

РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА С ПОМОЩЬЮ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Д.О. Тымчишин,
С.Л. Кутковец, О.О. Тымчишина

Украина

Получены усредненные гистограммы ЛК-спектров плазмы крови для групп пациентов без нарушений системы гемостаза и при умеренных нарушениях системы гемостаза по типу гипокоагуляции. У пациентов хирургического профиля в послеоперационном периоде умеренные патологические изменения со стороны системы гемостаза, сопровождаются значимыми изменениями ЛК-спектров плазмы крови. Выявленные закономерности свидетельствуют, что лазерная корреляционная спектроскопия плазмы крови может быть использована как дополнительный экспресс-метод для выявления коагулопатий при скрининговых исследованиях системы гемостаза.

Ключевые слова: коагулопатия, гипокоагуляция, лазерная корреляционная спектроскопия.

Введение

Кровообращение — важнейшая интегрирующая система, стабильное функциональное состояние которой в значительной степени определяется и регулируется системой гемостаза [1, 2].

Система гемостаза многокомпонентная система, которая обеспечивает, с одной стороны, сохранение крови в кровеносном русле в жидким агрегатном состоянии, а с другой — остановку кровотечения и предотвращение кровопотери при повреждении кровеносных сосудов. Сохранение общей активности гемостаза в физиологических пределах определяется как поддержание гемостатического баланса.

Изменения в системе гемостаза могут стать причиной развития как геморрагических, так и тромботических состояний при самых разных

заболеваниях. Огромное значение системы гемостаза в патогенезе заболеваний современного человека доказывается статистикой: такие гемостатические нарушения, как атеротромбоз и ДВС, являются причиной смерти более чем в половине всех случаев особенно в хирургической практике [3 — 6]. И кровотечение, и тромбоз могут быть смертельно опасны для организма и их легче предотвратить, чем лечить.

В профилактике гемостазиологических нарушений ведущее значение имеет корректная, быстрая и достоверная лабораторная диагностика, лежащая в основе эффективности лечения многих заболеваний и снижения смертности населения. Хотя исследованию гемостаза в последние годы уделяется большое внимание, рутинная лабораторная практика в изучении этой проблемы все еще развивается недостаточно динамично. Необходима, с одной стороны, качественно новая подготовка специалистов клинической лабораторной диагностики, с другой стороны принципиальное переоснащение лабораторной базы (аппаратной, реактивной и методической), и с третьей стороны подготовка клиницистов, для которых проблемы свертывания крови зачастую остаются «камнем преткновения» [7].

На сегодняшний день не вызывает сомнений то, что в основе функционирования системы гемостаза лежат белок-белковые взаимоотношения. Изменение активности и концентрации белков свертывающих и противосвертывающих звеньев гемостаза наблюдаются при разных физиологических и патологических состояниях [7]. Такие многокомпонентные биологические системы, как плазма, обычно исследуются большим набором сложных клинико-лабораторных методов [8]. На сегодняшний день более 500 клинико-лабораторных тестов применяются для оценки функционального состояния гемостаза. Такое многообразие тестов для оценки гемостаза является свидетельством сложности и неоднозначности решаемой задачи и порой делает невозможным вынесение достоверного и однозначного вывода о состоянии больного. Кроме того, многие компоненты системы гемостаза лабильны, а на результаты анализа влияет целый ряд факторов. Все это обуславливает сложности доаналитического этапа исследования, практически не учитывается характер межмолекулярных взаимодействий отдельных ингредиентов, имеющих место в нативной биологической среде. В то же время именно интегральная оценка этих процессов в значительной степени и характеризует согласованность функционирования основных биохимических систем человека.

Интегрально оценивать различные биологические системы позволяет метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), разработанный Санкт-Петербургским институтом ядерной физики РАН, совместно с ТОВ «Интокс» (Санкт-Петербург). Этот метод основан на регистрации изменений спектральных характеристик монохроматического светорассеивания при прохождении через дисперсионную систему [9, 10].

Взаимодействие лазерного излучения со светорассеивающими частицами, находящимися в броуновском движении, расширяет спектр рассеянного света, причем изменение его частоты происходит пропорционально скорости движения частиц, которая в свою очередь зависит от их размера.

