прогрессирующей гиперкоагуляции.* У оставшихся 10 больных с сепсисом и септическим шоком в первые дни наблюдения плазменная концентрация Д-димеров значительно превышала норму, в дальнейшем она оставалась такой же или постепенно снижалась. По данным теста пространственного роста сгустка в случае выздоровления наблюдалась нормализация свертывания (4 больных), либо в случае летального исхода (6 больных) регистрировалось развитие гипокоагуляции. Параметры остальных тестов также находились в пределах нормы либо гипокоагуляции. По данным теста пространственного роста сгустка, у 3 из 6 больных с летальным исходом изначально наблюдалась гиперкоагуляция, у других 3 – гипокоагуляция. Скорости роста сгустка во

второй группе так и оставались сниженными все время наблюдения, а в первой группе наблюдалось изменение параметров пространственного роста сгустка из области гипер- в область гипокоагуляции. В целом, у всех умерших больных наблюдалась схожая картина уменьшения стационарной скорости роста сгустка в терминальной стадии болезни. Такое уменьшение скорости наряду со значительным повышением концентрации Д-димеров свидетельствует о развитии коагулопатии потребления.

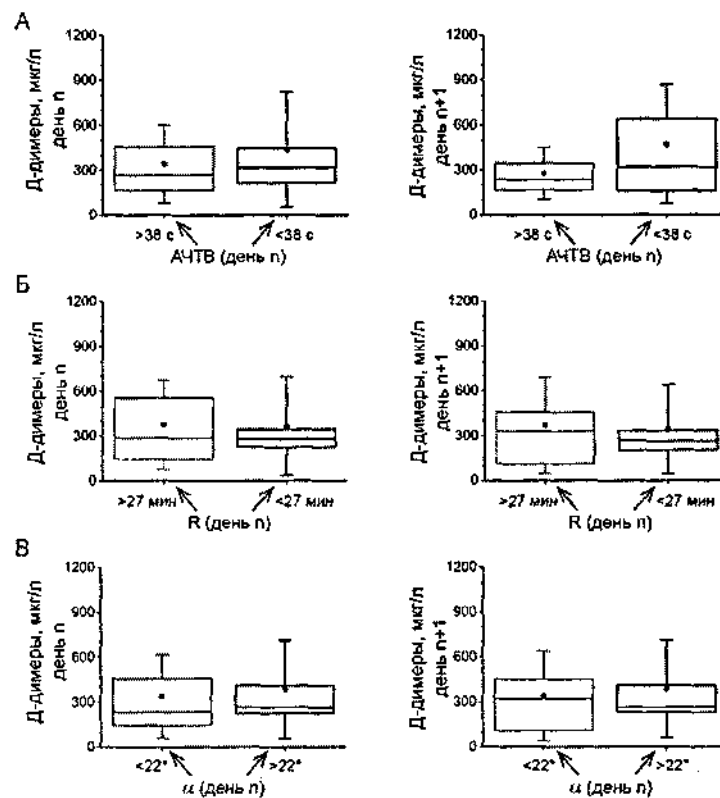


Рис. 4. Статистическое сравнение различных групп значений концентраций Д-димеров. Прямоугольные диаграммы соответствуют группам значений концентраций Д-димеров в плазме, разделенных в соответствии со значениями АЧТВ (А) либо параметрами ТЭГ - R (Б) и  $\alpha$  (В) в тот же день (слева) либо на момент предыдущего измерения (справа). Рассматриваемые пары групп значений Д-димеров статистически значимо не отличались.



*Корреляции между параметрами коагулологических тестов.* В работе была проведена оценка корреляции между различными параметрами рассматриваемых тестов по данным всех анализов исследуемой группы больных (16 больных, 120 значений для каждого параметра). Наблюдалась достоверная корреляция внутри тестов. У АЧТВ и ПВ коэффициент корреляции Спирмена составлял -0.65. Коэффициент корреляции Спирмена между параметрами ТЭГ R и  $\alpha$  равен -0.82. Между начальной и стационарной скоростями роста сгустка коэффициент корреляции составлял 0.74.

