

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ТРОМБА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПОКРЫТИЙ

А.В. ВОРОНИН¹, Н.Э. ДЖУМАЕВА¹, О.В. КИМ¹, М.М. ЮСУПОВ¹, Р.А. САДЫКОВ², Р.Р. КАБУЛОВ³

1 - ГУ «Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр хирургии имени академика В. Вахидова», Республика Узбекистан, г. Ташкент;

2 - Ташкентская медицинская академия, Республика Узбекистан, г. Ташкент;

3 - Физико-технический институт Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент

БИЛОГИК ҚОПЛАМАНИ ШАКИЛЛАНТИРИШ УЧУН ТРОМБ НИ БАҲОЛАШ УСУЛЛАРИНИ СОЛИШТИРМА ТАДҚИҚОТИ

А.В. ВОРОНИН¹, Н.Э. ДЖУМАЕВА¹, О.В. КИМ¹, М.М. ЮСУПОВ¹, Р.А. САДИКОВ², Р.Р. КАБУЛОВ³

1 - «Академик В.Вохидов номидаги Республика ихтисослаштирилган илмийғамалий тиббиет маркази» ДК, Ўзбекистон Республикаси, Тошкент ш.;

2 - Тошкент Тиббиёт Академияси, Ўзбекистон Республикаси, Тошкент ш.;

3 - Ўзбекистон Республикаси Фанлар Академияси Физика-техник институти

COMPARATIVE STUDY OF EVALUATION METHODS OF THE THROMBUS FOR BIOSEALANTS FORMATION

A.V. VORONIN¹, N.E. DJUMAIEVA¹, O.V. KIM¹, M.M. YUSUPOV¹, R.A. SADYKOV², R.R. KABULOV³

1 - SI «Republic specialized scientific-practical medical center of surgery named after academician V. Vakhidov», Republic of Uzbekistan, Tashkent;

2 - Tashkent medical academy, Republic of Uzbekistan, Tashkent;

3 - Physical-technical institute at Academy of Science, Republic of Uzbekistan, Tashkent

Тромб асосида янги биоқопламаларни ишлатиш тиббиётнинг келажак йўналишларидан ҳисобланади. Тромбни организмга ножўя таъсир кўрстамайдиган табиий биологик материал деб ҳисоблаш мумкин. Айниқса бу талабларга шаклланган тромблар жавоб беради. Шу сабабли тромблар ретракциясини баҳолаш усуллари, ҳамда уларнинг физик ва механик хусусиятларини ўрганишга қизиқиш тобора ортиб бормоқда. Олиб борилган тадқиқот тромб ретракциясини қиёсий баҳолаш усули билан тўғри усулни солиштирилган. Тромбларнинг физик ва механик хусусиятлари текширилган. Олиб борилган тадқиқотлар “Академик В.Вохидов номидаги РИХИАТМ” ДК экспериментал бўлим базасида ЎЗР ФА ФТИ билан ҳамкорликда олиб борилган.

Калит сўзлар: тромб ретракцияси, Котовшикова-Кузник усули, тромб зичлиги, ретракцияни қиёсий баҳолаш усули, биоқоплама.

The use of new forms of biosealants based on thrombus is perspective direction in medicine. Thrombus may be studied from the view point of natural policomposite biomaterial without any negative influence on the organism. Especially retractive thrombi faced these requirements. In connection with this fact methods of evaluation and investigation of thrombus retraction, the study of their physic-mechanical properties have been had large significance. Current research was performed with aim to compare exist indirect methods of thrombus retraction evaluation with perspective direct methods that allow assess physic-mechanical properties of thrombi. The work was performed in cooperation with researchers of Physic-technical institute at Academy of Science RUz.

Key words: thrombus retraction, method of Kotovshikova-Kuznick, thrombus, indirect methods of retraction evaluation, biosealants.

