

УДК 612.115

ВПЛИВ РОЗЧИННОГО ФІБРИНУ НА ПРОЦЕСИ ЗСІДАННЯ КРОВІ ТА АГРЕГАЦІЇ ТРОМБОЦИТІВ

Н. В. ЗАІЧКО¹, Т. М. ЧЕРНИШЕНКО², Т. М. ПЛАТОНОВА², Г. Л. ВОЛКОВ²

¹Український державний інститут реабілітації інвалідів МОЗ України, Вінниця;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: SAN@biochem.kiev.ua

Накопичення у плазмі крові розчинного фібрину свідчить про порушення динамічної рівноваги системи гемостазу та є загрозою розвитку тромботичних ускладнень.

Показано, що накопичення розчинного фібрину у плазмі крові супроводжується скороченням часу зсідання її плазми в тестах анцистроновий і тромбіновий час, а також прискорює процес агрегації тромбоцитів. Для ранньої діагностики ВЗК-синдрому доцільно проводити комплексну оцінку стану системи гемостазу з обов'язковим визначенням вмісту розчинного фібрину та виконанням парних тестів анцистроновий і тромбіновий час, а також дослідженням процесу агрегації тромбоцитів.

Ключові слова: зсідання крові, ВЗК-синдром, розчинний фібрин, тромбоцити.

Синдром внутрішньосудинного зсідання крові (ВЗК-синдром) характеризується надмірною активацією системи зсідання крові, прогресуючим внутрішньосудинним утворенням фібрину з наступним надмірним споживанням та виснаженням білків системи зсідання крові, порушенням функції тромбоцитів, розвитком тромботичних та геморагічних ускладнень [1–3].

ВЗК-синдром є наслідком хірургічного втручання та частим ускладненням різних патологічних станів, таких як сепсис, онкологічні та серцево-судинні захворювання, і посідає одне з перших місць серед причин смертності цих категорій хворих [3]. Тому надзвичайно важливим є виявлення активації системи зсідання крові у хворих з підвищеним ризиком розвитку ВЗК-синдрому.

При ВЗК-синдромі ступінь активації системи зсідання крові визначається накопиченням розчинного фібрину, DD-фрагмента фібрину, фібринопептиду А, тромбін-анти-тромбінових комплексів (ТАТ), фрагмента 1+2 протромбіну. Є повідомлення, що високий вміст фібриногену може бути прогностичним чинником розвитку тромботичних ускладнень у хворих із ВЗК-синдромом [4–6].

Поява у плазмі крові розчинного фібрину, що в лабораторній діагностичній практиці позначається як РФМК (розчинний фібрин-мономерний комплекс), є одним із головних показників стану гіперкоагуляції, оскільки РФМК – це олігомерні комплекси фібрину з фібриногеном та продуктами деградації фібри-

ну/фібриногену. Накопичення РФМК свідчить не тільки про активацію системи зсідання крові, але й про порушення динамічної рівноваги між функціонуванням системи зсідання крові та фібринолізом [7]. На жаль, остаточно не з'ясовано, чи впливають РФМК на активність процесів зсідання крові та функціональні властивості тромбоцитів самостійно. З іншого боку, дослідження молекулярних механізмів регуляції взаємодії білків системи зсідання крові є необхідною передумовою для розуміння перебігу опосередкованих ними фізіологічних та патологічних процесів.

З огляду вищенаведеного, ми поставили за мету дослідити вплив РФМК на процеси зсідання плазми крові та агрегації тромбоцитів. Для виконання роботи було використано комплекс діагностичних тестів, які дозволяють виявити ранні зміни в системі гемостазу при розвитку ВЗК-синдрому та контролювати ефективність його лікування.

Матеріали і методи

Комплексне дослідження стану системи гемостазу проведено у хворих із тромбоемболією легеневої артерії (ТЕЛА, $n = 24$), гострим трансмуральним інфарктом міокарда (ГІМ, $n = 36$), тяжкими опіковими ураженнями шкіри (площею 40–70%, $n = 14$) та у жінок після кесарева розтину ($n = 45$).

Забір крові для дослідження проводили з ліктьової вени широкою голкою у пластикові пробірки з антикоагулянтом (3,8%-й розчин тринатрію цитрату у співвідношенні 9 : 1). Ба-

гату та бідну на тромбоцити плазму одержували згідно з методами [8, 9].