В то же время, корреляция между параметрами различных тестов была низкой. Между параметрами ТЭГ и тестами АЧТВ и протромбина по Квику не было статистически достоверной корреляции. Выявлена статистически достоверная слабая корреляция между стационарной скоростью роста сгустка и всеми рассматриваемыми тестами. Такая слабая корреляция между параметрами рассматриваемых тестов может объясняться принципиальными различиями в принципах их проведения. Тесты АЧТВ и ПВ моделируют свертывание вблизи активатора в условиях максимальной активации. ТЭГ также проводится в гомогенной системе, и ее результаты дополнительно зависят от функции тромбоцитов, так как анализ проводится на цельной крови. Пространственный рост сгустка проводится в реакционно-диффузионной системе и отражает процесс формирования сгустка в пространстве. Таким образом, все тесты регистрируют процесс свертывания в разных условиях.

Важным результатом данной работы является установление факта, что у больных с сепсисом тест пространственного роста сгустка в свободной от тромбоцитов плазме может выявлять гиперкоагуляцию значительно раньше, чем регистрируется повышение плазменной концентрации Д-димеров. Эта работа является первой попыткой оценить диагностический потенциал данного метода, который изначально разрабатывался как метод для фундаментальных и прикладных научных исследований. Основная идея этой модели свертывания состоит в том, что процесс формирования фибринового сгустка пространственно неоднороден, и диффузия факторов свертывания – важный компонент, регулирующий этот процесс. В отличие от большинства применяемых в клинической практике тестов, в которых свертывание происходит в гомогенной среде, в модели пространственного роста сгустка свертывание активируется не гомогенно распределенным тканевым фактором, а поверхностью с иммобилизованным тканевым фактором. Известно, что чувствительность клоттинговых тестов увеличивается при уменьшении уровня активации, поэтому логично было предположить, что гиперкоагуляцию проще обнаружить в системе с локализованным тканевым фактором.

В этой работе показано, что ускоренный рост сгустка в пространстве ассоциируется с последующим увеличением концентрации Д-димеров в плазме крови. Средняя концентрация Д-димеров в плазме в группе больных, у которых наблюдалась гиперкоагуляция по данным пространственного роста сгустка, достоверно выше

средней плазменной концентрации Д-димеров в группе больных, у которых наблюдалась норма либо гипокоагуляция по данным этого теста. Таким образом, пространственный рост сгустка оказался чувствительным к активации системы свертывания крови при сепсисе, причем он способен регистрировать гиперкоагуляцию раньше теста на Д-димеры и может быть использован как ранний маркер тромботических осложнений.

Ограничением данной работы является относительно небольшое число больных, включенных в исследование. Всего было включено 16 больных, из которых только у 6 наблюдалось развитие гиперкоагуляционного состояния с момента начала исследования; у остальных 10 больных плазменная концентрация Д-димеров изначально значительно превышала норму. Однако по результатам проведения исследования для указанных шести пациентов было собрано 39 пар данных о параметрах пространственного роста сгустка и уровнях Д-димеров в плазме, что позволило получить статистически значимые предварительные результаты.

По результатам проведенного исследования установлено, что такие широко распространенные коагулологические тесты, как АЧТВ, протромбин по Квику и ТЭГ, малочувствительны к активации свертывания при сепсисе.

Диапазоны нормальных значений параметров пространственного роста сгустка, полученные в данной работе, были рассчитаны на основании результатов теста пространственного роста сгустка, выполненного у небольшой выборки здоровых (в основном, молодых) доноров. Эти диапазоны, безусловно, не являются истинными диапазонами норм, которые используются при работе с утвержденными общепринятыми диагностическими методами. Это, скорее, референсные значения, полученные в контрольной группе для данного исследования. Однако такое ограничение не влияет на интерпретацию полученных результатов.

В методе пространственного роста сгустка состояние гиперкоагуляции характеризуется не только количественными, но и качественными изменениями: появлением спонтанных сгустков в объеме плазмы вдали от активатора свертывания. Природа появления спонтанных сгустков пока не выяснена. Их появление может быть объяснено присутствием прокоагулянтного материала в плазме крови: при сепсисе регистрируется увеличение количества прокоагулянтных фосфолипидных микровезикул, пусковой тканевой фактор; под действием провоспалительных цитокинов эндотелиальные клетки могут экспрессировать и выделять растворимый тканевой фактор; некоторые бактерии выделяют протеиназы, способные напрямую активировать факторы свертывания. Какой из этих механизмов является причиной появления спонтанных сгустков, еще предстоит выяснить, и эта причина может оказаться разной у разных больных. Однако уже сейчас очевидно, что их наличие может служить дополнительным диагностическим маркером гиперкоагуляции.

