

ИНТЕГРАЛЬНЫЕ И ЛОКАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ГЕМОСТАЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ОВЕЦ НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ИМПЛАНТАЦИИ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА

DOI: 10.17691/stm2022.14.5.03

УДК 616.1–005.6–089.843

Поступила 13.05.2022 г.



О.В. Груздева, д.м.н., доцент, профессор РАН, зав. лабораторией исследований гомеостаза;

Е.Е. Бычкова, лаборант-исследователь лаборатории исследований гомеостаза;

Т.Ю. Пенская, младший научный сотрудник лаборатории исследований гомеостаза;

А.А. Кузьмина, младший научный сотрудник лаборатории исследований гомеостаза;

Л.В. Антонова, д.м.н., зав. лабораторией клеточных технологий;

Л.С. Барбараш, д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Сосновый бульвар, 6, Кемерово, 650002

Цель исследования — оценить эффективность локальных и интегральных методов оценки гемостазиологического профиля овец на различных этапах имплантации биodeградируемого сосудистого протеза.

Материалы и методы. Объектом исследования явилась цельная кровь овец, которую забирали на этапе премедикации, в интраоперационный период и в ранний послеоперационный период. С помощью тромбозластографии оценивали кинетику образования сгустка и изменение его вязкоупругих свойств в образцах цельной крови. Тест генерации тромбина выполняли в богатой (БТП) и обедненной тромбоцитами плазме (ОТП) с оценкой количественных и временных параметров. Концентрацию фактора тромбоцитов 4 в БТП и ОТП измеряли с помощью иммуноферментного анализа. Функциональную активность тромбоцитов оценивали в БТП с индукторами и без дополнительной стимуляции. Активность протромбинового комплекса, значения АЧТВ, тромбинового времени, концентрацию фибриногена, активность антитромбина III и протеина С, растворимые фибрин-мономерные комплексы и фибринолиз определяли в плазме крови.

Результаты. Выявлены разнонаправленные изменения гемостазиологического профиля на различных этапах имплантации сосудистого протеза: с одной стороны, усиление протромбогенного статуса, с другой — развитие гипокоагуляции. В пользу гиперкоагуляции свидетельствовало укорочение интервалов *R* (времени свертывания крови) и *K* (времени формирования сгустка), увеличение показателя angle (угла) и максимальной амплитуды на тромбозластограмме во все исследуемые периоды относительно референсных значений, значительное увеличение фактора тромбоцитов 4 в БТП и усиление агрегации тромбоцитов. Однако количественные параметры теста генерации тромбина и ряд показателей коагулограммы указывали на гипокоагуляцию в интраоперационный и ранний послеоперационный периоды.

Заключение. Сравнительный анализ локальных тестов, характеризующих состояние гомеостаза, и показателей интегральных методов продемонстрировал преимущества последних в оценке тромботических рисков при имплантации сосудистых протезов. Локальные тесты не дают возможности оценить динамику процесса коагуляции в режиме реального времени и не всегда чувствительны к гиперкоагуляции. Использование интегральных методов позволит восполнить эти пробелы, своевременно диагностировать гиперкоагуляцию и в дальнейшем минимизировать риски, сопровождающие имплантацию сосудистых протезов.

Ключевые слова: гемостазиологический профиль; интегральные методы; локальные методы; имплантация биodeградируемого сосудистого протеза; прогнозирование тромботических рисков.

Для контактов: Бычкова Евгения Евгеньевна, e-mail: eugenia.tarasowa@yandex.ru

Как цитировать: Gruzdeva O.V., Bychkova E.E., Penskaya T.Yu., Kuzmina A.A., Antonova L.V., Barbarash L.S. Integral and local methods for the evaluation of the hemostasiological profile in sheep at various stages of implantation of a biodegradable vascular graft. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2022; 14(5): 26, <https://doi.org/10.17691/stm2022.14.5.03>

English

Integral and Local Methods for the Evaluation of the Hemostasiological Profile in Sheep at Various Stages of Implantation of a Biodegradable Vascular Graft

O.V. Gruzdeva, MD, DSc, Associate Professor, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Homeostasis Research;

E.E. Bychkova, Research Assistant, Laboratory of Homeostasis Research;

T.Yu. Penskaya, Junior Researcher, Laboratory of Homeostasis Research;

A.A. Kuzmina, Junior Researcher, Laboratory of Homeostasis Research;

L.V. Antonova, MD, DSc, Head of the Laboratory of Cell Technologies;

L.S. Barbarash, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher

Reserch Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6 Sosnovy Blvd, Kemerovo, 650002, Russia

The aim of this study was to evaluate the efficiency of local and integral methods of the assessment of the hemostasiological profile in sheep at various stages of implantation of a biodegradable vascular graft.

Materials and Methods. The object of the study was the whole blood of sheep collected at the stage of premedication, during the intraoperative period, and in the early postoperative period. Thromboelastography was used to assess the kinetics of clot formation and changes in its viscoelastic properties in whole blood samples. The thrombin generation test was performed in platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP) with the assessment of quantitative and temporal parameters. The platelet factor 4 concentration in PRP and PPP was measured by the enzyme immunoassay. The functional activity of platelets in PPP was assessed with inductors and without additional stimulation. Prothrombin complex activity, APTT values, thrombin time, fibrinogen concentration, antithrombin III and protein C activity, soluble fibrin monomer complexes, and fibrinolysis were determined in blood plasma.

