

НОВЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ДИССЕМИНИРОВАННОГО ВНУТРИСОСУДИСТОГО СВЕРТЫВАНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ У ПАЦИЕНТОВ ОТДЕЛЕНИЙ АНЕСТЕЗИОЛОГИИ-РЕАНИМАЦИИ И ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ

Столяров Г.С.¹, Минаева О.В.¹, Саушев И.В.¹, Струлькова С.Ю.¹, Пятаев Н.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, e-mail: mlr4@yandex.ru

В статье описывается новый метод выявления в крови продуктов паракоагуляции, основанный на увеличении массы фибринового сгустка при взаимодействии плазмы крови с 0,03–0,09% гипохлоритом натрия относительно контрольной величины. Данный эффект был обнаружен при проведении *in vitro* тестов с гипохлоритом натрия у пациентов с коагулопатическими состояниями (пациенты с геморрагическими осложнениями хирургической патологии в отделении анестезиологии-реанимации (ОАР), и пациенты - на фоне тромболитической терапии в отделении интенсивной терапии). Предварительное исследование влияния гипохлорита натрия на процесс фибринообразования в плазме здоровых доноров не выявило статистически значимых изменений. Также установлено отсутствие влияния гипохлорита натрия на ретракцию сгустка в тестах с плазмой, бедной тромбоцитами. Положительный тест с гипохлоритом отмечен у всех пациентов после тромболитической терапии и у пациентов ОАР, у которых в дальнейшем наблюдалось развитие клинического ДВС-синдрома. У других пациентов с коагулопатией отмечался отрицательный тест с гипохлоритом, и это не было ассоциировано с развитием ДВС. Предположительно гипохлорит натрия взаимодействует с продуктами фибринолиза в плазме пациентов с коагулопатией потребления, что приводит к росту доступного для коагуляции фибриногена и увеличению массы фибринового сгустка по сравнению с контролем. Данные клинические наблюдения и данные *in vitro* исследований положены в основу нового альтернативного метода выявления в крови продуктов паракоагуляции. Благодаря простоте и доступности метод имеет определенные перспективы применения для дифференциальной диагностики коагулопатических состояний у критических пациентов отделений анестезиологии-реанимации и интенсивной терапии.

Ключевые слова: диссеминированное внутрисосудистое свертывание, коагулопатия, продукты паракоагуляции, гипохлорит натрия, фибрин.

A NEW METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION AND ITS APPLICATION FOR PATIENTS IN ANESTHESIA-RESUSCITATION AND INTENSIVE CARE UNITS

Stolyarov G.S.¹, Minaeva O.V.¹, Saushev I.V.¹, Strulkova S.Yu.¹, Pyataev N.A.¹

¹National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: mlr4@yandex.ru

The article describes a new method for detecting paracoagulation products in the blood, based on an increase in the mass of the fibrin clot in the interaction of blood plasma with 0,03 – 0,09 % sodium hypochlorite relative to the reference value. This effect was found by *in vitro* tests with sodium hypochlorite in patients with coagulopathic conditions (we observed patients with hemorrhagic complications and patients with thrombolytic therapy). The study of the influence of sodium hypochlorite on fibrinogenesis in the plasma of healthy donors has shown no statistically significant changes. It was also found that there is no effect of sodium hypochlorite on the clot retraction in tests with platelets poor plasma. A positive test with hypochlorite was noted in all patients after thrombolysis and in patients with coagulopathy who subsequently has progress a clinical DIC syndrome. The other patients with coagulopathy had a negative test with hypochlorite, so their have not DIC syndrome later. We assumed that sodium hypochlorite interacts with fibrinolysis products in the plasma of patients with consumption coagulopathy which increase the availability of fibrinogen for coagulation and increase in the mass of the fibrin clot in comparison with the control. These clinical observations and *in vitro* studies are the basis for a new alternative method of detecting blood paracoagulation products. Due to simplicity and availability, the method has some prospects to differential diagnosis disseminated intravascular coagulation for patients in anesthesiology-resuscitation and intensive care units.

Keywords: disseminated intravascular coagulation, coagulopathy, paracoagulation products, sodium hypochlorite, fibrin.