Ограничением данной работы является и то, что, несмотря на выявленную гиперкоагуляцию, только в одном случае было зарегистрировано тромботическое осложнение. Вывод о более раннем выявлении гиперкоагуляции с помощью теста пространственного роста сгустка сделан на основании сравнения его результатов с данными о концентрации Д-димеров в плазме крови. Уровень Д-димеров в плазме крови является маркером активации системы свертывания при сепсисе. Повышение уровня Д-димеров при сепсисе может происходить еще до появления клинической картины сепсиса, что объясняет выявление повышенной концентрации Д-димеров в плазме крови у части больных в первый же день включения их в исследование. При этом Д-димеры достаточно долго циркулируют в крови, их уровень может оставаться высоким в течение нескольких недель после состоявшегося тромбообразования. Таким образом, Д-димеры отражают существующую либо бывшую активацию системы свертывания при сепсисе и сопутствующее микротромбирование, тромбозы. Повышение уровня Д-димеров в плазме крови подтверждает факт того, что у больного есть гиперкоагуляция. Это свойство позволяет использовать тест на Д-димеры для оценки возможности определения гиперкоагуляции с помощью теста пространственного роста сгустка.

Проведенные в работе контрольные исследования показали, что параметры теста пространственного роста сгустка в свободной от тромбоцитов плазме стабильны как в отношении этапа приготовления образца к анализу, так и в отношении самого аналитического этапа. Причины наблюдаемых колебаний параметров пространственного роста сгустка у здоровых доноров в пределах диапазонов норм еще предстоит выяснить.

Полученные данные открывают широкие перспективы для проведения дальнейших прикладных исследований. В частности, на основании описанной в работе методики возможна разработка различных модификаций для улучшения ее чувствительности. Например, использование в тесте пространственного роста сгустка гепариназы могло бы быть полезным для оценки эффектов гепарина.

Полученные в этой работе данные позволяют заключить, что системы, исследующие свертывание в пространстве от локализованного на поверхности активатора, имеют хороший диагностический потенциал.

## **ВЫВОДЫ**

1. Широко применяемые в клинической практике клоттинговые тесты, а также тромбоэластография малочувствительны к активации свертывания крови, происходящей при сепсисе. Их нормальные значения не позволяют исключить гиперкоагуляцию у больных с сепсисом.
2. Процесс подготовки плазмы оказывает влияние на результаты теста

пространственного роста сгустка. Результаты, получаемые на бедной тромбоцитами плазме, менее стабильны и более чувствительны к процессу подготовки образца плазмы для исследования, чем результаты на свободной от тромбоцитов плазме. В связи с этим тест должен выполняться на свободной от тромбоцитов плазме крови. В этом случае его отличает высокая воспроизводимость, относительная погрешность определения его параметров не превышает 3%.

3. Метод пространственного роста сгустка позволяет выявлять активацию свертывания, возникающую на ранних стадиях сепсиса. Метод пространственного роста сгустка регистрирует развитие гиперкоагуляционного состояния у больных с сепсисом и септическим шоком раньше, чем тест на Д-димеры, и может быть использован как ранний маркер тромботических осложнений.

4. С помощью параметров пространственного роста сгустка можно верифицировать различные стадии нарушений гемостаза при сепсисе: активацию свертывания в дебюте заболевания, нормализацию параметров при успешной терапии сепсиса и благоприятном исходе и гипокоагуляционное состояние, развивающееся вследствие коагулопатии потребления, нарушения функции печени.

5. С помощью метода пространственного роста сгустка можно мониторировать у больных с сепсисом эффективность антикоагулянтной терапии гепарином, концентратом антитромбина III. Метод малочувствителен к изменениям гемостаза, возникающим при терапии активированным протеином С.

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

1. Soshitova NP, Karamzin SS, Balandina AN, Fadeeva OA, Kretchetova AV, Galstian GM, Pantelev MA, Ataullakhanov FI. Spatial clot growth can predict prothrombotic changes of coagulation state in sepsis. *J Thromb. Haemost.* 2011; 9 (Suppl 2): 423.