Results. Multidirectional changes in the hemostasiological profile at various stages of vascular prosthesis implantation have been revealed. On the one hand, it is an increased prothrombogenic status, on the other hand, it is the development of hypocoagulation. Shortening of the *R* (blood coagulation time) and *K* (clot formation time) intervals and an increase in the angle parameter and maximum amplitude on the thromboelastogram in all the studied periods relative to the reference values, a significant increase in platelet factor 4 in PRP and increased platelet aggregation testified in favor of hypercoagulation. However, the quantitative parameters of the thrombin generation test and a number of coagulogram indicators pointed to hypocoagulation in the intraoperative and early postoperative periods.

Conclusion. The comparative analysis of local tests characterizing the state of hemostasis and indicators of integral methods demonstrated the advantages of the latter in assessing thrombotic risks during implantation of vascular grafts. Local tests are not sufficient to assess the dynamics of the coagulation process in real time and are not always sensitive to hypercoagulation. The use of integral methods will help to fill these gaps, make a timely diagnosis of hypercoagulability and minimize the risks associated with the implantation of vascular grafts in future.

Key words: hemostasiological profile; integral methods; local methods; implantation of a biodegradable vascular graft; prediction of thrombotic risks.

Введение

В настоящее время широко распространено использование животных моделей для проведения преclinical испытаний сосудистых протезов. Согласно литературным данным, овцы — модель, которая наиболее приближена к человеческой. Она является оптимальной для оценки роста, проходимости, эндотелизации, тромборезистентности, а также для постимплантационной визуализации тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра [1]. В то же время приблизительно в 40% случаев у овец раз-

вивается непроходимость имплантированных сосудов [2]. Адекватная оценка системы гемостаза позволила бы своевременно диагностировать и в результате предотвратить столь высокие тромботические риски, сопровождающие имплантацию сосудистых протезов. В связи с этим выбор лабораторного теста, наиболее точно отражающего изменения в гемостатическом профиле, является важной задачей.

При оперативном вмешательстве для оценки гемостатического потенциала используют как локальные, так и интегральные методы. К локальным относятся агрегатограмма, международное нормализованное

отношение (МНО), протромбин по Квику, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время, фибриноген, антитромбин III, протеин С и многие другие. К сожалению, данные методы дают крайне ограниченную информацию, характеризую состояние лишь отдельных звеньев гемостаза, что не позволяет в полной мере оценить динамику процесса коагуляции. Кроме того, локальные тесты имеют малую чувствительность к гиперкоагуляции [3]. Это обуславливает актуальность применения интегральных методов, целью которых является имитация и отражение основных физиологических аспектов процесса гемостаза *in vitro*. К ним относятся тромбоэластография (ТЭГ) и тест генерации тромбина (ТГТ). ТЭГ представляет собой чувствительный диагностический метод, дающий представление о кинетике образования сгустка от исходных нитей фибрина до фибринолиза в образцах цельной крови [4]. ТГТ позволяет оценить динамику образования и инактивации ключевого фермента гемостаза — тромбина, синтез которого происходит как в плазме крови, так и на поверхности активированных тромбоцитов. Использование различных модификаций ТГТ дает возможность оценки связанного и не связанного с тромбоцитами тромбогенеза [5].

В оценке системы гемостаза перспективным является изучение фактора тромбоцитов 4 (ТФ4), основная физиологическая функция которого — стимуляция свертывания крови [6]. Следовательно, повышение концентрации ТФ4 может рассматриваться как диагностический признак развития гиперкоагуляции. Однако на сегодняшний день исследования, направленные на изучение изменений ТФ4 во время оперативного вмешательства, практически отсутствуют.

В современной литературе мало данных об изменении системы гемостаза овец при имплантации сосудистых графтов, а также о сопоставлении результатов интегральных тестов с результатами локальных методов, полученных при данном виде оперативного вмешательства.

Цель исследования — оценить эффективность локальных и интегральных методов оценки гемостазиологического профиля овец на различных этапах имплантации биодеградируемого сосудистого протеза.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. Дизайн исследования одобрен локальным этическим комитетом. При работе с животными руководствовались «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012), международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Research Council, 2011),

а также этическими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006).

Объект исследования — цельная кровь овец эдильбаевской породы, ранее не оперированных (n=56), масса тела животных — 42–45 кг. Кровь забирали на этапе премедикации (до оперативного вмешательства), в интраоперационный период (спустя 2 мин после введения нефракционированного гепарина) и в ранний послеоперационный период (сразу после операции).