ДВС-синдром является серьезным и довольно частым осложнением множества

тяжелых критических состояний, что определяет его большую распространенность [1; 2]. Вследствие того, что в развитии синдрома задействованы практически все составляющие системы регуляции агрегатного состояния крови (свертывающая, противосвертывающая, фибринолитическая), предложено большое количество лабораторных тестов [1; 3]. Из всей совокупности предлагаемых лабораторных тестов известно, пожалуй, не более десяти, по абсолютным значениям которых можно с достаточной долей вероятности говорить о наличии ДВС-синдрома. Большинство из них относится к методам выявления в кровотоке продуктов паракоагуляции – специфичных маркеров генерализации внутрисосудистого свертывания и гиперактивности фибринолиза [4].

Поводом для настоящего исследования послужил обнаруженный нами факт увеличения массы фибринового сгустка в процессе проведения непрямого электрохимического окисления крови (НЭХОК) гипохлоритом натрия (ГХН) у больных с тяжелым хирургическим эндотоксикозом и гипокоагуляцией [5; 6]. Интересно, что у больных с нормо- и гиперкоагуляцией после сеансов НЭХОК подобных изменений не отмечалось. В связи с этим была изучена возможность использования гипохлорита натрия в качестве реактива для *in vitro* диагностики коагулопатии потребления у пациентов в критических состояниях, что и стало основной целью данного исследования.

Материал и методы. Раствор гипохлорита натрия готовили путем электролиза физиологического (0,9%) раствора NaCl на аппарате ЭДО-4 в режиме 5А 30 минут. Для определения концентрации гипохлорита натрия использовали метод объёмного оксидометрического титрования. Исследование проводилось в диапазоне доз ГХН от 150 до 1200 мг/л. Необходимые для исследования концентрации ГХН получали разведением маточного раствора физиологическим раствором NaCl. Кровь для исследования забиралась из периферической вены в пробирку с антикоагулянтом (3,8% цитрат натрия) в соотношении 9:1. Бедную тромбоцитами плазму получали центрифугированием крови при 3000 об/мин в течение 20 минут. Для изучения фибринообразования за основу взят метод определения концентрации фибриногена по Р.А. Рутберг. Полученную центрифугированием цитратную плазму разливали по 1 мл в стеклянные пробирки и маркировали. До активации свертывания в плазму добавляли по 0,1 мл 0,9%-ного NaCl (контроль) или 0,015-0,12%-ных растворов ГХН (опыт) с последующей инкубацией в течение 30 минут при комнатной температуре. Коагуляцию активировали введением 0,1 мл 5%-ного хлористого кальция. Через 1 час инкубации при 37 °С оценивали результат. Оценивались время образования сгустка, внешний вид (цвет, прозрачность, размер), консистенция (эластичность, фрагментируемость), сухая масса фибринового сгустка, растворимость сгустка в 5М мочеvine и 2%-ной уксусной кислоте.

Лабораторные показатели АЧТВ и МНО определялись с помощью коагулометра «Amelung KC 4 Delta» (Tcoag, Ирландия), содержание тромбоцитов подсчитывалось вручную в камере Горяева, Д-димер измерялся с помощью набора для количественного определения на анализаторе RAMP, РФМК определялись с помощью ортофенантролинового теста [3].

Результаты и их обсуждение

Конечную стадию свертывания крови условно разделяют на 3 этапа [3]. На первом, ферментативном, этапе под действием тромбина происходит последовательное отщепление от фибриногена четырех фибринопептидов с образованием мономеров фибрина, способных соединяться с подобными себе молекулами. Второй этап представляет собой спонтанную (неферментативную) сборку мономеров фибрина в димеры (2 молекулы) и олигомеры (от 3 до 10 молекул) фибрина. Образующийся на этой стадии фибрин хорошо растворяется в 5-7 М мочеvine или 2%-ной уксусной кислоте, в связи с чем получил название растворимый фибрин S (solubile). На третьем этапе под влиянием фактора XIII (плазменной трансглутаминазы), которая активируется тромбином в присутствии ионов кальция, в фибрине происходит образование дисульфидных связей между α - и β -цепями, что делает его нерастворимым в мочеvine и уксусной кислоте - фибрин I (insolubile) [3; 7].

