

УДК 612.57

**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ ДОЗ ЭКЗОГЕННОГО ГЕПАРИНА
НА ПРОЦЕССЫ ГЕМОСТАЗА**

© 2010 г.

*М.Б. Звонкова¹, А.Е. Хомутов¹, А.Г. Бутылин¹,
К.А. Пурсанов², В.С. Слободянюк¹, З.В. Перепелюк¹*¹ Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского² Нижегородская государственная медицинская академия

kfg@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 08.04.2010

В экспериментах на половозрелых крысах-самцах оценивалось состояние процесса свертывания крови методом тромбозластографии. Показано, что высокие дозы гепарина (500 и 5000 МЕ/кг) разнонаправленно влияют на показатели ТЭГ в зависимости от времени после бонусной инъекции, а через 1 час после введения дозы гепарина 5000 МЕ/кг кровь в течение часа не свертывается.

Ключевые слова: гепарин, тромбозластография, дозо-зависимый эффект.

Введение

Гепарин, открытый почти 100 лет назад, является мощным эндогенным антикоагулянтом, синтезируемым в тучноклеточном аппарате организма. Экзогенный препарат гепарина в настоящее время применяется при большом количестве заболеваний и оперативных вмешательствах [1–3]. Установлено, что при гидролизе стандартного раствора гепарина в течение 3 часов обнаруживается $3.94 \cdot 10^{-5}$ М глюкозамина, при 12-часовой длительности гидролиза – $6.0 \cdot 10^{-5}$ М глюкозамина, то есть основной гидролиз идет практически в течение первых 3-х часов. Если учесть, что в среднем в 1 мл крови содержится 5–7 МЕ гепарина, то за 1 час сывороткой крови ингибируется 13–20% всего гепарина, находящегося в данном количестве крови.

Антикоагулянтный эффект гепарина зависит от дозы и места введения препарата. Однако, несмотря на почти столетний опыт использования гепарина, данные по эффективности антикоагулянтного действия протеогликана сильно отличаются в работах разных авторов. Так, данные, полученные рядом авторов, свидетельствуют об отсутствии выраженного противосвертывающего эффекта от разовой дозы гепарина 5000 МЕ, вводимой большим внутривенно, при нормальных исходных показателях системы свертывания крови. Гепарин в дозе 10000 МЕ, вводимый внутривенно, оказывает выраженный противосвертывающий эффект [4, 5].

Другие исследователи считают, что под влиянием гепарина свертывание крови кроликов и начало ретракции значительно замедля-

ются (дозы 100–200 МЕ/кг) или вообще не наступают (доза 400 МЕ/кг) во все сроки наблюдения. Замедление начала ретракции сопровождается уменьшением выделения ретрактивной сыворотки. При уменьшении действия гепарина отмечается некоторое увеличение количества ретрактивной сыворотки. Параллельное изучение фибринолитической активности под влиянием гепарина в дозе 200–400 МЕ/кг показало ее заметное увеличение и уменьшение фибриногена. Кроме того, было установлено, что малые дозы активируют фибринолиз, а большие – тормозят фибринолитические свойства крови [6–8].

Материалы и методы

В работе был использован гепарин фирмы «Спофа» (Чехия), содержащий 5000 МЕ в 1 мл раствора. В качестве подопытных животных использовались лабораторные крысы массой 200 ± 10 г. Всего для проведения опытов и контрольных экспериментов было использовано 84 животных. Исследование влияния гепарина на систему свертывания крови проводили на анализаторе гемокоагуляции механическом АГКМ 1-01, тромбозластографическим способом. Процесс свертывания крови регистрировали в аналоговой форме на ленте самописца в виде тромбозластограммы (ТЭГ), в цифровой форме измеряли время реакции и площадь ТЭГ в течение 15 мин после окончания реакции. Исследование проводили на цитратной крови в микрообъеме (0.10 ± 0.0025 мл). Использовали растворы ге-