Описание оперативного вмешательства. Под наркозом с использованием изофлурана (на вводимом наркозе — 5 об.%, для поддержания анестезии — 2–3 об.%) проводили искусственную вентиляцию легких аппаратом MinorVet (Zoomed, Китай) в режиме вспомогательной вентиляции легких (SIMV) с ингаляцией 100% кислорода. После обработки и ограничения операционного поля выполняли разрез слева в проекции кивательной мышцы между яремной веной и трахеей, тем самым осуществляя доступ к сонной артерии. Мелкие ветви яремной вены и сонной артерии лигировали и пересекали. Сонную артерию тщательно отделяли от вагосимпатического ствола острым путем и полностью выделяли сегмент артерии длиной 7–8 см. Перед пережатием артерии проводили системную гепаринизацию, внутривенно вводя 5000 ЕД гепарина, а также промывание внутренней поверхности графта кровью животного с последующим промыванием физраствором с гепарином просвета сосудистого протеза от крови. Выполняли пережатие артерии атрауматичными зажимами. После пережатия на расстоянии около 6–7 см между зажимами иссекали участок артерии длиной 4 см под углом 45–60°. Далее животным вшивали биодеградируемый сосудистый протез диаметром 4 мм и длиной 4 см, вида PNBV/PCL/GFmix/гепарин/илопрост (1 животное — 1 протез). Непрерывный шов выполняли нитью Пролен 6-0 узловыми швами или «парашютной» техникой. Сначала формировали проксимальный анастомоз, снимали зажим с сонной артерии, пуская кровоток по графту с целью проверки качества наложения анастомоза. Затем снова накладывали зажим на сонную артерию перед проксимальным анастомозом и формировали дистальный анастомоз по вышеуказанной технологии. Пережатие протеза в ходе операции не осуществляли. Кровоток запускали по всему протезу после формирования дистального анастомоза. Затем выполняли послойный шов раны: глубокую фасцию с подкожной клетчаткой ушивали нитью Викрил 3-0. Кожу ушивали степлером. После операции оценивали проходимость сонной артерии с помощью УЗИ. Вне зависимости от ангиографической картины рану ушивали. Продолжительность операции в среднем составляла 1 ч 20 мин.

Оценка гемостазиологических параметров. ТЭГ выполняли на анализаторе TEG 5000

Thrombelastograph (Haemonetics, США). Оценивали следующие параметры: время свертывания крови (*R*, мин), время формирования сгустка (*K*, мин), максимальную амплитуду (мм) и угол (*angle*, °).

Тест генерации тромбина проводили в богатой (БТП) и обедненной тромбоцитами плазме (ОТП) с использованием набора Technothrombin TGA на анализаторе CEVERON-Alpha (Technoclon GmbH, Австрия). В кривой ТГТ оценивали такие показатели, как время запаздывания (*lag time* — *tLag*, мин), пиковую концентрацию тромбина (*peak thrombin* — *Peak*, нмоль/л), время достижения пика (*time to peak* — *tPeak*, мин) и эндогенный тромбиновый потенциал (*endogenous thrombin potential* — *ETP*, нмоль/мин) — площадь под кривой генерации тромбина.

Концентрацию ТФ4 в БТП и ОТП определяли с помощью иммуоферментного анализа с использованием набора CUSABio (Китай).

Для оценки функциональной активности тромбоцитов измеряли степень максимальной агрегации в БТП на агрегометре Helena AggRAM (BioSciences Europe, Великобритания) с использованием индукторов: адезиндифосфата (АДФ) — 1,25 и 2,5 мкг/мл; адреналина (5 мкг/мл); коллагена (100 мкг/мл) и без дополнительной стимуляции.

Протромбин по Квику и МНО определяли с использованием коагулометра ACL 7000-1 (Instrumentation Laboratory, США); АЧТВ, фибриноген по Клауссу, тромбиновое время, протеин С, антитромбин III — на анализаторе CEVERON-Alpha в соответствии с инструкциями производителя. Фибринолитическую активность плазмы крови измеряли с помощью обнаружения растворимых фибрин-мономерных комплексов в ортофенантролиновой пробе (планшетный вариант) и XIIa-калликреин-зависимого фибринолиз-теста в соответствии с инструкциями производителя («Технология Стандарт», Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с применением программного пакета Statistica 10.0. Для оценки характера распределения в совокупности по выборочным данным использовали тест Колмогорова–Смирнова. Результаты представляли в виде медианы и значений 25-го и 75-го квартилей — *Me* [*Q1*; *Q3*]. Межгрупповое сравнение зависимых групп с распределением признаков, отличных от нормального, проводили при помощи критерия Фридмана, попарное сравнение — критерия Вилкоксона. Используя поправку Бонферрони, за критический уровень значимости принимали $p \leq 0,017$ при сравнении трех зависимых групп. Для сравнения двух независимых групп использовали *U*-критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

При оценке кинетики тромбообразования не обнаружено статистически значимых различий показателей *R*, *K* и *angle*, отражающих динамику свертывания крови, в исследуемые периоды (табл. 1).

Значение максимальной амплитуды, характеризующее свойство образовавшегося сгустка — плотность, уменьшалось у овец в ранний послеоперационный период на 11% по сравнению с аналогичным показателем до операции, статистически значимых различий в другие исследуемые периоды не наблюдалось.

Вклад плазменно-коагуляционного и тромбоцитарного звеньев гемостаза в тромбиногенез оценивали с помощью ТГТ в БТП. При использовании ОТП исключалось влияние тромбоцитов на временные и количественные показатели ТГТ.