2. Дашкевич Н.М., Ованесов М.В., Пантелеев М.А., Шестаков П.И., Сошитова Н.П., Баландина А.Н., Карамзин С.С., Атауллаханов Ф.И. Новый метод изучения системы свертывания: исследование пространственной динамики тромбина. Материалы 5-й Всероссийской конференции "Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечнососудистой хирургии", 3-5 февраля 2011, Москва, с. 162-163.

3. Сошитова Н.П., Карамзин С.С., Баландина А.Н., Фадеева О.А., Дашкевич Н.М., Кречетова А.В., Галстян Г.М., Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. Метод пространственного роста сгустка детектирует развитие гиперкоагуляционного состояния при сепсисе на несколько дней раньше теста на Д-димеры. Материалы 5-й Всероссийской конференции "Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечнососудистой хирургии", 3-5 февраля 2011, Москва, с. 481-482

4. Soshitova NP, Karamzin SS, Balandina AN, Fadeeva OA, Kretchetova AV, Galstian GM, Pantelev MA, Ataullakhanov FI. New method of prothrombotic tendencies prediction in sepsis: spatial clot growth. *Haematologica.* 2011; 96 (Suppl 2): 262.

5. Сошнтова Н.П., Карамзин С.С., Баладина А.Н., Фадеева О.А., Кречетова А.В., Галстян Г.М., Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. Новый метод пространственного роста сгустка чувствителен к нарушениям гемостаза при сепсисе. Вестник гематологии, 2011; 7 (1): 121-122.

6. Пантелеев М.А., Баладина А.Н., Сошнтова Н.П., Галстян Г.М., Емельяненко В.М., Воробьев А.И., Атауллаханов Ф.И. Пространственная динамика гемостаза и тромбоза: теория и практика. Тромбоз, гемостаз и реология, 2010 4 (44), с. 48-60.

7. Атауллаханов Ф.И., Баладина А.Н., Пантелеев М.А., Емельяненко В.М., Галстян Г.М., Копылов К.Г., Кумскова М.А., Карамзин С.С., Фадеева О.А., Сошнтова Н.П., Липец Е.Н., Тарандовский И.Д., Щербина И.А. Пространственный рост фибринового сгустка как новый метод диагностики кровоточивости и тромбозов. Материалы 5-й Всероссийской конференции "Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечнососудистой хирургии", 3-5 февраля 2011, Москва, с. 43-44.