Таблица 1

Изменение показателей ТЭГ при введении гепарина в дозе 500 МЕ/кг

Показатели ТЭГ	Значение показателей ТЭГ			
	до введения	после введения, час		
		0.02	6.0	24
Время реакции, мин	2.3±0.9	1.6±0.2	1.4±0.4*	1.8±0.3
Максимальная амплитуда, мм	17.0±1.3	18.2±1.2	19.1±0.4	19.3±0.7
Эластичность сгустка, о.е.	20.0±1.3	25.1±1.2*	24.2±0.6	24.1±0.9*
Константа свёртывания, мин	11.0±1.1	11.2±0.9	14.0±1.5	10.3±0.3
Начало образования сгустка, мин	1.3±0.4	0.4±0.1	0.9±0.2	0.7±0.05
Модуль упругости сгустка, о.е.	0.1±0.02	0.2±0.01*	0.2±0.01*	0.2±0.01
Константа синерезиса, о.е.	12.2±0.9	11.3±1.0	15.0±1.6*	10.7±0.4
Общее время свёртывания, мин	14.5±0.8	13.0±1.1	16.7±1.6	12.6±0.3*
Угловая константа, град.	8.0±1.2	12.2±1.8*	13.1±1.5*	13.7±1.6*
Площадь ТЭГ, о.е.	88.0±6.0	110.3±3.0*	105.2±2.6*	107.1±3.6*

* $p < 0.05$ по критерию Даннета для множественных сравнений.

парина в возрастающих концентрациях, которые вводили интактным крысам внутрибрюшинно в объеме 1 мл. Кровь, взятую из хвостовой вены животных, исследовали в динамике: через 1 мин, 1, 6 и 24 часа после введения раствора гепарина.

Расшифровка ТЭГ 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 фибриногена. В этот отрезок времени образовавшийся тромбин переводит фибриноген в фибрин, поэтому параметр K еще называют тромбоэластографической константой тромбина;

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

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

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

Q – модуль упругости сгустка крови. Рассчитывается по формуле:

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

параметр, как и Am , отражает качество сгустка и зависит от количества тромбоцитов;

t – константа специфического свертывания крови, выражается в минутах. Чем короче t , тем быстрее происходит образование сгустка, удлинение 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_{α} – 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.

Результаты и их обсуждение

Введение гепарина в дозе 500 МЕ/кг приводит к следующим изменениям показателей ТЭГ: незначительно увеличивается скрытое время свертывания крови и уменьшается максимальная амплитуда ТЭГ, падают эластичность и модуль упругости сгустка, увеличиваются константа и время начала образования сгустка, константа синерезиса, незначительно растет общее время свертывания крови, увеличивается

Таблица 2

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

Показатели ТЭГ	Значение показателей ТЭГ				
	до введения	после введения, час			
		0.02	1.0	6.0	24
Время реакции, мин	2.3±0.9	1.6±0.3	•	11.6±3.5*	1.5±0.2*
Максимальная амплитуда, мм	17.0±1.3	18.1±0.6	•	13.6±1.7*	19.2±1.0
Эластичность сгустка, о.е.	20.0±1.3	23.3±1.4	•	15.9±2.3	23.1±1.5
Константа свёртывания, мин	11.0±1.1	10.3±0.2	•	4.8±2.0*	10.2±1.1
Начало образования сгустка, мин	1.3±0.4	0.5±0.1*	•	9.2±2.9*	0.8±0.1
Модуль упругости сгустка, о.е.	0.1±0.02	0.2±0.01*	•	0.1±0.01	0.2±0.04
Константа синерезиса, о.е.	12.2±0.9	10.8±0.5	•	14.0±1.1	11.2±1.2
Общее время свёртывания, мин	14.5±0.8	12.0±0.3*	•	26.3±4.4*	12.0±1.1*
Угловая константа, град	8.0±1.2	15.7±0.3*	•	5.0±0.2*	11.3±1.6*
Площадь ТЭГ, о.е.	88.0±6.0	99.2±2.7	•	61.3±6.8*	100.4±4.3*

• Кровь не сворачивается в течение часа;

* $p < 0.05$ по критерию Даннета для множественных сравнений.

угловая константа и уменьшается площадь ТЭГ (табл. 1).

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).

Интересно отметить, что 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, угловая константа резко падала, площадь ТЭГ уменьшалась, общее время свертывания увеличивалось вдвое (рисунок).

Одним из доказательств этого эффекта является положение, что в наших экспериментах ан-

тикоагулирующий эффект гепарина имел двухфазный характер. Максимальный антикоагулянтный эффект проявлялся при введении гепарина в дозах 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. С этим явлением связан антикоагулирующий эффект гепарина и, возможно, антидотный эффект.