Время запаздывания (*tLag*) в БТП увеличивалось в 6,8 раза в интраоперационный период относительно показателей до оперативного вмешательства,

Таблица 1

Динамика показателей тромбозластографии у овец, *Me* [*Q1*; *Q3*]

Показатель	До операции (1)	Интраоперационный период (2)	Ранний послеоперационный период (3)	Межгрупповое сравнение	Попарное сравнение
<i>R</i> , мин	5,0 [4,4; 5,5]	7,6 [5,6; 9,4]	8,0 [6,4; 9,0]	$p=0,02$	$p_{1-2}=0,70$ $p_{1-3}=0,01$ $p_{2-3}=0,20$
<i>K</i> , мин	1,7 [1,3; 1,8]	2,2 [1,6; 2,4]	1,7 [1,4; 2,2]	$p=0,40$	$p_{1-2}=0,70$ $p_{1-3}=0,90$ $p_{2-3}=0,70$
<i>Angle</i> , °	66,6 [63,5; 70,7]	64,2 [61,6; 69,7]	67,5 [58,9; 72,6]	$p=0,70$	$p_{1-2}=0,80$ $p_{1-3}=0,90$ $p_{2-3}=0,80$
Максимальная амплитуда, мм	82,6 [80,9; 83,2]	79,8 [78,9; 81,4]	78,3 [75,9; 80,5]	$p=0,01$	$p_{1-2}=0,70$ $p_{1-3}=0,01$ $p_{2-3}=0,20$

и снижалось в ранний послеоперационный период, достигая значений до операции (табл. 2).

Пиковая концентрация тромбина (Peak) в БТП резко снижалась в интраоперационный период относительно показателей до оперативного вмешательства и оставалась на низком уровне в ранний послеоперационный период. ЕТР практически отсутствовал в интраоперационный период при сравнении с данными до оперативного вмешательства; в ранний послеоперационный период — увеличивался, но не достигал значений до операции (см. табл. 2).

В интраоперационный период tLag и tPeak в ОТП увеличивались в 5,0 и в 2,6 раза соответственно по сравнению с аналогичным показателем до начала операции. В отличие от БТП время запаздывания в

ОТП оставалось на высоком уровне в ранний послеоперационный период относительно показателей до оперативного вмешательства (табл. 3).

Для Peak в ОТП была характерна аналогичная динамика с данным показателем в БТП. В интраоперационный и ранний послеоперационный периоды ЕТР практически отсутствовал по сравнению со значениями до оперативного вмешательства (см. табл. 3).

В БТП установлено значительное увеличение ТФ4: в 3,2 раза в интраоперационный и в 9,4 раза — в ранний послеоперационный период относительно показателей до оперативного вмешательства. ОТП характеризовалась наименее выраженным приростом ТФ4 в исследуемые периоды. ТФ4 в ОТП был больше в 2,5 раза в интраоперационный период и в 4,2 раза — в

Т а б л и ц а 2

Динамика показателей теста генерации тромбина в богатой тромбоцитами плазме у овец, Ме [Q1; Q3]

Показатель	До операции (1)	Интраоперационный период (2)	Ранний послеоперационный период (3)	Межгрупповое сравнение	Попарное сравнение
tLag, мин	4,4 [3,8; 4,5]	29,7 [16,9; 45,8]	5,9 [3,7; 6,7]	p=0,010	p ₁₋₂ =0,017 p ₁₋₃ =0,10 p ₂₋₃ =0,016
tPeak, мин	10,0 [7,8; 10,3]	31,5 [18,4; 47,4]	16,1 [13,3; 24,7]	p=0,030	p ₁₋₂ =0,020 p ₁₋₃ =0,10 p ₂₋₃ =0,020
Peak, нмоль/л	291,5 [197,9; 421,2]	1,8 [1,3; 2,4]	5,9 [2,1; 12,6]	p=0,002	p ₁₋₂ =0,016 p ₁₋₃ =0,016 p ₂₋₃ =0,10
Эндогенный тромбиновый потенциал, нмоль/мин	3360,2 [2912,5; 4014,0]	3,7 [3,2; 11,0]	116,4 [20,0; 333,3]	p=0,001	p ₁₋₂ =0,015 p ₁₋₃ =0,015 p ₂₋₃ =0,016

Т а б л и ц а 3

Динамика показателей теста генерации тромбина в обедненной тромбоцитами плазме у овец, Ме [Q1; Q3]

Показатель	До операции (1)	Интраоперационный период (2)	Ранний послеоперационный период (3)	Межгрупповое сравнение	Попарное сравнение
tLag, мин	5,5 [3,5; 5,7]	27,4 [24,3; 32,6]	13,7 [9,6; 25,9]	p=0,002	p ₁₋₂ =0,01 p ₁₋₃ =0,01 p ₂₋₃ =0,70
tPeak, мин	11,7 [7,4; 14,5]	30,4 [27,0; 41,1]	20,2 [14,5; 29,0]	p=0,001	p ₁₋₂ =0,01 p ₁₋₃ =0,01 p ₂₋₃ =0,07
Peak, нмоль/л	160,1 [102,6; 307,7]	2,2 [1,4; 3,4]	1,6 [1,5; 2,1]	p=0,002	p ₁₋₂ =0,01 p ₁₋₃ =0,01 p ₂₋₃ =0,70
Эндогенный тромбиновый потенциал, нмоль/мин	2773,5 [2248,5; 3261,3]	6,4 [3,9; 9,1]	9,7 [5,9; 18,6]	p=0,001	p ₁₋₂ =0,01 p ₁₋₃ =0,01 p ₂₋₃ =0,30

ранний послеоперационный период при сравнении с данными до операции (рис. 1). Тенденция изменения динамики ТФ4 в БТП и ОТП была аналогична на всех этапах имплантации.