Специально разработанные математические методы обработки ЛК-спектров позволяют анализировать многокомпонентные биологические жидкости без предварительного их разделения [11]. Результатом таких вычислений является функция распределения светорассеивающих частиц по размерам, представленная в виде гистограммы. По оси ординат обозначается процентный вклад частиц в светорассеяние, а по оси абсцисс — их размеры (в нанометрах). Это позволяет по изменению вклада в светорассеяние частиц с разными гидродинамическими радиусами проводить анализ изменений среди макромолекулярных субфракций биологических жидкостей при разных патологических состояниях.

Цель работы: повышение эффективности ранней диагностики нарушений системы гемостаза у хирургических больных в послеоперационном периоде за счет использования лазерной корреляционной спектроскопии плазмы крови.

Материалы и методы исследования

Под наблюдением находилось 72 пациента мужского пола в возрасте от 21 до 62 лет на 1-е сутки после оперативного вмешательства. По нозологическим формам пациенты распределились следующим образом: состояние после холецистэктомии — 34 пациента, состояние после аппендэктомии — 26 пациентов, состояние после операции по поводу механической кишечной непроходимости — 12 пациентов. Все пациенты находились на стационарном лечении в отделении абдоминальной хирургии Военно-медицинского клинического центра Южного региона. Всем пациентам выполнены следующие лабораторные тесты: определение протромбинового времени

(ПВ), протромбинового индекса (ПТИ), протромбинового отношение (ПО), международного нормализованного соотношения (МНО) и фибриногена А по [7]. Эти тесты позволяют провести скрининговую оценку изменений системы гемостаза пациентов [7].

По результатам оценки функционального состояния системы гемостаза все пациенты распределены на две группы. В I группу вошли 21 (29,2 %) пациент, у которых не выявлено патологических изменений системы гемостаза, II группу составили 51 (70,8%) пациент, у которых наблюдались сдвиги в системе гемостаза. Для контроля использовали плазму крови 30 клинически здоровых доноров, представленных Центром крови Военно-медицинского клинического центра Южного региона.

Кроме того плазма крови пациентов и доноров подвергалась ЛКС-метрии. Измерения проводили на лазерном корреляционном спектрометре ЛКС-03, разработанном в отделе молекулярной и радиационной биофизики Санкт-Петербургского института ядерной физики РАН. Полученные спектры анализировали при помощи специальной компьютерной программы — «семиотического» классификатора, прилагаемой к ЛК-спектрометру

При помощи «семиотического» классификатора были выделены дифференциально-значимые зоны (ДЗЗ) по размерам светорассеивающих частиц: I ДЗЗ — сверхнизкомолекулярная — от 2 до 11 нм; II ДЗЗ — низкомолекулярная — от 12 до 37 нм; III ДЗЗ — среднемолекулярная — от 38 до 95 нм; IV ДЗЗ — высокомолекулярная — от 96 до 264 нм; V ДЗЗ — сверхвысокомолекулярная — больше 265 нм. Выбор диапазонов ДЗЗ осуществлен на основании изучения характера многопараметровых сдвигов в системе плазменного и сывороточного гомостаза у здоровых и больных [10, 12 — 13]. Материалом для исследований была плазма венозной крови, подготовленная к исследованию по [10]. Достоверность отличий оценивали при помощи t-теста.

Результаты исследования и их обсуждение

У доноров и у пациентов до оперативного вмешательства значения изучаемых показателей были в пределах референтных величин: ПВ — 18-24 сек, ПТИ — 80-120 %, ПО — 0,8 — 1,2, МНО — 0,81-1,35, ФА — 2-4 г/л.

Результаты оценки функционального состояния системы гемостаза у пациентов в 1-е сутки после операции представлены в табл. 1. У пациентов I группы после оперативного вмешательства нарушений со стороны системы гемостаза не выявлено. В то же время у

пациентов II группы выявлены нарушения системы гемостаза, которые характеризовались умеренным удлинением ПВ, увеличением ПО и МНО, а так же небольшим снижением ПТИ, что свидетельствовало о формировании гипокоагуляции и могло привести к кровотечению. Кроме этого выявлено увеличение концентрации фибриногена А, что свидетельствовало об остром воспалительном ответе, возможно на повреждение вследствие оперативного вмешательства. Причем выявленные отличия показателей гемостаза у пациентов II группы достоверно отличались от аналогичных показателей у пациентов I группы и доноров при $p < 0,05$ (Табл. 1).