Введение. Лабораторные методы, позволяющие исследовать функции гемостаза, занимают особое место в клинической практике. Подобные методики позволяют выявить различные патологии системы гемостаза и предотвратить большинство геморрагических осложнений. В современной практике нашли применение использование биокомпонентов механизма свертывания крови, позволяющих добиться стойкого гемостаза и которые могут быть использованы в качестве биопокрытий. К таковым биокомпонентам можно отнести тромбин, фибриноген, на основе которого разработан и используется фибриногеновый клей, а также коллаген [10].

Изменение ретракции может служить одним из важных показателей функциональной активности всей свертывающей системы. Нарушения ретракции тромбов различной этиологии могут привести к самым опасным патологическим состояниям и осложнениям [3]. Недостаточность ретракции, медленная скорость ретракции тромба, недостаточная его плотность и рыхлая структура может приводить к вторичным кровотечениям, что особенно опасно в послеоперационный период, тогда же как плотные, твердые сгустки, могут приводить к эмболии и закупорке крупных, магистральных сосудов [1,2]. В этой связи немалое значение имеет определение и физических пара-

метров тромбов – их плотность, жесткость, упругость и др. На сегодняшний момент разработано немало методов, позволяющих проводить оценку ретракции тромбов и изучать механизм их формирования. В 1975 г. был предложен адекватный метод исследования ретрактивной активности тромбоцитов на основании прямого измерения силы сокращения тромбоцитарного сгустка из плазмы. Разрабатываемые на сегодняшний день методы исследования ретракции тромбов, как правило, позволяют судить о физических параметрах тромбов лишь косвенно. К таковым относятся оптические методы регистрации ретракции (фотодинамический метод), ультразвуковой метод исследования тромбов, методы определения электропроводности тромбов и др. [1, 11].

Наиболее распространенными, из применяемых в клинике, методов исследования ретракции, на сегодняшний день, являются метод тромбозластографии и метод определения спонтанного фибринолиза и ретракции цельной крови по М.А. Котовщиковой и Б.И. Кузнику [5].

Метод тромбозластографии позволяет определять вязко-эластичные свойства тромба, преобразуя их в электрический сигнал. Методика была впервые предложена еще в 1948 году (Н. Harlet). На сегодняшний день благодаря разработанным новым аппаратам тромбозластографии метод широко применяется в клинике для оценки и мониторинга различных гемостатических нарушений и при проведении антикоагуляционной терапии. Данный метод довольно унифицирован, отличается воспроизводимостью. Кроме того, преимуществом тромбозластографии является возможность исследования гемостатического механизма в динамике от момента формирования тромба до его лизиса. Метод тромбозластографии на сегодняшний день остается основным методом, позволяющим в какой-то мере оценивать физико-механические параметры сгустка [12].

Еще одним методом, достаточно известным и широко применяемым в клинике, является метод определения спонтанного фибринолиза и ретракции цельной крови по М.А. Котовщиковой и Б.И. Кузнику. Данный метод не дает представления о физико-механических свойствах тромба, однако он позволяет определить степень наступившей ретракции по количеству выделенной из тромба жидкости. Представленная методика была предложена авторами еще в 1962 году, которые опирались на исследования более ранних авторов 20 годов прошлого столетия [6, 7, 8]. Данный метод основан на измерении соотношения выделенной из тромба сыворотки к первоначальному объему крови. Известно, что при ретракции, сокращаясь нити фибрина притягивают форменные элементы, собирая их в плотный конгломерат, состоящий из клеток крови, опутанных нитями