Изучение действия гипохлорита натрия на образование фибрина в плазме здоровых доноров

Эксперимент выполнен с кровью пяти здоровых доноров. Во всех пробах без ГХН (контроль) визуально наблюдалось своевременное образование полноценного фибринового сгустка. Взвешивание в данных пробах максимально высушенного остатка подтвердило нормальные значения концентрации фибриногена (рис. 1). Несмотря на отсутствие заметных отличий во времени образования сгустка, консистенция фибрина в опытных образцах имела отличия от контроля и четко определялась концентрацией добавленного ГХН. Начиная с концентрации ГХН 300 мг/л наблюдали дозозависимые визуальные изменения структуры образующегося сгустка.

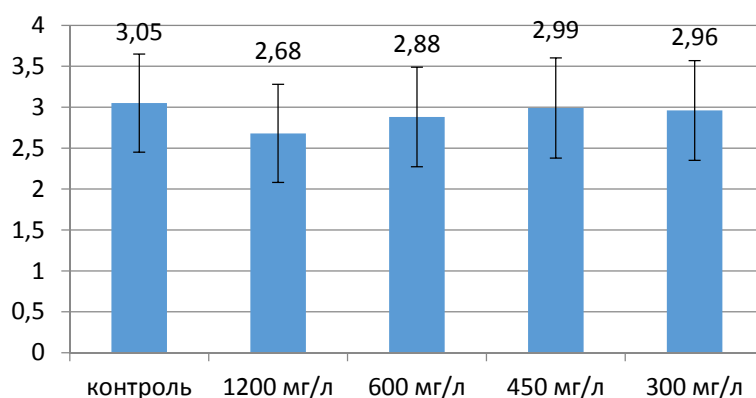


Рис. 1. Сухая масса фибриновых сгустков (г/л) в плазме здоровых доноров (n=5)

В пробах с максимальной концентрацией ГХН наблюдалось образование фибринового геля без каких-либо признаков последующего уплотнения и формирования полноценного белого сгустка. С увеличением концентрации ГХН сгусток становился более рыхлым, терял эластичность и при механическом воздействии легко фрагментировался. Однако результаты взвешивания показали, что масса сухого фибринового сгустка в опытных образцах достоверно не отличалась в сравнении с контролем ($p > 0,05$) (рис. 1).

Своевременное образование фибринового сгустка в пробах с ГХН позволяет утверждать, что ГХН в дозе до 1200 мг/л не оказывает заметного влияния на динамику образования тромбина и процесс его ферментативного действия на молекулы фибриногена. Незначительное изменение сухой массы сгустков по сравнению с контролем показало отсутствие влияния ГХН на процесс самосборки мономеров в протофибриллы фибрина.

Проведена проба на растворимость в 5М мочеvine и 2%-ной уксусной кислоте, сформированных в опытных образцах и в контроле фибриновых сгустков. Сгустки выдерживали в указанных растворах при комнатной температуре в течение 24 часов. Видимой динамики по размерам сгустков в течение суток не наблюдалось (рис. 2).

