

УДК 612.115

## ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРОМБОЭЛАСТОГРАММЫ ПРИ ВВЕДЕНИИ ГЕПАРИНА

© 2008 г.

*А.Е. Хомутов, Р.В. Гинойн, О.В. Лушникова*

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

vestnik@unn.ru

*Поступила в редакцию 03.07.2008*

При исследовании влияния возрастающих доз гепарина (0.5–5000 МЕ/кг) на показатели тромбоэластограммы крови крыс было показано, что максимальным гипокоагулирующим действием обладают низкие (0.5 МЕ/кг) и высокие (5000 МЕ/кг) дозы гепарина. Предполагается, что высокие дозы вступают в непосредственную связь с прокоагулянтами, а низкие влияют на хеморецепторы, стимулируя выброс эндогенного гепарина.

*Ключевые слова:* гепарин, тромбоэластография, прокоагулянты, хеморецепторы.

### Введение

Противосвертывающая система (ПСС) обеспечивает антикоагуляционный эффект в результате выделения в кровь своих гуморальных агентов, в том числе и гепарина. Он выбрасывается из депо при активации первой противосвертывающей системы (ППС), происходящей при наличии в крови пороговых доз тромбина. Это является защитной реакцией организма и одним из механизмов жидкого состояния крови и ее свертывания.

Учитывая высокую способность гепарина вступать в комплексы с различными соединениями, в том числе и с белками, Б.А. Кудряшов [1] высказал предположение, что изменение свертывающих свойств крови при активации ПСС обусловлено не только рефлекторным выделением в кровотоки гепарина, но и последующим образованием комплексов его со специфическими белками свертывающей системы крови: фибриногеном, тромбином, антиплазмином и др. Дальнейшие исследования полностью подтвердили правильность этого предположения.

Из полученных комплексов наибольший интерес представляют комплексы гепарина с тромбином и особенно с фибриногеном. Метод выделения комплекса фибриноген – гепарин (КФГ) из плазмы крови животных, разработанный Л.А. Ляпиной [2], позволил получить КФГ и изучить его свойства. Оказалось, что КФГ и другие комплексы хорошо растворяют сгустки фибрина. Но КФГ теряет свою активность в присутствии серотонина, ионов кальция, протамин сульфата. Возможно, что относительная

неустойчивость КФГ в организме обусловлена действием серотонина и других специфических агентов.

Установлено, что фракция КФГ, выделенная из крови, взятой через 5 – 10 минут после инъекции тромбина, обладает максимальной анти-тромбиновой активностью. Однако к тридцатой минуте она значительно снижается, а через 60 – 90 мин полностью теряется. Таким образом, можно считать, что КФГ и КТГ (комплекс тромбин – гепарин) представляют собой гуморальные агенты ПСС, которые блокируют активность тромбина и вызывают лизис кровяных сгустков в кровяном русле (если они успели возникнуть).

Хорошо известно, что выделение катехоламинов (адреналина, норадреналина) в кровотоки является обычной физиологической реакцией, возникающей при эмоциональном напряжении или в условиях стресса. Но избыток адреналина является для организма опасным агентом, вызывающим повышенный тромбиногенез, могущий привести к свертыванию крови в кровеносных сосудах. Эксперименты, проведенные Б.А. Кудряшовым и Л.А. Ляпиной [3] на животных, показали, что после инъекции тромбина или адреналина в крови животных обнаруживается комплекс адреналин – гепарин. Этот же комплекс возникает при стрессовых реакциях (возбуждение, вызванное иммобилизацией животных, и др.). Подобные комплексы были обнаружены в крови студентов, сдавших первый экзамен сессии (следствие эмоционального напряжения).

Таким образом, при возбуждении ПСС в здоровом организме фибриноген временно вы-

ключается из сферы свертывающей системы крови вследствие, главным образом, его вступления в КФГ. По истечении некоторого времени (30–60 мин) этот комплекс постепенно распадается и фибриноген возвращается в эту среду. Восстанавливается нормальная свертываемость крови. Комплекс тромбин – гепарин удаляется из крови еще быстрее (5–10 мин), накапливается, а затем и разрушается в печени [3].