Визначали вміст фібриногену, антитромбіну III (АТІІІ), протеїну С (РС), РФМК за методами, описаними в роботі [10]. Для характеристики внутрішнього та зовнішнього шляхів зсідання крові визначали активований частковий тромбопластичний час (АЧТЧ), протромбіновий час (ПЧ), а для характеристики кінцевого етапу системи зсідання крові – тромбіновий (ТЧ) та анцистроновий час АЧ – аналог рептилазного [8–10].

Агрегацію тромбоцитів досліджували на агрегометрі AP2110 («Солар», Білорусь). Як індуктор агрегації використовували аденозиндифосфат (ADP, «Технологія – Стандарт», Росія). Робочі розведення ADP ($2,5 \times 10^{-6}$ М та $0,625 \times 10^{-6}$ М у системі тесту) готували безпосередньо перед дослідженням згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Реєстрували ступінь агрегації – максимальний рівень світлопропускання плазми крові після внесення індуктора агрегації, швидкість агрегації – зміну світлопропускання плазми крові за хвилину після внесення індуктора агрегації та час агрегації – час досягнення максимального ступеня агрегації.

Статистичне оброблення одержаних результатів проводили на персональному комп'ютері за допомогою стандартних статистичних програм «Microsoft Excel» для Windows-2000. Оцінювали середнє значення, стандартні помилки, вірогідність відмінностей за *t*-критерієм Стьюдента. Проводили парний кореляційний аналіз. Результати наведено як $M \pm m$.

Результати та обговорення

Для оцінки стану системи гемостазу хворих нами розроблено комплекс діагностичних тестів, який дозволяє оцінити більше 20 параметрів системи гемостазу [7, 10, 11]. Цей комплекс тестів було використано для дослідження стану системи гемостазу хворих із діагностованими тромбозами (гострий інфаркт міокарда, тромбоемболія легеневої артерії) та хворих із підвищеним ризиком тромбозів (жінки після кесарева розтину та хворі з опіковою травмою).

Традиційно у клінічній практиці для характеристики кінцевого етапу зсідання крові визначають час зсідання плазми крові за дії тромбіну (тромбіновий час) та йонів кальцію (час рекальцифікації). Однак за умов гепаринотерапії час зсідання плазми крові в тестах тромбіновий час та час рекальцифікації значно подовжується, що ускладнює проведення аналізу. Тому для характеристики кінцевого етапу зсідання крові ми доповнили арсенал

діагностичних тестів методом визначення АЧ Т. П. Угарової [12]. Для виконання даного тесту використовується тромбіноподібний фермент – анцистрон Н, який виділено з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*) [10, 11]. На відміну від тромбіну тромбіноподібні ферменти не інгібуються АТ ІІІ та гепарином, не активують фактор ХІІІ, не спричиняють ретракцію згустків [7, 12].

Введення гепарину призводить до значного подовження часу зсідання плазми крові за дії тромбіну (ТЧ) і не впливає на час зсідання плазми крові за дії тромбіноподібних ферментів (АЧ). Тому для контролю ефективності гепаринотерапії та чутливості плазми крові до гепарину інформативним методом є порівняння результатів обох тестів – ТЧ та АЧ.

Для визначення ступеня активації системи зсідання крові та прогнозування розвитку тромботичних ускладнень обов'язковим є точна інформація про кількість РФМК у плазмі крові, їхній склад та вплив на функціонування окремих ланок системи гемостазу. Розроблений В. О. Беліцером та Т. В. Варецькою експрес-метод виявлення РФМК є досить чутливим і дозволяє оцінити їхній вміст у плазмі крові, на відміну від якісних тестів, широко вживаних у клінічних лабораторіях (етаноловий, протамінсульфатний та ін.) [13, 14].

В усіх групах обстежених було виявлено маркери активації процесу гемокоагуляції: підвищення вмісту фібриногену, накопичення РФМК, зниження активності РС та АТІІІ (табл. 1). Це свідчить про глибокі порушення в системі гемостазу, а саме про розвиток ВЗК-синдрому.