При исследовании плазмы крови методом ЛКС получены следующие результаты. В плазме крови доноров выявлено преобладание вклада в светорассеяние частиц III Д33 (от 39 до 95 нм) с относительно одинаковым вкладом в светорассеивание частиц II, IV и V Д33 (Рис. 1).

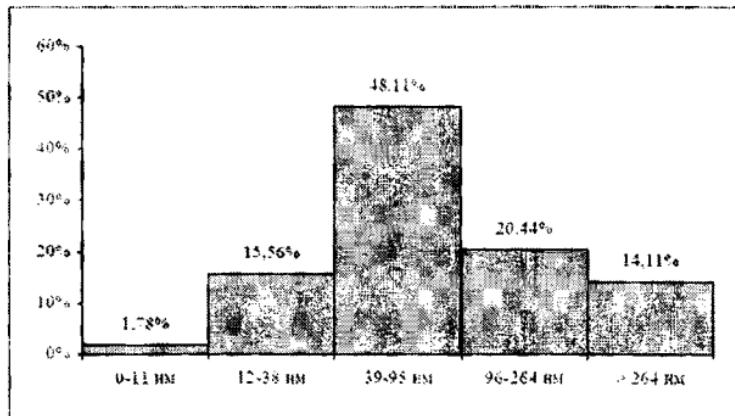


Рис. 1 Обобщенный ЛК-спектр плазмы крови доноров.

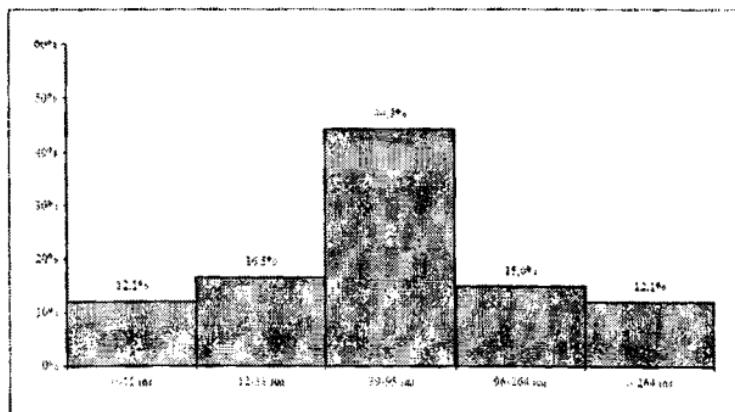


Рис. 2 Обобщенный ЛК-спектр плазмы крови пациентов I группы.

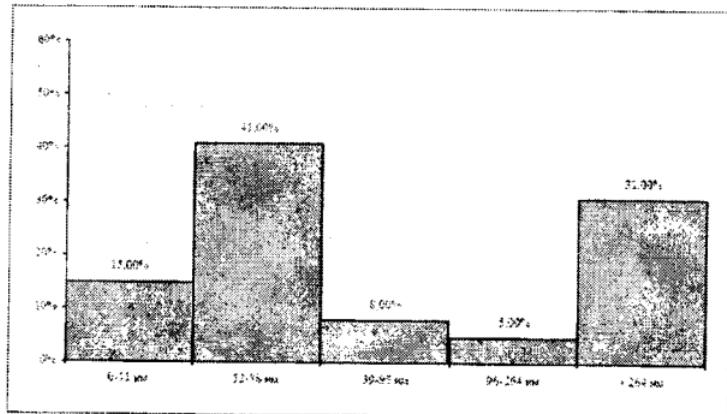


Рис. 3 Обобщенный ЛК-спектр плазмы крови пациентов II группы.