### Материал и методы

В работе был использован гепарин, содержащий 5000 МЕ в 1 мл раствора. В качестве подопытных животных использовались лабораторные крысы массой 180–200 г. Всего для проведения опытов и контрольных экспериментов было использовано 84 животных. Исследуемые вещества, предварительно разведенные в изотоническом физиологическом растворе, вводились животным в возрастающих количествах.

Исследование влияния гепарина на систему свертывания крови проводилось на анализаторе гемокоагуляции механическом АГКМ 1-01, тромбоэластографическим способом. Анализатор основан на эластометрическом принципе, в основе которого лежит регистрация изменений упругости сгустка крови, залитой в кювету прибора. Кювета совершает возвратно-поворотные движения, а опущенный в нее цилиндр, подвешенный на тонкой стальной нити, вовлекается в движение по мере образования нитей фибрина. Движения цилиндра передаются на регистрирующее устройство. Процесс свертывания крови регистрируется в аналоговой форме на ленте самописца в виде тромбоэластограммы (ТЭГ), в цифровой форме измеряются время реакции и площадь ТЭГ в течение 15 мин после окончания времени реакции. Исследование проводилось на цитратной крови в микрообъеме ( $0.10 \pm \pm 0.0025$  мл). Использовались растворы гепарина в возрастающих концентрациях, которые вводились интактным крысам внутрибрюшинно в объеме 1 мл. Кровь, взятая из хвостовой вены животных, исследовалась в динамике: через 1 мин, 1, 6 и 24 часа после введения раствора гепарина.

Расшифровка тромбоэластограмм производилась по общепринятым параметрам:

$r$  – время реакции; отражает скорость образования тромбопластина и соответствует первой невидимой фазе свертывания крови; выражается в минутах.

$K$  – время начала образования сгустка; выражается в минутах. Изменение этого параметра зависит от концентрации тромбина и фибрино-

гена. В этот отрезок времени образовавшийся тромбин переводит фибриноген в фибрин, поэтому параметр  $K$  еще называют тромбоэластографической константой тромбина.

$Am$  – максимальная амплитуда, выражается в миллиметрах. Она отражает упругость (эластичность), т.е. физические качества сгустка, соответствует III фазе свертывания крови.

$E$  – эластичность кровяного сгустка; выражается в относительных единицах и определяется по формуле:

$$E = 100 \times Am / 100 - Am .$$

$Q$  – модуль упругости сгустка крови. Рассчитывается по формуле:

$$Q = Am/100 - Am \times 601.35 \text{ Н/м}^2.$$

Параметр, как и  $Am$ , отражает качество сгустка и зависит от количества тромбоцитов.

$t$  – константа специфического свертывания крови, выражается в минутах. Чем меньше  $t$ , тем быстрее происходит образование сгустка, увеличение  $t$  свидетельствует о наклонности к гипокоагуляции. Этот отрезок тромбоэластограммы называют «зоной тромбоцитарного свертывания».

$S$  – константа синерезиса. Она отражает всю фазу коагуляции фибриногена, т.е. время от начала формирования фибрина до его завершения. Интенсивность синерезиса пропорциональна массе фибриногена, имеющегося в свертывающей среде.

$T$  – общее время свертывания крови; выражается в минутах. Уменьшение значения параметра указывает на гиперсвертываемость, увеличение – на гипосвертываемость.

$L_{\alpha}$  – угловая константа. Она зависит от величины параметров  $r$ ,  $K$ ,  $t$ ,  $S$ ,  $Am$ , так как эти показатели определяют конфигурацию тромбоэластограммы. Показатель отражает динамику образования фибрина – чем быстрее происходит свертывание крови, тем больше угол, и наоборот.