фибрина. Одновременно при этом происходит выделение из тромба жидкой части крови. Зная изначальное количество взятой крови и от нее количество выделенной жидкой части, можно определить объем образовавшегося тромба. Для определения ретракции берется цельная, свежая нативная кровь в количестве 3 мл. После инкубации в течении 3 часов при температуре 37С°, образовавшаяся жидкая часть сливается и замеряется ее объем. Степень ретракции рассчитывается исходя из первоначального объема (3 мл), который берется за 100% и объема выделенной жидкости, которая вычитывается от первоначального объема. В результате в процентном соотношении можно определить объем образовавшегося сгустка. [5]. Однако данный метод имеет ряд существенных недостатков. В первую очередь недостаток метода заключается в том, что он позволяет судить о наступившей ретракции лишь косвенно, параметры же и свойства самого тромба в данном случае не учитываются, невозможно судить о плотности тромба, его жесткости или эластичности. Кроме того, исследование ретракции в динамике, на всех ее стадиях от начала сокращения фибрина до наступления лизиса при помощи данного метода весьма затруднительно. Есть ограничения в применении метода и при исследовании крови с резко сниженной гемостатической активностью, плохой сворачиваемостью, а любое механическое, случайное повреждение тромба в ходе проведения исследования, приводит к значительному искажению результатов. Таким образом, метод Котовщиковой-Кузника, является косвенным методом, не отражающим всю картину механизма ретракции, и не может в полном объеме применяться для исследования ретракции тромбов.

Цель работы. В нашей работе мы задались целью опытным путем сравнить косвенные методы исследования ретракции тромбов с методами, которые позволяют оценить физико-механические свойства тромбов. Для этого оценивалась плотность тромба в динамике. Для сравнения использовался видоизмененный метод по М.А. Котовщиковой и Б.И. Кузнику, приспособленный для проведения динамической оценки ретракции.

Материалы и методы. Исследования проводились совместно с сотрудниками ФТИ АН РУз. Для исследования бралась свежая нативная кровь пациентов путем пункции локтевой вены. В ходе исследования бралась кровь, как здоровых людей, так и пациентов, которым проводилась терапия нестероидными противовоспалительными средствами на фоне ишемической болезни сердца. Всего были взяты образцы крови у 13 пациентов, 7 из которых не принимали НПВС и 6 пациентов, принимающих НПВС. Пациенты от-

бирались производно, среди отобранных пациентов количество мужчин и женщин примерно одинаковое – 6 женщин и 7 мужчин, возраст составлял от 79 до 27 лет (средний возраст 51,4 года).

Взятые образцы крови разливались в пробирки, в количестве по 1 мл в каждой, отмечался уровень крови в пробирке. После чего образцы ставились инкубироваться в термостат при температуре 37°C. Исследования проводили через 30, 60, 90 и 120 минут после начала инкубации.

Одна серия образцов подвергалась исследованию по модифицированному методу Котовщицкой-Кузника. Для этого из пробирки аккуратно сливалась выделенная из тромба жидкость, измерялось ее количество, тромб из пробирки вынимался.

После этого в пробирку заливался физ. раствор до метки уровня крови, отмечалось количество залитого физиологического раствора. Полученные результаты вычислялись, для этого количество выделенной жидкости делилось на количество физ. раствора, налитого до метки.

Одновременно с этим, тромб вынимался, взвешивался на торсионных весах и помещался на гладкую, ровную поверхность. Затем он продавливался при помощи равноплечего коромысла под воздействием груза (площадь контакта коромысла с тромбом ок. 1 см²). На одно плечо коромысла, которое накладывалось на тромб, устанавливался груз. Масса груза увеличивалась до тех пор, пока коромысло не продавливало тромб.