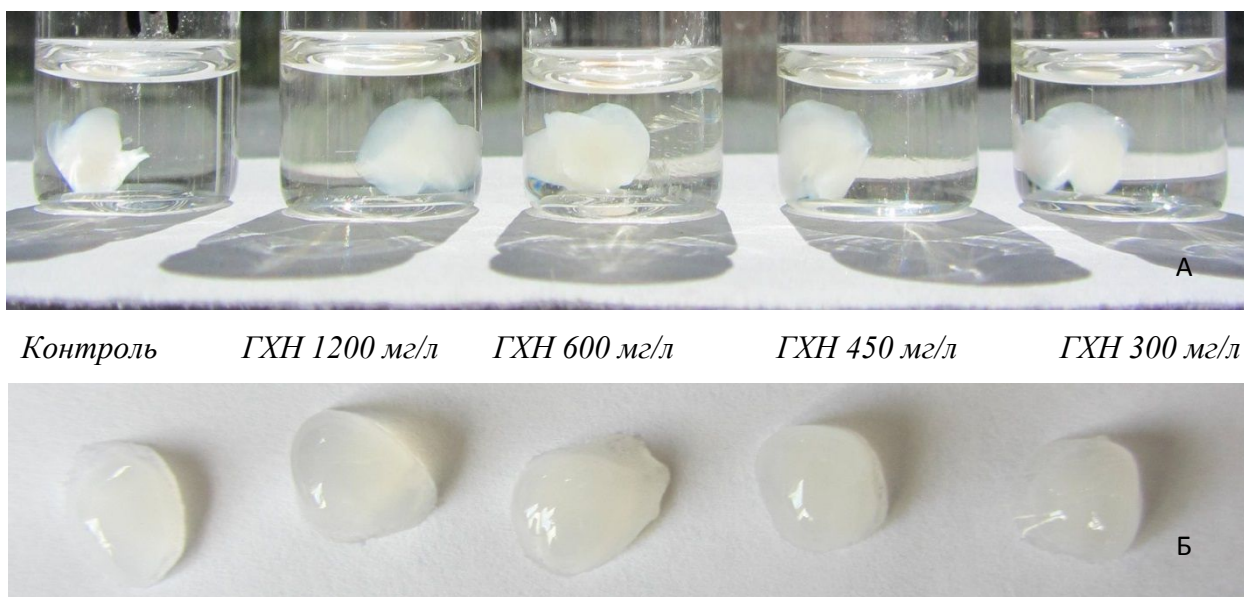


Рис. 2. Динамика размеров сгустков по результатам пробы на растворимость (А) в мочеvine, (Б) в уксусной кислоте

Пробы на растворимость показали отсутствие влияния ГХН на стабилизацию протофибрилл и образование нерастворимого фибрина в плазме здоровых доноров.

Изучалась динамика фибринообразования в богатой (ТП) и бедной тромбоцитами (БТП) плазме (рис. 3). В серии с бедной тромбоцитами плазме ретракция сгустков не наблюдалась (рис. 3Б). В плазме с тромбоцитами наблюдалась быстрая ретракция

фибринового сгустка, без четкой зависимости от наличия и концентрации гипохлорита натрия (рис. 3А). Причем в серии с ТП в двух опытных пробах наблюдалась более отчетливая и ранняя ретракция сгустков по сравнению с контролем, что однозначно исключает ингибирующее влияние ГХН на ретрактивную функцию тромбоцитов. Отличия по массе фибрина между данными сериями были статистически не значимыми.