$S_{15}$  – площадь тромбоэластограммы. Она характеризует образование, формирование и механические свойства сгустка. Параметр включает в себя информацию, которую несут параметры  $K$  и  $Am$ . Значение параметра выражается в относительных единицах.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке методом парных сравнений по критерию Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Как известно, гепарин оказывает антикоагулянтное действие на свертывающую систему крови. Большая информационность метода ТЭГ

позволила получить данные, характеризующие как процесс свертывания крови в целом, так и отдельные его фазы, скорость образования факторов свертывания и их относительное количество, состояние кровяного сгустка. Об изменениях в системе гемокоагуляции судили по сравнению показателей ТЭГ опытной и контрольной серий. Контрольной группе животных вводился 1 мл физиологического раствора, опытной – тот же объем гепарина в возрастающих дозах.

Введение гепарина в дозе 0.5 МЕ/кг вызывало ярко выраженный антикоагулянтный эффект: почти вдвое по сравнению с контролем увеличивалось скрытое время свертывания, резко уменьшалась максимальная амплитуда ТЭГ, уменьшалась эластичность сгустка, уменьшалась константа специфического свертывания крови в 4 раза по сравнению с контролем, увеличивалось время начала образования сгустка, уменьшался модуль упругости сгустка, константа синерезиса незначительно падала, общее

время свертывания увеличивалось вдвое, угловая константа резко падала, площадь ТЭГ уменьшалась (табл. 1).

Увеличение дозы гепарина в 10 раз (5 МЕ/кг) приводит к менее значительным изменениям показателей ТЭГ: незначительно увеличивается скрытое время свертывания крови, почти без изменений остается максимальная амплитуда ТЭГ, возрастает эластичность сгустка, без изменений остается константа специфического свертывания крови, уменьшается время начала образования сгустка, модуль упругости сгустка меняется, константа синерезиса несколько увеличивается, общее время свертывания крови возрастает, угловая константа увеличивается, площадь ТЭГ возрастает. Следует отметить, что большинство показателей ТЭГ в этой серии экспериментов не имели достоверных различий с контрольной группой.

Введение гепарина в дозе 50 МЕ/кг приводит к следующим изменениям показателей ТЭГ:

Таблица 1

Изменение показателей ТЭГ при введении гепарина в дозе 0.5 МЕ/кг

Показатели ТЭГ	Стат. показ.	Значение показателей ТЭГ				
		до введения	после введения (час)			
			0.02	1.0	6.0	24
<i>r</i> (мин)	<i>M</i>	2.3	5.1*	5.0*	18.1*	6.5*
	<i>m</i>	0.9	0.7	0.6	6.3	1.3
	<i>t</i>	–	2.5	2.5	3.8	2.7
<i>Am</i> (мм)	<i>M</i>	17.0	12.3*	13.0*	11.1*	11.6*
	<i>m</i>	1.3	1.5	0.7	1.0	1.8
	<i>t</i>	–	2.4	2.7	3.7	2.5
<i>E</i> (о.е.)	<i>M</i>	20.0	14.1*	15.0*	11.5*	13.3*
	<i>m</i>	1.3	1.2	1.0	1.6	2.4
	<i>t</i>	–	3.3	3.1	4.0	2.5
<i>t</i> (мин)	<i>M</i>	11.0	6.5*	7.7*	4.6*	5.0
	<i>m</i>	1.1	1.1	0.9	1.6	3.0
	<i>t</i>	–	2.8	2.3	3.3	1.5
<i>K</i> (мин)	<i>M</i>	1.3	2.1	4.5*	5.5*	0.7
	<i>m</i>	0.4	0.6	1.0	1.6	4.5
	<i>t</i>	–	1.1	2.9	2.6	0.1
<i>Q</i> (о.е.)	<i>M</i>	0.1	0.08*	0.1	0.08*	0.08
	<i>m</i>	0.02	0.007	0.02	0.009	1.3
	<i>t</i>	–	2.5	1.0	2.5	0.04
<i>S</i> (о.е.)	<i>M</i>	12.2	8.6*	12.9	10.1	5.7*
	<i>m</i>	0.9	1.9	0.8	1.8	3.5
	<i>t</i>	–	2.7	0.2	1.0	5.0
<i>T</i> (мин)	<i>M</i>	14.5	13.7	17.4*	28.2*	12.2
	<i>m</i>	0.8	2.0	1.2	6.3	2.7
	<i>t</i>	–	0.4	2.0	2.1	0.8
<i>L<sub>α</sub></i> (град)	<i>M</i>	8.0	5.0*	6.0	2.0	3.0*
	<i>m</i>	1.2	0.9	1.1	9.1	1.3
	<i>t</i>	–	2.3	1.4	0.6	2.8
<i>S<sub>15</sub></i> (о.е.)	<i>M</i>	88.0	65.0*	68.0*	60.0*	58.0*
	<i>m</i>	6.0	0.9	3.2	5.2	7.0
	<i>t</i>	–	3.8	3.0	3.5	3.3