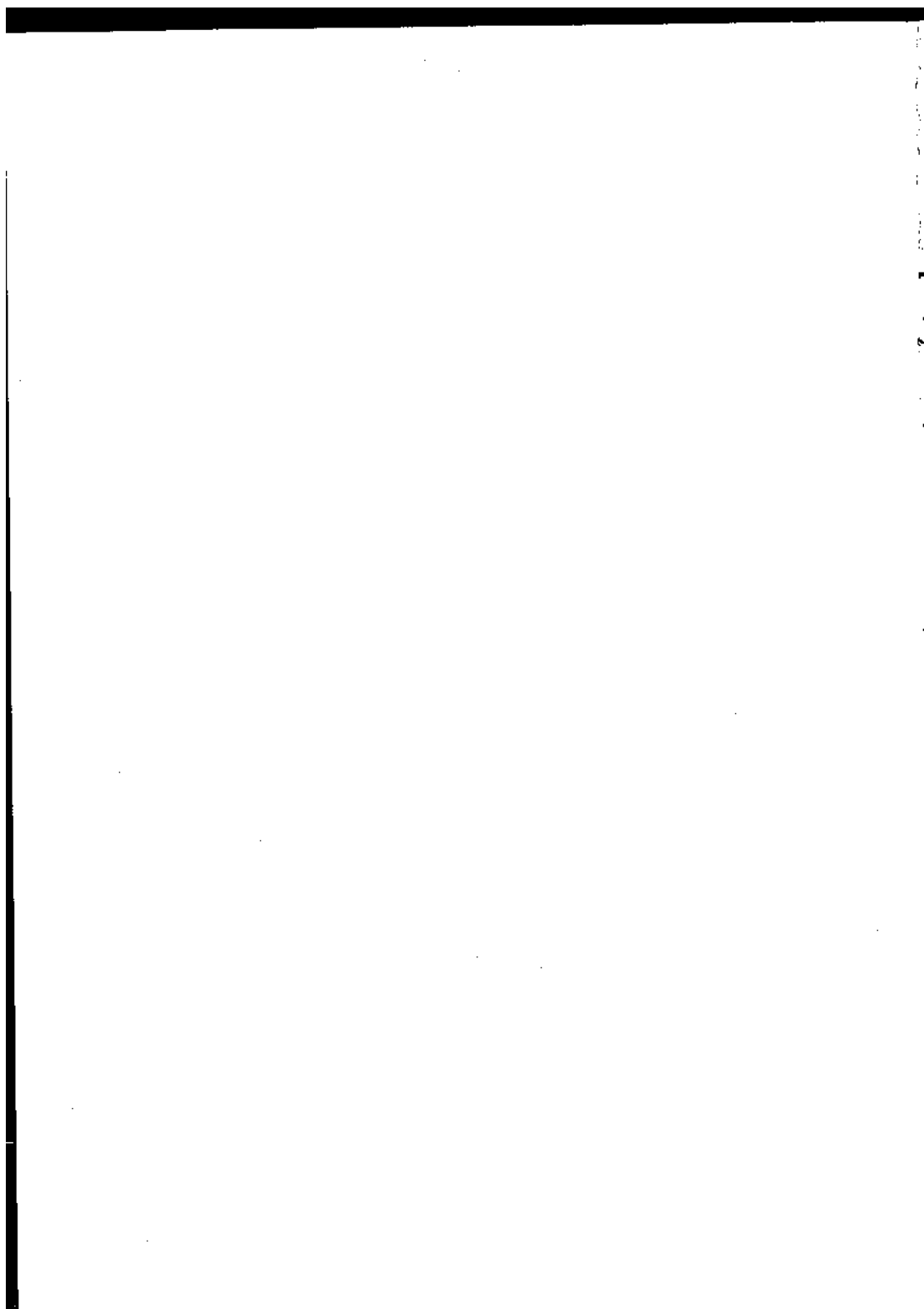
8. Баладина А.Н., Урпова Е.С., Марголин О.В., Сошнтова Н.П., Липец Е.Н., Тарандовский И.Д., Щербина И.А., Карамзин С.С., Фадеева О.А., Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. Оценка системы гемостаза у пациентов с онкогематологическими заболеваниями на основе нового диагностического метода регистрации пространственного роста сгустка. Материалы 5-й Всероссийской конференции "Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечнососудистой хирургии", 3-5 февраля 2011, Москва, с. 49-50.

9. Щербина И.А., Баладина А.Н., Емельяненко В.М., Соловьева А.А., Леонтьева Т.Н., Карамзин С.С., Фадеева О.А., Сошнтова Н.П., Липец Е.Н., Тарандовский И.Д., Полохов Д.М., Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. Исследование пространственного роста фибринового сгустка как новый метод мониторинга состояния пациентов с ишемической болезнью сердца. Материалы 5-й Всероссийской конференции "Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечнососудистой хирургии", 3-5 февраля 2011, Москва, с. 577-578.

10. Parunov L.A., Fadeeva O.A., Balandina A.N., Soshitova N.P., Kopylov K.G., Kumskova M.A., Gilbert J.C., Schaub R.G., McGinness K.E., Ataulakhanov F.I., Panteleev M.A. Improvement of spatial fibrin formation by the anti-TFPI aptamer BAX499: changing clot size by targeting extrinsic pathway initiation. *J. Thromb. Haemost.* 2011 9 (9): 1825-1834.

11. Panteleev MA, Balandina AN, Emelianenko VM, Fadeeva OA, Galstian GM, Karamzin SS, Lipets EN, Soshitova NP, Tarandovskii ID, Ataulakhanov FI. Imaging spatial dynamics of fibrin clot formation: possibilities for detection of prothrombotic and bleeding tendencies. *J. Thromb. Haemost.* 2011; 9 (Suppl 2): 495 p.

12. Parunov L.A., Fadeeva O.A., Balandina A.N., Soshitova N.P., Kopylov K.G., Kumskova M.A., Gilbert J.C., Schaub R.G., McGinness K.E., Ataulakhanov F.I., Panteleev M.A. Improvement of spatial fibrin formation by the anti-TFPI aptamer BAX499: changing clot size by targeting extrinsic pathway initiation. *J. Thromb. Haemost.* 2011; 9 (Suppl 2): 230.



---

Подписано в печать: 02.05.2012

Заказ № 7329 Тираж - 100 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)

2012A  
12253

12-12253