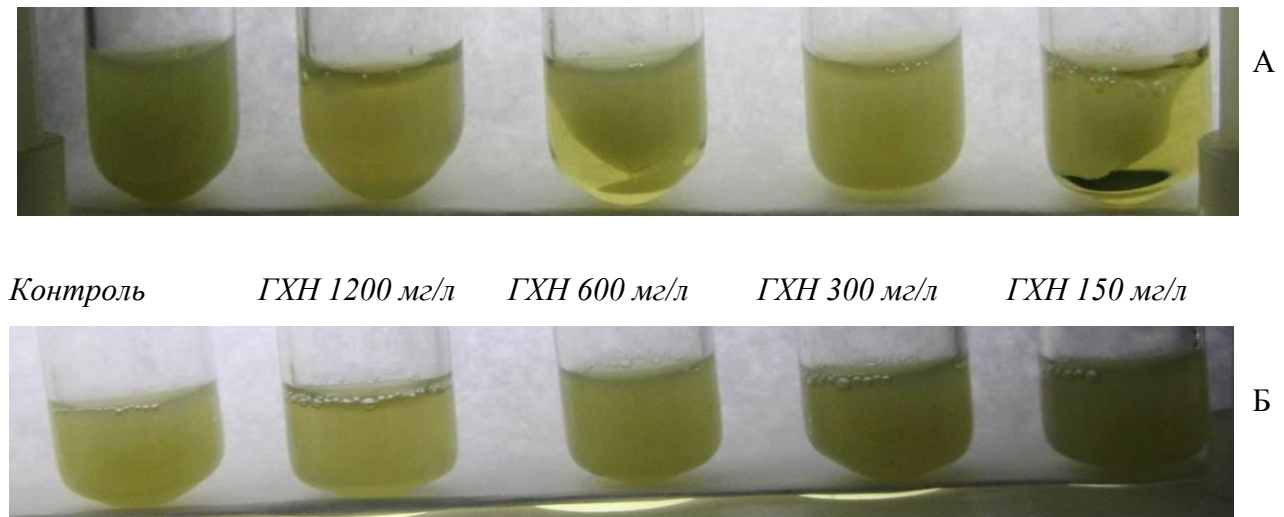


Рис. 3. Влияние ГХН на фибринообразование в богатой (А) (верхний ряд) и бедной (Б) тромбоцитами плазме (нижний ряд)

Таким образом, полученные данные дают возможность утверждать об отсутствии заметного влияния ГХН в изучаемых концентрациях на формирование нерастворимого фибрина и, следовательно, на процесс образования протромбиназы и тромбина в плазме здоровых доноров. Однако остается неясным механизм дозозависимого нарушения ретракции сгустка, так как предположение об угнетающем действии ГХН на ретрактивную функцию тромбоцитов не подтвердилось в сравнительном опыте с богатой и бедной тромбоцитами плазмой. По всей видимости, взаимодействие ГХН с фибриногеном приводит к увеличению адсорбционной связи его молекул с молекулами воды, что препятствует реализации ретрактивной функции, но существенно не влияет на формирование и активность центров полимеризации.

Влияние гипохлорита натрия на массу коагулирующего фибриногена при коагулопатиях различной природы

Изучено влияние ГХН на содержание фибриногена у пациентов с наиболее часто встречающимися видами приобретенных коагулопатий: дилуционной коагулопатией (ДКП) на фоне массивного кровотечения и ДВС-синдромом. ДКП травматического генеза диагностирована на основании клиники массивной кровопотери (более 30% ОЦК), требовавшей восполнения компонентами крови в сочетании с изменениями лабораторных

показателей системы гемостаза (прежде всего, хронометрических коагулологических тестов). В эту группу было включено 5 пациентов. Группу пациентов с ДВС (n=4) составили пациенты с полиорганной недостаточностью, развившейся на фоне сепсиса (перитонит, панкреонекроз, тяжелая пневмония). В качестве критерия диагностики ДВС-синдрома использовали достаточно широко применяемую в настоящее время шкалу японской ассоциации критической медицины DIC JAAM [8]. ДВС-синдром диагностировали при сумме баллов 4 и более. Результаты тестов гемостазиограммы у пациентов различных групп приведены в таблице 1.

Таблица 1

Изменения тестов системы гемостаза на фоне коагулопатий различной природы

	Группы пациентов		
	Контроль (здоровые)	Дилуционная коагулопатия	ДВС-синдром
Балл по шкале DIC JAAM	0	1,40±0,55	4,25±0,50
АЧТВ, с	25,2±2,3	33,4±4,1	40,5±5,6
МНО, ед	1,07±0,14	1,62±0,31	2,04±0,42
Тромбоциты, кл/мл	284±18	192±32	116±28
Д-димеры, нг/мл	121,2±13,2	216,5±27,1	419,3±48,4
Растворимые фибрин-мономерные комплексы, мг/л	3,6±0,1	3,9±0,3	10,5±1,0
Фибриноген (по методу Рутберг), мг/л	2342±254	1692±305	986±220
Фибриноген (в тесте с ГХН), мг/мл	2394±196	1724±360	1275±240
Абсолютное изменение концентрации фибриногена в тесте с ГХН, мг	+52	+32	+289
Число пациентов, у которых прирост концентрации ФГ был более 250 мг/мл	1	0	3

У пациентов с дилуционной коагулопатией регистрировалось увеличение значений хронометрических коагуляционных тестов, незначительное снижение количества тромбоцитов и невыраженный рост уровня Д-димеров. Уровень РФМК не выходил за рамки нормальных значений. Концентрация фибриногена снижалась, но не достигала критических значений. В этой группе пациентов добавление к плазме растворов ГХН не приводило к увеличению массы сгустка.