Особливу увагу було приділено аналізу ТЧ та АЧ. Умови тесту АЧ розроблені таким чином, що час зсідання плазми крові за впливу анцистронон залежить від концентрації фібриногену: контрольний час зсідання плазми крові в тесті АЧ – 30 с відповідає вмісту фібриногену в межах нормальних показників 2,0–3,2 г/л. Зниження або підвищення вмісту фібриногену призводить до значного подовження часу зсідання плазми крові в тесті АЧ (рис. 1). Ці дані було одержано на модельних системах, в яких до плазми крові донора додавали фібриноген до загальної концентрації 4, 5 і 6 г/л та визначали час зсідання плазми крові в тесті АЧ.

Оскільки в більшості обстежених хворих рівень фібриногену перевищував верхню межу норми (3,2 г/л) ми розраховували АЧ за наведеним на рис. 1 графіком залежності АЧ від концентрації фібриногену у плазмі крові хворих (АЧ очікуваний). Виявилось, що визначений нами

Таблиця 1. Показники системи гемостазу в здорових осіб та у хворих із тромбозами та підвищеним ризиком розвитку тромбозів ($M \pm m$)

Групи хворих	Фібриноген, г/л	РФМК, мкг/мл	АТПІ, %	ПС, %
ГІМ, $n = 36$	$3,1 \pm 0,15^*$	$0,050 \pm 0,001^*$	$71,5 \pm 8,5^*$	$65,3 \pm 4,9^*$
ТЕЛА, $n = 24$	$4,1 \pm 0,23^*$	$0,036 \pm 0,007^*$	$87,9 \pm 2,9^*$	$77,4 \pm 4,7^*$
Опікова травма, $n = 14$	$5,1 \pm 0,87^*$	$0,053 \pm 0,001^*$	$57,2 \pm 12,8^*$	$58,6 \pm 2,4^*$
Кесарів розтин, $n = 45$	$5,9 \pm 0,28^*$	$0,090 \pm 0,007^*$	$87,5 \pm 3,6^*$	$58,3 \pm 4,6^*$
Донори, $n = 11$	$2,4 \pm 0,3$	0	$99,6 \pm 3,4$	$103,5 \pm 2,1$

* $p < 0,05$ відносно донорів. Тут і в табл. 2 ГІМ – гострий інфаркт міокарда; ТЕЛА – тромбоемболія легеневої артерії.

Таблиця 2. Порівняльна оцінка анцистронового часу, одержаного на модельній системі (очікуваний АЧ) та визначеного у плазмі крові хворих ($M \pm m$)

Групи хворих	Фібриноген, г/л	Очікуваний АЧ, с	Визначений АЧ, с	ТЧ, с
ГІМ, $n = 36$	$3,1 \pm 0,15$	$30,2 \pm 0,5$	$28,2 \pm 1,5$	$11,3 \pm 0,4^*$
ТЕЛА, $n = 24$	$4,1 \pm 0,23$	$40,2 \pm 3,2$	$31,1 \pm 2,1^*$	$10,8 \pm 0,7^*$
Опікова травма, $n = 14$	$5,1 \pm 0,87$	$49,0 \pm 4,3$	$30,3 \pm 1,7^*$	$12,5 \pm 0,6$
Кесарів розтин, $n = 45$	$5,9 \pm 0,28$	$53,5 \pm 5,4$	$31,6 \pm 0,7^*$	$10,6 \pm 0,2^*$
Донори, $n = 11$	$2,4 \pm 0,3$		$30,2 \pm 0,5$	$13,2 \pm 0,3$

* $p < 0,05$ відносно очікуваного АЧ.

АЧ у цих пацієнтів, одержаний при проведенні тесту, був достовірно нижчим, ніж очікуваний АЧ та наближався до АЧ донорів (табл. 2). Це є свідченням істотного прискорення процесу зсідання крові у присутності РФМК в обстежених пацієнтів та є показником тромбофілічного стану системи гемостазу.

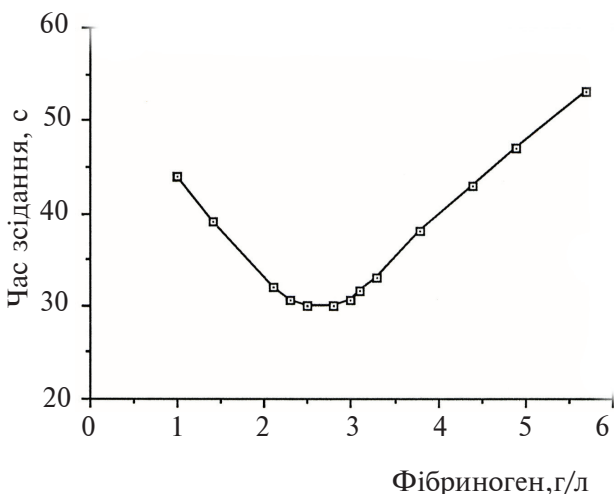


Рис. 1. Вплив вмісту фібриногену на час зсідання плазми крові в тесті анцистроновий час.