При оценке агрегатограммы установлены изменения в функциональной активности тромбоцитов овец на различных этапах оперативного вмешательства. В интраоперационный период при воздействии всех индукторов, а также без дополнительной стимуляции для тромбоцитов животных было характерно усиление агрегации при сравнении с показателями до операции. В ранний послеоперационный период степень максимальной агрегации тромбоцитов, индуцированная АДФ, независимо от концентрации оставалась на высоком уровне относительно значений до оперативного вмешательства. Между интраоперационным и ранним послеоперационным периодами не наблюдалось статистически значимых различий в параметрах АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Коллаген-индуцированная агрегация тромбоцитов в ранний послеоперационный период снижалась до показателей до операции (табл. 4).

Степень максимальной агрегации тромбоцитов, индуцированная адреналином, продолжала увеличиваться в ранний послеоперационный период, превышая показатели до операции в 9,6 раза, интраоперационного периода — в 1,2 раза. Спонтанная агрегация

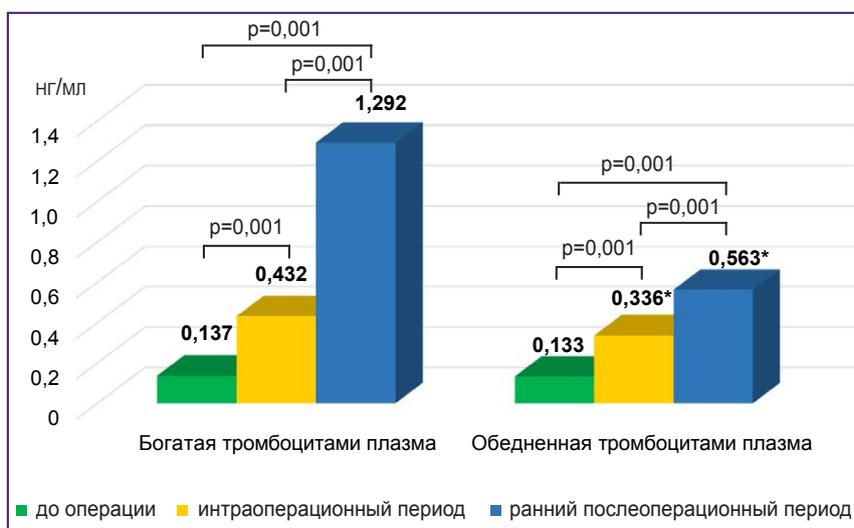


Рис. 1. Динамика фактора тромбоцитов 4 у овец

* статистически значимые различия между богатой и обедненной тромбоцитами плазмой, $p < 0,05$

тромбоцитов немного снижалась в ранний послеоперационный период, но была в 1,3 раза выше значений до операции (см. табл. 4).

При анализе данных коагулограммы установлено, что интраоперационный период у животных характеризовался снижением протромбина в 2,4 раза и увеличением МНО в 1,9 раза по сравнению с аналогичными показателями до оперативного вмешательства. В ранний послеоперационный период наблюдалось статистически значимое усиление активности протромбина в плазме овец в 1,6 раза и снижение МНО в 1,5 раза относительно значений интраоперационного периода

Таблица 4

Степень максимальной агрегации тромбоцитов (max, %) у овец на различных этапах оперативного вмешательства, Me [Q1; Q3]

Показатель	До операции (1)	Интраоперационный период (2)	Ранний послеоперационный период (3)	Межгрупповое сравнение	Попарное сравнение
АДФ 1,25 мкг/мл	74,8 [72,2; 81,9]	85,4 [83,4; 93,9]	84,5 [82,0; 91,3]	$p=0,001$	$p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3}=0,001$ $p_{2-3}=0,120$
АДФ 2,5 мкг/мл	83,3 [79,5; 86,4]	89,6 [83,1; 94,1]	87,2 [82,7; 92,5]	$p=0,001$	$p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3}=0,003$ $p_{2-3}=0,190$
Коллаген	81,5 [78,3; 85,1]	84,6 [83,1; 89,4]	82,4 [80,3; 87,7]	$p=0,001$	$p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3}=0,380$ $p_{2-3}=0,001$
Адреналин	1,6 [1,1; 2,4]	13,3 [5,9; 15,2]	15,9 [9,3; 20,2]	$p=0,001$	$p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3}=0,001$ $p_{2-3}=0,001$
Спонтанная агрегация тромбоцитов	3,0 [2,0; 4,0]	4,8 [4,0; 6,0]	4,0 [3,0; 5,0]	$p=0,001$	$p_{1-2}=0,003$ $p_{1-3}=0,007$ $p_{2-3}=0,007$

Таблица 5

Динамика показателей коагулограммы у овец, Ме [Q1; Q3]

Показатель	До операции (1)	Интраоперационный период (2)	Ранний послеоперационный период (3)	Межгрупповое сравнение	Попарное сравнение
Протромбин, %	85,4 [75,2; 108,5]	39,9 [26,6; 51,0]	61,7 [50,0; 68,5]	p=0,001	p ₁₋₂ =0,001 p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ =0,010
МНО	1,14 [1,0; 1,22]	1,97 [1,57; 2,29]	1,37 [1,29; 1,47]	p=0,001	p ₁₋₂ =0,001 p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ =0,001
АЧТВ, с	26,2 [24,0; 30,5]	188,5 [183,0; 195,0]	186,5 [93,8; 191,0]	p=0,001	p ₁₋₂ =0,001 p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ =0,180
Тромбиновое время, с	14,1 [12,5; 16,8]	38,5 [36,0; 43,0]	37,5 [32,0; 40,0]	p=0,001	p ₁₋₂ =0,001 p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ =0,60
Фибриноген, г/л	4,9 [4,2; 6,4]	5,7 [3,7; 8,1]	5,1 [4,0; 6,3]	p=0,10	—