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-ю 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

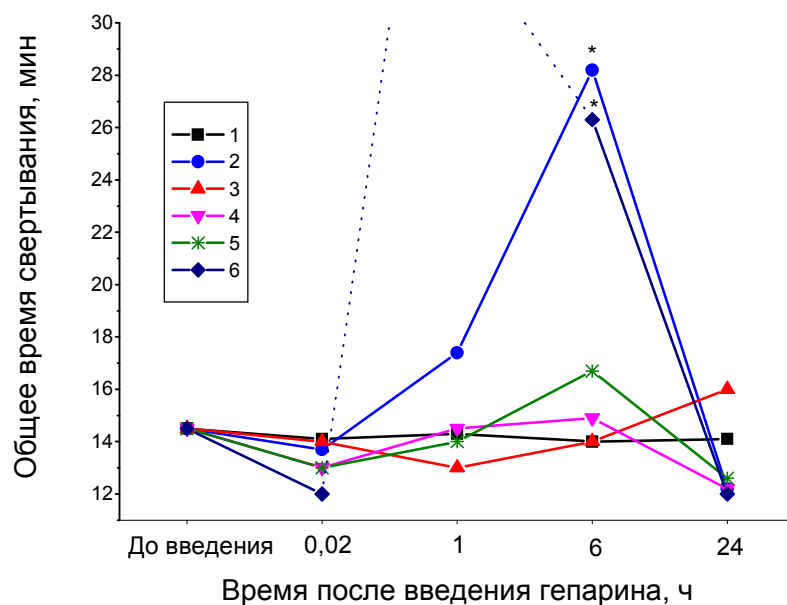


Рис. Изменение показателей общего времени свертывания крови в зависимости от дозы гепарина: 1 – контроль (физиологический раствор), 2 – 0,5, 3 – 5,0, 4 – 50, 5 – 500, 6 – 5000 МЕ/кг

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-ей фазы свертывания крови, к снижению скорости формирования сгустка и уменьшению его эластичности.

Список литературы

1. Кудряшов Б.А. Проблемы регуляции жидкого состояния крови и взаимоотношение свертывающей и противосвертывающей систем // Успехи физиологических наук. 1970. Т. 1. № 4. С. 17–20.
2. Ляпина Л.А. Роль гепарина в процессе свертывания крови и фибринолизе // Успехи современной биологии. 1977. Т. 84. № 3. С. 338–352.

3. Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Ульянова А.М., Тарасов Ю.А. Участие гепариновых комплексов в регуляции гемостатической и инсулярной систем организма // Тез. докл. XVIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Казань, 2001. С. 379.

4. Башков Г.В., Калишевская Т.М., Голубева М.Г., Соловьёва М.Е. Низкомолекулярные гепарины: механизм действия, фармакология и клиническое применение // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1993. Т. 56. № 4. С. 66–76.

5. Вaleyko Н.К. Влияние различных доз гепарина на систему свертывания крови // Тез. докл. III Всесоюз. конф. «Гепарин. Физиология, биохимия, фармакология и клиническое применение». М., 1973. С. 52–54.

6. Кочеткова Г.В. Ретракция кровяного сгустка при гипокоагуляции крови, вызванной гепарином // Там же. С. 163–164.

7. Buluk K., Januszko T. Heparina a fibrynoliza // Patol. Polska. 1957. V. 8. N 2. P. 107–114.

8. Kaulla K.N. The effect of heparin on components of the human fibrinolytic system // Blood. 1998. V. 13. N 8. P. 811–821.

**INFLUENCE OF HIGH DOSES OF EXOGENOUS HEPARIN
ON THE PROCESSES OF HEMOSTASIS**

*М.Б. Zvonkova, А.Е. Khomutov, А.Г. Butylin,
К.А. Pursanov, V.S. Slobodyanyuk, Z.V. Perepelyuk*

In the experiments with adult male rats, the state of the blood coagulation process was estimated by the thromboelastographic method. High doses of heparin (500 and 5000 IU/kg) have been shown to have differently directed influence on the TEG indices depending on the time after the bonus injection, and the blood does not coagulate in an hour after injecting a 5000 IU/kg dose of heparin.

Keywords: heparin, thromboelastography, dose-dependent effect.