Кореляційний аналіз показав наявність тісного зворотного зв'язку між часом зсідання плазми крові в тесті АЧ і рівнем РФМК ($r = -0,75$, $p < 0,05$). Ймовірно, РФМК слугує каталізатором процесу зсідання плазми крові, тому скорочення часу зсідання плазми крові в тесті АЧ можна розцінювати як предиктор формування тромбофілічного синдрому.

Для детальнішого з'ясування впливу РФМК на заключний етап зсідання крові – перетворення фібриногену на фібрин та його полімеризацію за дії екзогенного ферменту – наступний етап дослідження було проведено на модельних системах *in vitro*.

Для виконання цього завдання у плазмі крові донорів штучно вносили екзогенний фібрин-мономер у концентраціях, які відповідають його вмісту у плазмі крові хворих з ВЗК-синдромом, і визначали ТЧ та АЧ зсідання модельної плазми. Виявилось, що час зсідання плазми крові за впливу анцистроноу скорочується пропорційно збільшенню вмісту екзогенного фібрин-мономеру в донорській плазмі. Таким чином, і за умов *in vitro* нами підтверджено існування тісної зворотної взаємозалежності між вмістом розчинного фібрину у плазмі крові і АЧ (рис. 2).

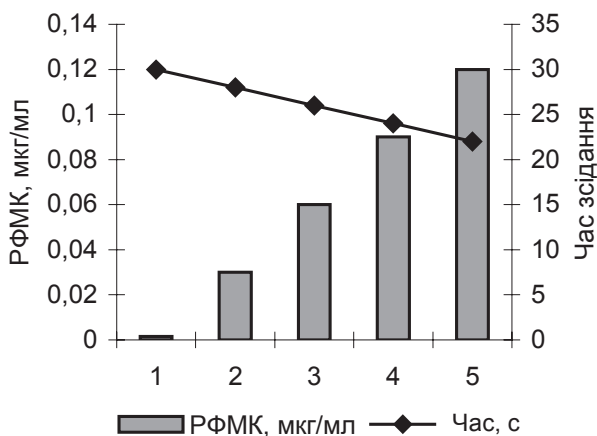


Рис. 2. Вплив розчинного фібрину на час зсідання плазми крові в тесті анцистроновий час.

Відомо, що важливу роль у формуванні ВЗК-синдрому відіграє тромбоцитарна ланка гемостазу, оскільки саме функціональна спроможність тромбоцитів значною мірою обумовлює швидкість та інтенсивність тром-

боутворення. Остаточного не з'ясовано чи впливає накопичення РФМК у плазмі крові на стан тромбоцитів, зокрема на процес їхньої агрегації.

На рис. 3 представлено динаміку швидкості агрегації тромбоцитів залежно від вмісту РФМК у хворих з гострим інфарктом міокарда впродовж гепаринотерапії. Показано, що накопичення РФМК у плазмі крові хворих із ГІМ супроводжується прискоренням процесу агрегації тромбоцитів (перша доба). Дослідження цих показників у динаміці на тлі гепаринотерапії показало, що зниження вмісту РФМК у плазмі хворих на ГІМ відбувається водночас із нормалізацією процесу агрегації тромбоцитів (третя доба). В той самий час після відміни гепаринотерапії (сьома доба) має місце “рикошетна” реакція – підвищується вміст РФМК та зростає швидкість агрегації тромбоцитів, що свідчить про зростання гемокоагуляційного потенціалу і загрозу ретромбозу.

Для об'єктивізації одержаних результатів ми перевірили вплив препарату фібрин-мономера на процес агрегації тромбоцитів *in vitro*.