Таблица 6

Динамика показателей фибринолитической системы у овец, Ме [Q1; Q3]

Показатель	До операции (1)	Интраоперационный период (2)	Ранний послеоперационный период (3)	Межгрупповое сравнение	Попарное сравнение
Фибринолиз, мин	6,5 [6,0; 8,0]	8,5 [7,0; 15,0]	12,0 [11,0; 14,0]	p=0,003	p ₁₋₂ =0,001 p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ =0,120
Растворимые фибрин-мономерные комплексы, мг%	14,5 [7,5; 16,0]	15,0 [12,0; 21,0]	12,0 [9,0; 15,0]	p=0,001	p ₁₋₂ =0,080 p ₁₋₃ =0,420 p ₂₋₃ =0,001

(табл. 5). Активность протромбинового комплекса в ранний послеоперационный период не достигала значений до операции.

В интраоперационный период у животных в плазме крови регистрировали удлинение АЧТВ в 7 раз относительно значений до начала операции. В ранний

послеоперационный период исследуемый показатель оставался на уровне интраоперационного периода. Аналогичная динамика в интраоперационный и ранний послеоперационный периоды была характерна для тромбинового времени. Анализ концентрации фибриногена в плазме крови овец не показал статисти-

чески значимых различий на разных этапах оперативного вмешательства.

Время растворения тромба увеличилось в 1,3 раза в интраоперационный и в 1,8 раза — в ранний послеоперационный период при сравнении с аналогичным показателем до начала операции (табл. 6).

Активность естественного антикоагулянта — антитромбина III — имела отрицательную динамику в исследуемые периоды, снижаясь на 11% в интраоперационный период и на 12% — в ранний послеоперационный период. Активность протеина С в плазме крови животных снижалась в интраоперационный период на 11%

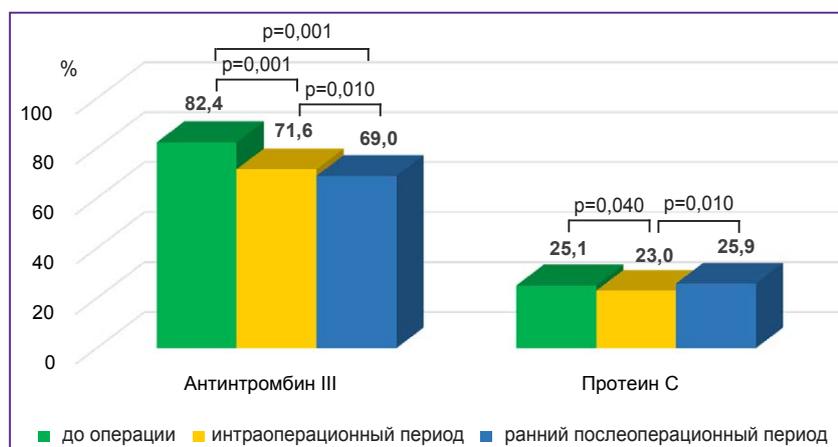


Рис. 2. Динамика показателей естественных антикоагулянтов у овец

относительно данных до оперативного вмешательства, в ранний послеоперационный период достигала значений до операции (рис. 2).

Обсуждение

Как известно, практически любое оперативное вмешательство сопровождается изменениями в системе гемостаза. Однако данных, касающихся направленности и выраженности этих изменений при имплантации сосудистых протезов овцам, крайне мало. Кроме того, открытым остается вопрос выбора лабораторного метода, наиболее четко отражающего изменения в гемостазиологическом профиле при оперативном вмешательстве. В нашей работе для оценки этих изменений использованы два подхода — интегральный и локальный. Применение интегральных тестов позволяет охарактеризовать функциональное состояние системы гемостаза и довольно точно имитировать *in vitro* процесс коагуляции, отражая все три фазы свертывания крови. Интегральные тесты оценивают активность тромбоцитов, кинетику тромбообразования, качество фибринового сгустка и фибринолиз, позволяя правильно интерпретировать патофизиологические механизмы нарушений свертывающей системы [7]. Локальные тесты оценки гемостаза, несмотря на их широкое распространение в лабораторной практике, не способны моделировать процесс коагуляции в естественных условиях. Они позволяют получать данные только о начале процесса коагуляции, следовательно, результат теста не является репрезентативным для всего процесса образования сгустка. Конечная точка этих тестов совпадает с фазой инициации, не давая информации о фазах усиления и распространения гемостатической системы [8]. Кроме того, локальные методы совершенно не учитывают роль тромбоцитов как важных участников процессов свертывания крови. Поэтому результаты локальных и интегральных тестов не совпадают, что и было обнаружено в нашей работе.