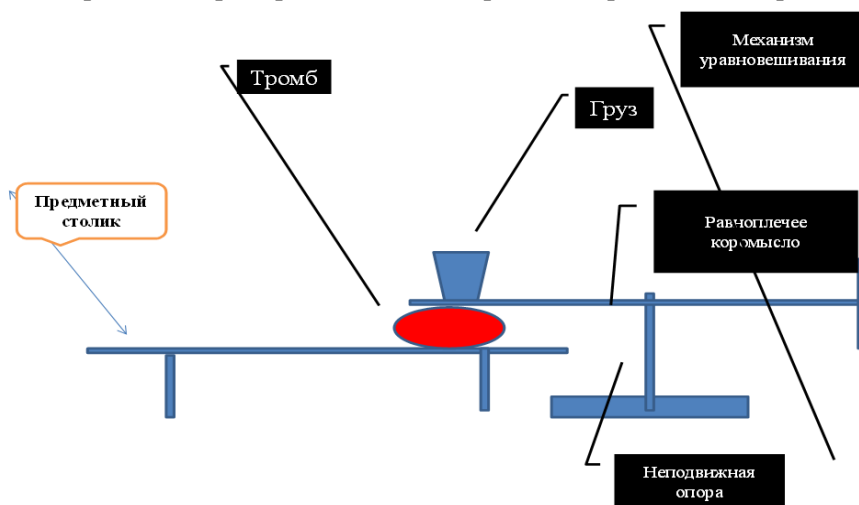


Рис. 1. Схематичное изображение устройства.

Дополнительно высчитывалась площадь контакта коромысла с тромбом, для этого измерялся диаметр тромба. Диаметр тромба умножался на ширину пластинки коромысла (0,4 см), в результате получали площадь контакта тромба с пластиной. Средняя площадь контакта тромба с пластинкой составила 0,5см² (±10%). Зная массу груза и площадь контакта, рассчитывалась плотность тромба в паскалях. Для этого сначала рассчитывалась сила в ньютонах на квадратный сантиметр.
$$\text{Н/см}^2 = \text{М(кг)} * 9,8 / \text{см}^2 = ((\text{М}_{\text{тр}}) / 1000) * 9,8 / 0,5$$
 После этого переводили Н/см² в Па, из расчета 1Н/см² = 10000 Па

Обсуждение результатов. Результаты исследования позволяют утверждать, что определение плотности сгустков более наглядно отражает ретракционные изменения тромбов, нежели косвенный метод, предложенный Котовщицкой с соавторами. По средним показателям происходит изменение объема выделившейся жидкости: 30 мин - 0,3±0,05 мл, 60 мин - 0,35±0,05 мл, 90 мин - 0,48±0,07 мл, 120 мин - 0,47±0,05 мл (p>0.05). Из представленных данных видна тенденция к увеличению объема жидкости с нарастанием временных интервалов, но без достоверно значимой разницы. Следовательно, объем образовавшегося тромба не изменяется с течением времени. Таким

образом, можно заключить данная методика не отражает истинную динамику РСК.

Отмечалась явная тенденция к изменению плотности тромба с течением времени. По средним показателям: 30 мин - 896±58,3 Па, 60 мин - 1483,7±72,5 Па, 90 мин - 1960±160 Па, 120 мин - 2548±148,2 Па. При использовании предложенного метода для оценки РСК наблюдается достоверная разница показателей плотности между всеми временными промежутками (p<0,05). Таким образом, данные свидетельствуют о динамичном изменении плотности тромба во времени с ростом показателей, что соответствует картине тромбообразования.

Кроме того, метод определения ретракции по Котовщицкой и Кузнику недостаточно отображает состояние ретракции у больных с патологией гемостатической системы, либо у пациентов, принимающих препараты НПВС. Тогда как определение плотности сгустков наглядно демонстрирует как происходит изменение физических свойств тромбов как у здоровых людей, так и у больных с нарушением свертывающей системы. Отмечается явная тенденция к повышению плотности тромба с течением времени: 30 мин - 1502±65 Па, 60 мин - 1829,3±97 Па, 90 мин - 2254±158 Па, 120 мин - 2972,6±106,3 Па (p<0.05).

С изменением объема выделенной жидкости таковой явно выраженной зависимости не наблюдается: 30- мин - $0,425 \pm 0,08$ мл, 60 мин - $0,54 \pm 0,04$ мл, 90 мин - $0,58 \pm 0,06$ мл, 120 мин - $0,51 \pm 0,06$ мл ($p > 0,05$).

Вывод. Среди методов исследования механизма гемостаза представлено не так много методик позволяющих рассмотреть систему гемостаза на стадии ретракции сгустка и фибринолиза, в то время как исследование процесса ретракции тромба имеет большое значение для лабораторной диагностики нарушений гемостаза.