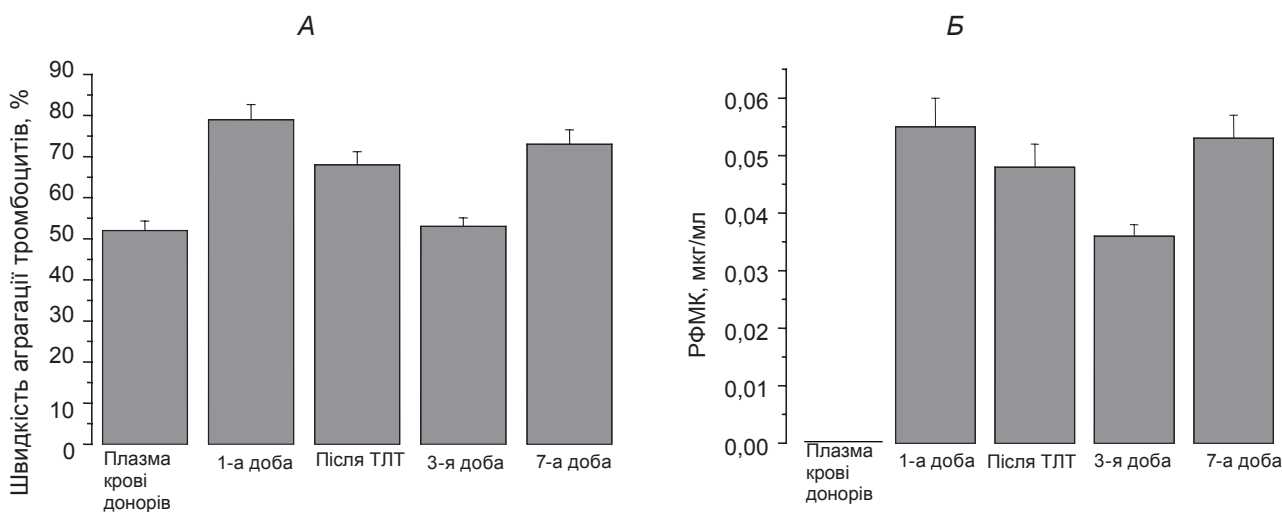


Рис. 3. Агрегація тромбоцитів (А) та вміст розчинного фібрину (Б) у плазмі крові хворих із гострим інфарктом міокарда у процесі лікування: перша доба після інфаркту, через дві години після проведення тромболітичної терапії стрептокіназою, на третю та сьому добу.

Таблиця 3. Показники агрегації тромбоцитів донорської плазми, індукованої ADP ($2,5 \times 10^{-6}$ M), до внесення екзогенного розчинного фібрин-мономера та за його присутності ($M \pm m$)

Показники агрегації тромбоцитів (n = 30)	До внесення фібрин-мономера	Після додавання фібрин-мономера
Ступінь агрегації, %	67,6 ± 3,13	79,4 ± 3,29*
Швидкість агрегації, % / хв	52,0 ± 2,61	61,5 ± 2,51*
Час агрегації, с	375,5 ± 18,2	387,9 ± 15,6

* $p < 0,05$ порівняно зі станом без фібрин-мономера.

Багату на тромбоцити плазму донорів ділили на дві частини, додаючи в одну екзогенний фібрин-мономер в концентраціях, які відповідають його вмісту у плазмі крові хворих із ВЗК-синдромом. Потім на агрегометрі AP2110 досліджували процес агрегації тромбоцитів, індукований ADP.

Виявилось, що у присутності екзогенного фібрин-мономеру достовірно зростає швидкість та ступінь агрегації тромбоцитів (табл. 3). Крім того, за зазначених умов істотно змінюється характер агрегаційної кривої. Крива агрегації тромбоцитів, індукованої ADP ($2,5 \times 10^{-6}$ М), в нормі має двофазний незворотний характер. Після внесення фібрин-мономера вона змінюється на однофазну незворотну. Крива агрегації тромбоцитів, індукованої низькою концентрацією ADP ($0,625 \times 10^{-6}$ М), в нормі є зворотною з дезагрегацією, а у присутності фібрин-мономера вона незворотна та двох- або однофазна. Такі зміни характеру процесу агрегації також підтверджують активацію тромбоцитів у присутності РФМК.

Узагальнюючи результати проведених досліджень можна стверджувати, що присутній у плазмі крові розчинний фібрин виконує роль каталізатора, який прискорює процеси агрегації тромбоцитів та зсідання плазми крові. Накопичення у плазмі крові РФМК свідчить про порушення динамічної рівноваги плазменної та клітинної ланок системи гемостазу, що є загрозою розвитку тромботичних ускладнень.