В группе пациентов с коагулопатией потребления выраженность расстройств гемостаза была значительно большей. Наряду с увеличением АЧТВ и МНО, регистрировалось значимое увеличение Д-димеров и РФМК и снижение количества тромбоцитов. Концентрация фибриногена была снижена до 980±220 г/л. В данной группе

добавление ГХН к плазме приводило к росту концентрации фибриногена, причём у 3 из 4 пациентов увеличение концентрации было больше чем 0,25 г/л. Эта степень увеличения (более чем на 250 мг/л) эмпирически принята за практический уровень, имеющий диагностическое значение.

Данные наблюдения позволили предположить, что ГХН приводит к восстановлению коагуляционной способности фибриногена, блокированного вторичными антикоагулянтами, образующимися в процессе фибринолиза и внутрисосудистого свёртывания.

Для подтверждения данного предположения мы изучили фибринообразование на фоне ятрогенной коагулопатии, вызванной действием препаратов тромболитического действия. Тромболитическая терапия создает искусственное состояние гиперфибринолиза с целью восстановления тромботической или тромбоэмболической закупорки кровотока в критических состояниях, что сопровождается многократным увеличением плазменной концентрации продуктов лизиса фибрина и фибриногена [9; 10]. Был проведен эксперимент с плазмой трех больных острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу, получивших различные варианты тромболитической терапии. Кровь для исследования забиралась из периферической вены в интервале от 6 до 12 часов после окончания процедуры тромболизиса. В двух случаях с целью тромболизиса использовался препарат Акtilизе (алтеплаза – тканевой активатор плазминогена) в дозе 80 мг; в одном – Метализе (тенектеплаза - рекомбинантный активатор плазминогена) в дозе 7000 ЕД. Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние ГХН на массу коагулирующего фибрина после тромболизиса

Терапия	Фибриноген, г/л				
	контроль	ГХН			
		1200 мг/л	600 мг/л	450 мг/л	300 мг/л
Акtilизе	2,1	4,9	6,0	6,3	5,0
Акtilизе	3,5	+	4,5	6,0	4,75
Метализе	+	+	+++	+++	-

Примечание: + - визуальная оценка фибринообразования.

Несмотря на нормальные значения концентрации фибриногена, визуальная оценка выявила заметно слабое фибринообразование во всех контрольных пробах. По сравнению с контролем, в большинстве опытных проб с Акtilизе отмечалось как визуальное, так и гравиметрическое усиление фибринообразования (рис. 4). Практически во всех опытных пробах концентрация фибриногена существенно превышала значения контроля с

максимумом в интервале доз ГХН 450-600 мг/л.

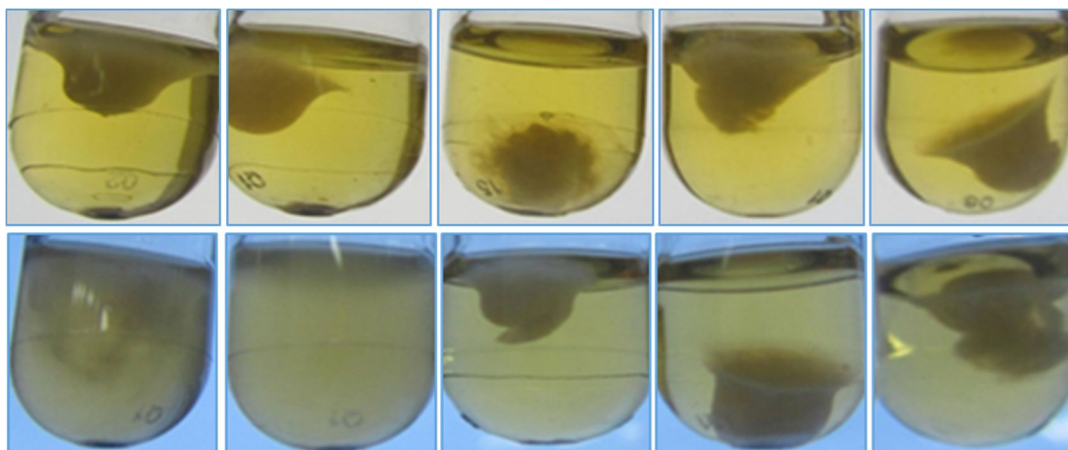


Рис. 4. Влияние ГХН на фибринообразование до (верхний ряд) и после (нижний ряд) тромболиза Актилизе (80 мг). Слева направо: контроль, ГХН 1200 мг/л, ГХН 600 мг/л, ГХН 450 мг/л, ГХН 300 мг/л