\* –  $p < 0.05$ .

незначительно увеличивается скрытое время свертывания крови и уменьшается максимальная амплитуда ТЭГ, падает эластичность и модуль упругости сгустка, увеличивается константа и время начала образования сгустка, увеличивается константа синерезиса, незначительно растет общее время свертывания крови, увеличивается угловая константа и уменьшается площадь ТЭГ; однако различия показателей относительно контрольной группы недостоверны.

Введение следующей дозы (500 МЕ/кг) гепарина вызывает аналогичные изменения показателей ТЭГ: незначительно увеличивается скрытое время свертывания, максимальная амплитуда ТЭГ незначительно увеличивается, растут эластичность и модуль упругости сгустка, константа специфического свертывания крови растет, время начала образования сгустка уменьшается, константа синерезиса увеличивается, общее время свертывания крови повышается, растут угловая константа и площадь ТЭГ. Так

же как и в предыдущих сериях различия относительно контрольной группы недостоверны.

Введение максимальной дозы гепарина (5000 МЕ/кг) дает наиболее выраженные изменения показателей ТЭГ. Следует отметить, что спустя 1 час после введения гепарина в указанной дозе ТЭГ записать не удалось, так как гемокоагуляции не наблюдалось в течение 1–2 часов с момента начала записи ТЭГ. Наблюдалось увеличение в несколько раз скрытого времени свертывания крови, уменьшение максимальной амплитуды ТЭГ, падали эластичность и модуль упругости сгустка, вдвое уменьшалась константа специфического свертывания крови, во много раз увеличивалось время начала образования сгустка, росла константа синерезиса, значительно возрастало общее время свертывания крови, падали значения угловой константы и площади ТЭГ. Необходимо отметить, что наибольшие изменения показателей ТЭГ наблюдались спустя 1–6 часов после введения раствора гепарина (табл. 2).

Таблица 2

Изменение показателей ТЭГ при введении гепарина в дозе 5000 МЕ/кг

Показатели ТЭГ	Стат. показ.	Значение показателей ТЭГ				
		до введения	после введения (час)			
			0.02	1.0	6.0	24
$r$ (мин)	$M$	2.3	1.6	•	11.6*	1.5*
	$m$	0.9	0.3	•	3.5	0.2
	$t$	–	0.1	•	5.3	2.1
$Am$ (мм)	$M$	17.0	18.1	•	13.6*	19.2
	$m$	1.3	0.6	•	1.7	1.0
	$t$	–	0.7	•	2.2	1.3
$E$ (о.е.)	$M$	20.0	23.3	•	15.9	23.1
	$m$	1.3	1.4	•	2.3	1.5
	$t$	–	1.7	•	1.6	1.5
$t$ (мин)	$M$	11.0	10.3	•	4.8*	10.2
	$m$	1.1	0.2	•	2.0	1.1
	$t$	–	0.5	•	2.6	0.6
$K$ (мин)	$M$	1.3	0.5*	•	9.2*	0.8
	$m$	0.4	0.1	•	2.9	0.1
	$t$	–	2.0	•	2.7	1.3
$Q$ (о.е.)	$M$	0.1	0.2	•	0.1	0.2
	$m$	0.02	0.01	•	0.01	0.04
	$t$	–	1.5	•	1.5	0.8
$S$ (о.е.)	$M$	12.2	10.8	•	14.0	11.2
	$m$	0.9	0.5	•	1.1	1.2
	$t$	–	1.4	•	1.3	0.8
$T$ (мин)	$M$	14.5	12.0*	•	26.3*	12.0
	$m$	0.8	0.3	•	4.4	1.1
	$t$	–	2.8	•	2.6	1.8
$L_a$ (град)	$M$	8.0	15.7*	•	5.0*	11.3
	$m$	1.2	0.3	•	0.2	1.6
	$t$	–	6.4	•	2.8	1.5
$S_{15}$ (о.е.)	$M$	88.0	99.2	•	61.3*	100.4
	$m$	6.0	2.7	•	6.8	4.3
	$t$	–	1.7	•	2.2	1.6