По результатам ТЭГ показано отсутствие статистически значимых различий интервалов R и K в исследуемые периоды, несмотря на введение нефракционированного гепарина во время имплантации сосудистых графтов. В то же время локальные тесты (АЧТВ, МНО, тромбиновое время) демонстрировали существенное увеличение временных интервалов в интра- и ранний послеоперационный периоды. Разница в результатах может быть обусловлена несколькими причинами: к примеру, использованием цельной крови в ТЭГ, а значит, вкладом тромбоцитарного звена гемостаза, который составляет до 80%, в формирование сгустка крови. Для проведения локальных тестов используется плазма крови. Следовательно, лабораторные тесты моделируют только «фрагменты» процесса свертывания крови, не отражая полную картину взаимодействия плазменных факторов и клеточных компонентов крови. Разница

между показателями R и АЧТВ, отражающими гипокоагуляционный эффект гепарина, может быть также обусловлена влиянием тромбоцитарных и эндотелиальных факторов свертывания, которые высвобождаются при активации тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза. Известно, что гепарин приводит к высвобождению ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) из эндотелия сосудов. В присутствии гепарина антитромбин и TFPI совместно ингибируют активацию свертывания крови. Антитромбин инактивирует фактор VII, связанный с тканевым фактором (ТФ), тогда как TFPI ингибирует образование комплексов фактора VIIa/ТФ [9]. Кроме того, исследования на животных [10] показали, что TFPI сам по себе обладает антитромботическими свойствами. Однако этот эффект нивелируется на фоне активации тромбоцитарного звена гемостаза при имплантации сосудистого протеза лабораторным животным, что и было отражено на тромбозограмме. Установлено, что интраоперационный период характеризовался усилением агрегации тромбоцитов с индукцией и без стимуляции, что, возможно, связано с активирующим влиянием гепарина непосредственно на тромбоциты и инициацией процессов адгезии и агрегации тромбоцитов во время оперативного вмешательства, поскольку в ранний послеоперационный период максимальная степень коллаген-индуцированной и спонтанной агрегации достигала значений до оперативного вмешательства. В целом наблюдаемые изменения в агрегатограмме характеризуют гиперкоагуляцию и согласуются с данными ТЭГ. Кроме того, отсутствие статистически значимых изменений интервалов R и K может свидетельствовать о низкой биодоступности и эффективности нефракционированного гепарина у овец. Вероятно, одним из объяснений данного феномена может служить увеличение концентрации ТФ4 в интраоперационный и ранний послеоперационный периоды. ТФ4 представляет собой высокоаффинный гепарин-связывающий белок, который высвобождается во время агрегации тромбоцитов [11]. Тетрамерная форма ТФ4 образует цилиндрическую структуру и включает экваториальное кольцо. Оно состоит из положительно заряженных аминокислот и образует сайт связывания с отрицательно заряженным гепарином. Сайт связывания гепарина и овечьего ТФ4 локализован в С-концевой области молекулы. Образование комплекса «ТФ4/гепарин» приводит к инактивации антикоагулянтного эффекта гепарина [12]. Возможно, влияние ТФ4 обуславливает раннюю тромботическую окклюзию 40% графтов, имплантированных овцам, в раннем послеоперационном периоде, несмотря на проводимую гепаринотерапию.

Значения angle , отображающие увеличение прочности сгустка и характеризующие функциональную активность фибриногена в цельной крови, не имели статистически значимых различий в исследуемые периоды. Полученные данные согласуются с содержанием в плазме крови фибриногена, уровень которого на протяжении всего периода наблюдения превышал

значения референсного интервала. Плотность сгустка в ранний послеоперационный период уменьшилась на 11% по сравнению с аналогичным показателем до операции. Показатель максимальной амплитуды характеризует состояние фибриногена и тромбоцитов. Возможно, что уменьшение плотности сгустка обусловлено статистически значимым снижением количества тромбоцитов в ранний послеоперационный период. Следует отметить, что во все исследуемые периоды наблюдалось укорочение интервалов R и K и увеличение $angle$ и максимальной амплитуды относительно референсных значений, что говорит об усилении протромбогенного статуса. Следовательно, процесс тромбообразования в крови овец происходит быстрее с формированием прочного сгустка на всех этапах имплантации сосудистых протезов.

Тест генерации тромбина относится к интегральным методам оценки гемостаза, однако существенно отличается от ТЭГ. Первое отличие — используемый материал для исследования: в ТГТ — плазма крови, в ТЭГ — цельная кровь. Второе отличие — принцип метода. Основой ТГТ является изучение кинетики генерации тромбина за счет определения скорости гидролиза специфичного к тромбину флуорогенного субстрата. ТЭГ относится к наиболее прямым способам, характеризующим функциональное состояние гемостатического потенциала и его конечного результата — образования фибринового тромба, что позволяет оценивать образование сгустка и агрегацию тромбоцитов одновременно. Данные отличия могут приводить к несопоставимости результатов ТЭГ и ТГТ.

По данным ТГТ, Peak и ETP до имплантации в БТП и ОТП превышали значения референсных интервалов. Следовательно, по результатам ТГТ протромбогенный статус крови овец до оперативного вмешательства усиливался, что согласуется с данными ТЭГ. Однако на фоне системной гепаринизации интенсивность несвязанного и связанного с тромбоцитами тромбиногенеза уменьшалась. На это указывает снижение эндогенного тромбинового потенциала и максимальной концентрации тромбина, свидетельствуя о развитии гипокоагуляции. В ранний послеоперационный период в БТП эндогенный тромбиновый потенциал увеличивался, но не достигал значений до операции, в ОТП — оставался на уровне интраоперационного периода. Выраженные отличия, вероятно, обусловлены вкладом в тромбиногенез, происходящий в БТП, тромбоцитарного звена гемостаза, в отличие от ОТП. Активация тромбоцитов сопровождается транслокацией отрицательно заряженных фосфолипидов на наружную поверхность их мембран, создавая таким образом условия для образования тромбина из протромбина [13].