Применяемые в настоящее время способы определения ретракции оценивают ее косвенные проявления: количество выделенной сыворотки, изменение объема сгустка, вязкость или электропроводность свертывающейся плазмы (крови) и другие. Однако они не отражают в полной мере механизм ретракции и не определяют физические свойства самого тромба, такие как плотность, твердость, упругость, и др. В этой связи более информативными и перспективными кажутся методы, позволяющие оценивать изменения физико-механических свойств самих сгустков. В отличие от косвенных методов, методы изучающие физические параметры тромбов могут быть более точными, поскольку на них не будут влиять посторонние факторы. Подобные методы несомненно найдут широкое применение в клинике и позволят лучше изучить механизм контракции тромбов, создать новые аппараты для диагностики ретракции тромбов, а так же позволят более пристально рассмотреть применение тромбов в хирургии с точки зрения биокompatных материалов.

Литература:

1. Алиханов Д.М. Гемостазиограмма в оценке нарушений системы гемостаза у хирургических больных // Вестн. хир. им. Грекова. 1985. - №10. - С.58-64.
2. Балуда В.П., Деянов И.И. Тромботические заболевания, их классификация и лабораторная диагностика. // Гематол. трансфузиол. 1989. - №2. - С.3-8.
3. Баркаган З.С. Очерки антиромботической фармакопрофилактики и терапии. М. 2000. - 142 с.
4. Джумаева Н.Э., Садыков Р.А. Механизм ретракции тромба и его оценка в клинической практике. Биологи ва тиббиёт муаммолари. Самарканд. №2, 2018 г.
5. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике. Том 2. Стр.223.
6. Левит С. и Шульман Э., К вопросу ретракции кровяного сгустка, Клин, мед., 1926, № 4;
7. Рожанский Н., К методике определения сократимости кровяного сгустка, Изд. Донского Гос. ун-та, кн. 1, 1921;

8. Рожанский Н.К. Влияние реакции и минеральных солей на сократимость кровяного сгустка, Рус. физиология. журнал, т. VIII, вып. 1-2, 1925

9. Тарковская Л. Р. Изучение ретрактильной активности тромбоцитов у здоровых людей и у больных с нарушением гемостаза. Дисс. Санкт-Петербург. 2001 г.//автореф.стр.2-8

10. Хоробрых Т. В. Фибриновый клей в неотложной абдоминальной хирургии. Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. ГОУ ВПО Московская медицинская академия имени И. М. Сеченова. Москва 2005 г. Стр. 18, 56

11. Bayerle H., Marx R., Hell H. Eine Methode zur Messung der Retraktion geronnen Blutes. // Klin. Wschr. 1949. - Bd.27. - N2. - S.237-239.

12. Weisel John W. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians// Biophys Chem. 2004

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ТРОМБА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПОКРЫТИЙ

А.В. ВОРОНИН¹, Н.Э. ДЖУМАЕВА¹, О.В. КИМ¹, М.М. ЮСУПОВ¹, Р.А. САДЫКОВ², Р.Р. КАБУЛОВ³

1 - ГУ «Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр хирургии имени академика В. Вахидова», Республика Узбекистан, г. Ташкент;

2 - Ташкентская медицинская академия, Республика Узбекистан, г. Ташкент;

3 - Физико-технический институт Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент

Тромб можно рассматривать с точки зрения естественного, поликомпозиционного биоматериала, не обладающего какими-либо отрицательным воздействием на организм. Особенно этим требованием отвечают ретракционные тромбы. В связи с этим все большее значение приобретают методы оценки и исследования ретракции тромбов, изучение их физико-механических свойств. Данное исследование было проведено с целью сравнить существующие косвенные методы оценки ретракции тромбов с перспективными прямыми методами, позволяющими судить о физико-механических свойствах тромбов. Работа была проведена на базе экспериментального отдела ГУ РСНПМЦХ им. акад. В. Вахидова совместно с сотрудниками Физико-технического института АН РУз.

Ключевые слова: ретракция тромба, метод Котовщицовой-Кузника, плотность тромба, непрямые методы оценки ретракции, биопокрытия.