• – кровь не сворачивается в течение часа.

### Заключение

Таким образом, в наших экспериментах антикоагулирующий эффект гепарина имел двухфазный характер. Максимальный антикоагулянтный эффект проявлялся при введении гепарина в дозе 0.5 и 5000 МЕ/кг. Естественно предположить, что большие дозы экзогенного гепарина прямо взаимодействуют с прокоагулянтами, вызывая гипокоагуляцию. Малые дозы (0.5 МЕ/кг), видимо, воздействуя на хеморецепторы, вызывают рефлекторное повышение уровня гепарина в крови. Таким образом у интактных животных при введении малых доз экзогенного гепарина, по всей видимости, увеличивается уровень свободного гепарина в крови. Именно с этим явлением связан антикоагулирующий эффект гепарина.

Об антикоагулирующем действии гепарина на отдельные фазы гемокоагуляции, на скорость их протекания и скорость образования факторов свертывания мы можем судить исходя из результатов расшифровки ТЭГ. Так, во всех сериях опытов введение гепарина удлиняло первую невидимую фазу свертывания крови, из чего можно сделать вывод об уменьшении скорости образования тромбопластина и тромбина. Уменьшение максимальной амплитуды ТЭГ свидетельствует о влиянии гепарина на III фазу свертывания крови, в частности на эластичность сгустка, которая при введении гепарина уменьшалась. Введение гепарина приводило к увеличению тромбоэластографической константы тромбина, что говорит о замедлении

процесса перевода тромбином фибриногена в фибрин. Это может быть связано с низкой концентрацией фибриногена или тромбина, образованного в ходе невидимой фазы свертывания, также угнетаемой гепарином. Уменьшение модуля упругости сгустка отражает изменения его качества, что может быть связано с изменением количества и качества фибриногена, а также количества и качества тромбоцитов. О действии гепарина непосредственно на тромбоциты говорит и увеличение зоны тромбоцитарного свертывания, что свидетельствует о понижении свертываемости крови.

Гипокоагуляционный эффект гепарина проявляется в повышении общего времени свертывания крови и уменьшении угловой константы. Вероятно, введение гепарина приводит к замедлению хода III фазы свертывания крови, к снижению скорости формирования сгустка и уменьшению его эластичности.

#### Список литературы

1. Кудряшов Б.А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М.: Медицина, 1975. 488 с.
2. Ляпина Л.А. Профилактическое действие комплексных соединений гепарин – мочевины и адреналин – гепарин – фибриноген при имитации у животных тромбообразования // Кардиология. 1978. Т. 18, № 8. С. 147–148.
3. Кудряшов Б.А., Ляпина Л.А. Физиологические свойства комплекса гепарин – тромбопластин // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. 1978. Т. 64, № 6. С. 771–776.

### DYNAMICS OF CHANGES OF THROMBOELASTOGRAM CHARACTERISTICS UNDER HEPARIN INJECTION

*A.E. Khomutov, R.V. Ginoyan, O.V. Lushnikova*

When studying the influence of heparin incremental doses (0.5–5000 IU/kg) on rat blood thromboelastogram characteristics, it has been shown that low (0.5 IU/kg) and high (5000 IU/kg) heparin doses have the maximum hypercoagulant action. It is suggested that high doses come into a direct contact with procoagulants while the low ones influence chemoreceptors stimulating endogenous heparin release.