Фибринолитическая активность плазмы крови в интраоперационный и ранний послеоперационный периоды снизилась (на это указывает удлинение времени растворения тромба), однако оставалась в пределах референсных интервалов. В то же время в интра-

операционный и ранний послеоперационный периоды наблюдалось статистически значимое снижение уровня антитромбина III. Теоретически повышенное использование антитромбина для реализации основных эффектов гепарина во время имплантации сосудистых протезов могло способствовать уменьшению его активности. Изменения функциональной активности протеина С в интраоперационный период, вероятно, обусловлены дисфункцией сосудистого эпителия при имплантации, на поверхности которого происходит активация протеина [14]. Снижение активности естественных антикоагулянтов традиционно рассматривается как показатель гиперкоагуляции, что не согласуется с данными коагулограммы и ТГТ, однако соответствует результатам ТЭГ.

Таким образом, проведенный в рамках нашего исследования сравнительный анализ локальных тестов, характеризующих состояние гемостаза, и показателей интегральных методов продемонстрировал преимущества последних в оценке тромботических рисков при имплантации сосудистых протезов.

Заключение

Локальные тесты не дают возможности оценить динамику процесса коагуляции в режиме реального времени и не всегда чувствительны к гиперкоагуляции. Использование интегральных методов позволяет восполнить эти пробелы, своевременно диагностировать гиперкоагуляцию и в дальнейшем минимизировать риски, сопровождающие имплантацию сосудистых протезов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант №20-15-00075 «Разработка биodeградируемого сосудистого протеза малого диаметра с атромбогенным и противомикробным покрытием».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Литература/References

1. Swartz D.D., Andreadis S.T. Animal models for vascular tissue-engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2013; 24(5): 916–925, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.005>.
2. Antonova L.V., Mironov A.V., Yuzhalin A.E., Krivkina E.O., Shabaev A.R., Rezvova M.A., Tkachenko V.O., Khanova M.Y., Sergeeva T.Y., Krutitskiy S.S., Barbarash L.S. A brief report on an implantation of small-caliber biodegradable vascular grafts in a carotid artery of the sheep. *Pharmaceuticals (Basel)* 2020; 13(5): 101, <https://doi.org/10.3390/ph13050101>.
3. Panteleev M.A., Hemker H.C. Global/integral assays in hemostasis diagnostics: promises, successes, problems and prospects. *Thromb J* 2015; 13(1): 5, <https://doi.org/10.1186/s12959-014-0032-y>.
4. Lipets E.N., Ataulkhanov F.I. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and

evaluation of thrombosis risk. *Thromb J* 2015; 13(1): 4, <https://doi.org/10.1186/s12959-015-0038-0>.

5. Duarte R.C.F., Ferreira C.N., Rios D.R.A., Reis H.J.D., Carvalho M.D.G. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2017; 39(3): 259–265, <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2017.03.009>.

6. Kowalska M.A., Rauova L., Poncz M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* 2010; 125(4): 292–296, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.11.023>.

7. Favalaro E.J., Lippi G. On the complexity of hemostasis and the need for harmonization of test practice. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(10): 1568–1574, <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0174>.

8. Negrier C., Shima M., Hoffman M. The central role of thrombin in bleeding disorders. *Blood Rev* 2019; 38: 100582, <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.05.006>.

9. Cella G., Sbarai A., Mazzaro G., Motta G., Carraro P., Andreozzi G.M., Hoppensteadt D.A., Fareed J. Tissue factor pathway inhibitor release induced by defibrotide and heparins. *Clin Appl Thromb Hemost* 2001; 7(3): 225–228, <https://doi.org/10.1177/107602960100700308>.

10. Østergaard P., Nordfang O., Petersen L.C., Valentin S., Kristensen H. Is tissue factor pathway inhibitor involved in the antithrombotic effect of heparins? Biochemical considerations. *Haemostasis* 1993; 1: 107–111, <https://doi.org/10.1159/000216919>.

11. Nevzorova T.A., Mordakhanova E.R., Daminova A.G., Ponomareva A.A., Andrianova I.A., Le Minh G., Rauova L., Litvinov R.I., Weisel J.W. Platelet factor 4-containing immune complexes induce platelet activation followed by calpain-dependent platelet death. *Cell Death Discov* 2019; 5: 106, <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0188-0>.

12. Datta P., Zhang F., Dordick J.S., Linhardt R.J. Platelet factor 4 polyanion immune complexes: heparin induced thrombocytopenia and vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. *Thrombosis J* 2021; 19(1): 66, <https://doi.org/10.1186/s12959-021-00318-2>.

13. Monroe D.M., Hoffman M., Roberts H.R. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(9): 1381–1389, <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000031340.68494.34>.

14. Rezaie A.R. Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways. *Curr Med Chem* 2010; 17(19): 2059–2069, <https://doi.org/10.2174/092986710791233706>.