В эксперименте с Метализе, ввиду малой массы образующихся сгустков, определить массу фибрина методом Рутберг не представлялось возможным, поэтому была проведена только визуальная оценка результатов. На рисунке 5 хорошо видно явное отличие от контроля в пробах 2 (ГХН 600 мг/л) и 3 (ГХН 450 мг/л).

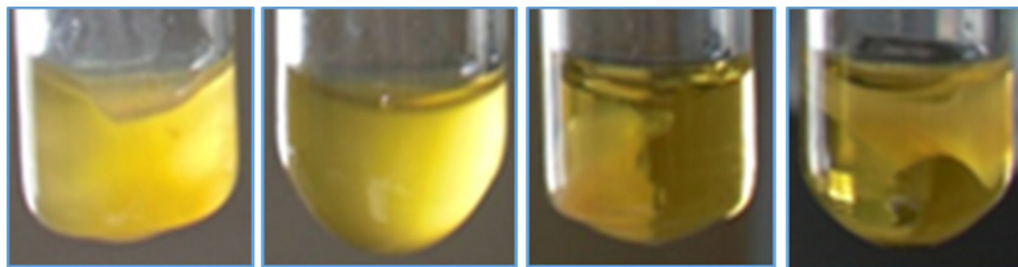


Рис. 5. Влияние ГХН на фибринообразование после тромболиза Метализе (7000 ЕД). Слева направо: контроль, ГХН 1200 мг/л, ГХН 600 мг/л, ГХН 450 мг/л

Интересно, что в двух опытных пробах с ГХН в концентрации 1200 мг/л увеличения образования фибрина не наблюдалось, а в одной уступало по интенсивности пробам с пониженными концентрациями окислителя. По всей видимости, существует различие тропности ГХН к различным молекулам фибриногенового пула, что определяет первоочередное окисление вторичных антикоагулянтов и улучшение коагуляционных свойств плазмы. Высокие концентрации ГХН приводят к окислению также и молекул нормального фибриногена, что объясняет наблюдаемое нарушение фибринообразования в пробах с концентрацией 1200 мг/л.

Выводы. Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют сделать заключение, что при смешивании *in vitro* плазмы крови, содержащей продукты паракоагуляции, с растворами гипохлорита натрия наблюдается зависимость от дозы окислителя усиление свертывающей способности этой плазмы, выражающееся в увеличении массы коагулирующего фибрина. Данное умозаключение послужило основанием для разработки нового метода диагностики коагулопатии потребления [11].

Описание метода. Исследуемую кровь быстро забирают в чистую сухую пробирку с 1 мл 3,8%-ного цитрата натрия до отметки 10 мл, закрывают плотно пробкой и тщательно перемешивают многократным переворачиванием. Пробирку помещают в центрифугу на 10 мин при 3000 об/мин. Разделяют цитратную плазму на четыре сухие маркированные пробирки по 1 мл: одна контрольная, три опытные. В контрольную пробирку добавляют 0,1 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия (NaCl), в 1, 2 и 3-ю опытные пробирки по 0,1 мл 0,03%, 0,06% и 0,09%-ного раствора гипохлорита натрия (NaClO) соответственно. Пробирки перемешивают плавным вращением. Контрольную и опытные пробирки выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин. В контрольную и опытные пробирки добавляют по 0,1 мл 5%-ного раствора хлорида кальция (CaCl₂). Пробирки перемешивают плавным вращением и помещают в термостат при 37 °С на 30 мин. Образовавшиеся в исследуемых пробирках фибриновые сгустки поочередно отжимают насухо на фильтровальной бумаге и взвешивают на лабораторных весах гравиметрическим методом Р.А. Рутберг. Результат взвешивания записывают и оценивают по следующей схеме. Для расчета берется один опытный образец с наибольшей массой полученного сухого фибрина. Определяют разность массы сухого фибрина в этой пробе и в контрольной пробе. При положительном значении разности от 0,25 г/л (минимальное значение достоверной воспроизводимости теста) проба считается положительной, что свидетельствует о наличии в изучаемой плазме продуктов паракоагуляции – маркеров ДВС-синдрома. С увеличением разности повышается достоверность лабораторной диагностики ДВС-синдрома.