Визначення вмісту РФМК у плазмі крові, дослідження ТЧ та АЧ, а також оцінка показників агрегації тромбоцитів є інформативним діагностичним комплексом для прогнозування тромботичних процесів і контролю за ефективністю гепаринотерапії.

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИМОГО ФИБРИНА НА ПРОЦЕССЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

*Н. В. Заичко¹, Т. М. Чернышенко²,
Т. Н. Платонова², Г. Л. Волков²*

¹Украинский государственный институт реабилитации инвалидов МЗ Украины, Винница;

²Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: SAN@biochem.kiev.ua

Появление в плазме крови растворимого фибрина свидетельствует о нарушении динамического равновесия системы гемостаза, что представляет угрозу развития тромботических осложнений.

Показано, что накопление РФМК в плазме крови сопровождается сокращением времени свертывания плазмы крови в тестах анцистроновое и тромбиновое время, а также усилением процесса агрегации тромбоцитов. Для ранней диагностики ДВС-синдрома целесообразно проводить комплексную оценку системы гемостаза с обязательным определением содержания РФМК, выполнением парных тестов анцистроновое и тромбиновое время, а также исследованием процесса агрегации тромбоцитов.

Ключевые слова: свертывание крови, ДВС-синдром, РФМК, тромбоциты.

INFLUENCE OF SOLUBLE FIBRIN ON THE BLOOD COAGULATION PROCESS AND PLATELETS AGGREGATION

*N. V. Zaichko¹, T. M. Chernyshenko²,
T. N. Platonova², G. L. Volkov²*

¹Ukrainian State Scientific Research Institute of Invalid Rehabilitation, Vinnitsa;

²Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: SAN@biochem.kiev.ua

Summary

The accumulation of soluble fibrin (SF) in the blood plasma causes acceleration of the final stage of blood coagulation. It increases functional activity of a hemostasis system platelet link, that is the precondition of thrombotic complication. Accumulation of SF in the blood plasma is accompanied by proportional reduction of coagulation time in ancistron and thrombin time tests, and also the intensification of platelets aggregation process. A conclusion was drawn that for early diagnostics of the DIC-syndrom it is expedient to carry out complex estimation of the hemostasis system with obligatory definition of the blood SF content, performance of ancistron and thrombin time tests, and also study of platelets aggregation.

Key words: blood coagulation, soluble fibrin, platelet, DIC-syndrom.

1. *Levi M.* // Crit. Care. Clin. — 2005. — **21**, N 3. — P. 449–467.
2. *Wang J., Ly J., Liu Q.* // Neurosci. Lett. — 2005. — **384**, N 3. — P. 305–309.
3. *Воробьев А. И., Васильев С. А., Городец-ский В. М.* // Терапевтический архив. — 2002. — № 7. — С. 73–76.

4. Bates S. M., Ginsberg J. S., Straus S. E. et al. // JAMC. – 2000. – **163**, N 8. – P. 1016–1021.
5. Wada H., Sakuragawa N., Mori Y., Takagi M. // Am. J. Hematol. – 1999 Apr; – **60**(4). – P. 273–278.
6. Wada H., Mori Y., Okabayashi K. // Am. J. Hematol. – 2003. – **72**, N 1. – P. 1–7.
7. Савчук О. М., Краснобрижа Є. М., Платонова Т. М. та ін. // Лаб. діагностика. – 2002. № 2. – С. 50–54.
8. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник под ред. В. В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
9. Момот А. П. // Лаб. діагностика. – 2004. – № 2. – С. 52–70.
10. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньосудинного мікрозсідання крові (методичні рекомендації) / Київ, 1994. – С. 23.
11. Платонова Т. М., Чернишенко Т. М., Горницька О. В. та ін. // Лаб. діагностика. – 2000. – № 3. – С. 3–11.
12. Соловьев Д. А., Угарова Т. П. // Биохимия. – 1993. – **58**, вып. 8. – С. 1221–1233.
13. Варецька Т. В., Михаловська Л. І., Світацька Л. О., Єна Я. М. // Клін. лаб. діагностика – 1992. – № 7–8. – С. 10–14.
14. Михаловская Л. И., Варецкая Т. В., Белицер В. А. // Укр. биохим. журн. – 1988. – **60**, N 4. – С. 3–8.

Отримано 12.05.2006