По сумме результатов всех тестов с ГХН, проведенных как у пациентов с ДВС-синдромом, так и без него, были определены чувствительность и специфичность этого метода. Он оказался положительным у 3 из 4 пациентов, которым был выставлен диагноз ДВС-синдром по шкале DIC JAAM, чувствительность составила 75%. У пациентов, не имеющих ДВС-синдрома, ложноположительный результат был зарегистрирован в 1 случае из 9, таким образом, специфичность была равна 89%. Отметим, что количество наблюдений недостаточно для корректного суждения о диагностических возможностях метода, однако мы считаем, что благодаря своей простоте и доступности он может стать дополнением к набору методов диагностики ДВС-синдрома.

Список литературы

1. Levi M. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation. Review / Int. J. Lab. Hematol. – 2014. – Vol. 36, № 3. – P. 228-236.
2. Интенсивная терапия острых нарушений гемостаза в акушерстве (коагулопатия и ДВС-синдром): клинические рекомендации / А.В. Куликов, Е.М. Шифман, А.Ю. Буланов и др.. – М., 2017. – 33 с.
3. Алексеева Л.А. ДВС-синдром / Л.А. Алексеева, А.А. Рагимов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 120 с.
4. Hatada T. Analysis of the cutoff values in fibrin-related markers for the diagnosis of overt DIC / T. Hatada, H. Wada, K. Kawasugi [et al.] // Clin. Appl. Thromb. Hemost. – 2012. – Vol. 18, № 5. – P. 495-500. doi: 10.1177/1076029611429786.
5. Столяров Г.С. Влияние гипохлорита натрия на коагуляционные и реологические свойства крови при различном течении перитонита (клинико-экспериментальное исследование): дис. ... канд. мед. наук. - Нижний Новгород, 2003. – 137 с.
6. Пятаев Н.А. Диагностическое и прогностическое значение различных маркеров эндогенной интоксикации при перитоните / Н.А. Пятаев, И.С. Котлов, Г.А. Бояринов, В.В. Кузин // Эфферентная терапия. – 2002. – Т. 8, № 2. – С. 49-56.
7. Wada H. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines / H. Wada, T. Matsumoto, Y. Yamashita // J. Intensive Care. – 2014. – Vol. 20, № 2. – P. 15-23. doi: 10.1186/2052-0492-2-15.
8. Gando S. Evaluation of new Japanese diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation in critically ill patients / S. Gando, H. Wada, H. Asakura [et al.] // Clin. Appl. Thromb. Hemost. – 2005. – № 11. – P. 71-76.
9. Альфонсов В.В. Механизмы развития морфологического эквивалента ДВС-синдрома / В.В. Альфонсов, Е.В. Альфонсова // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2010. – № 1. – С. 44-51.
10. Matosevic B. Fibrinogen degradation coagulopathy and bleeding complications after stroke thrombolysis / B. Matosevic, M. Knoflach, P. Werner [et al.] // Neurology. – 2013. – Vol. 80, № 13. – P. 1216-1224. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182897015.
11. Способ диагностики синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания: Пат. 2605374 Российская Федерация, МПК G01N33/50 / Столяров Г.С., Пятаев Н.А., Минаева [и др.]; заявитель и патентообладатель Национальный иссл. Морд. гос. ун-т им. Н.П. Огарева. – № 2015121472/15; заявл. 04.06.2015; опубл. 27.11.16.