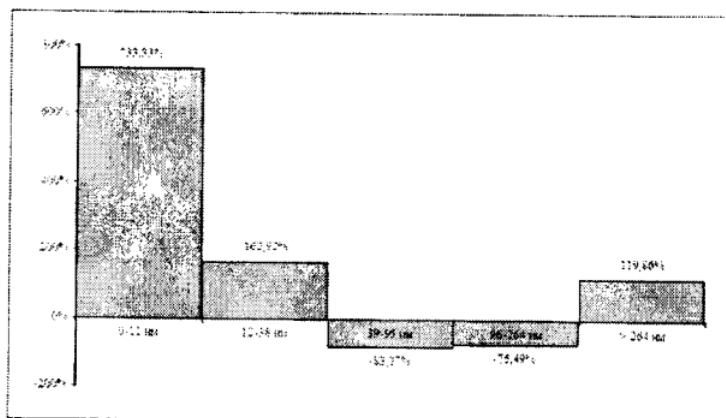


Рис. 4 Динамика изменения ЛК-спектров плазмы крови пациентов II группы в сравнении с донорами.

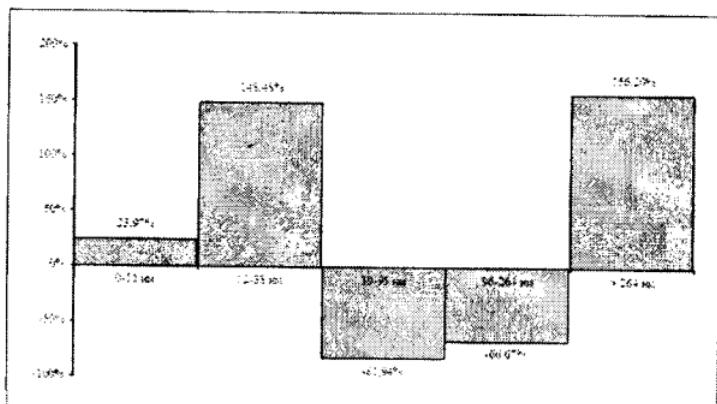


Рис. 5 Динамика изменения ЛК-спектров плазмы крови пациентов II группы в сравнении с пациентами первой группы.

Показатели системы гемостаза у пациентов хирургического профиля в 1-е сутки после операции

Группа обследуемых	Показатель	M	Доверительный интервал	Min	Max
Первая группа (n=21)	ПВ (сек)	22,33	21,68 ± 22,99	22,00	23,00
	ПТИ (%)	81,93	81,80 ± 82,06	81,80	82,00
	ПО (абс)	1,20	1,20 ± 1,21	1,20	1,21
	МНО (абс)	1,28	1,25 ± 1,30	1,25	1,29
	ФА (г/л)	3,00	2,02 ± 3,98	2,50	4,00
Вторая группа (n=51)	ПВ (сек)	23,82	22,91 ± 24,72	19,00	32,00
	ПТИ (%)	77,43*	75,27 ± 79,60	60,00	90,00
	ПО (абс)	1,27*	1,23 ± 1,31	1,10	1,70
	МНО (абс)	1,39*	1,33 ± 1,45	1,22	2,10
	ФА (г/л)	4,72*	4,02 ± 5,42	1,25	9,50

*Примечание: * — показатели достоверно отличаются относительно аналогичных измерений у пациентов первой группы и доноров (p<0,05).*

Результаты ЛКС исследования плазмы крови пациентов I группы представлены на Рис. 2. По отношению к ЛК-спектрам плазмы крови доноров выявлено статистически значимое увеличение вклада в светорассеивание сверхнизкомолекулярных частиц (I ДЗЗ от 0 до 11 нм) и статистически значимое уменьшение вклада в светорассеивание высокомолекулярных частиц (IV ДЗЗ от 96 до 264 нм). Согласно [10] такая структура ЛК-спектров характерна для гидролитически-направленных изменений в плазме крови с преобладанием дистрофически-подобных процессов. Возможно, это является свидетельством, происходящих у пациентов компенсаторных процессов в ответ на повреждение (оперативное вмешательство).

Результаты ЛК-исследования плазмы крови пациентов II группы представлены на Рис. 3. Как видно на рис. 3 у пациентов II группы увеличивается вклад в светорассеивание низкомолекулярных и сверхвысокомолекулярных частиц. Согласно «семиотического» классификатора такая направленность ЛК-спектра характерна для аутоиммунно-интоксикационно-подобных сдвигов [10].

По отношению к ЛК-спектрам плазмы крови доноров выявлено увеличение вклада в светорассеивание сверхнизкомолекулярных (на 733,33 %), низкомолекулярных (на 162,82 %) и сверхвысокомолекулярных (на 119,86 %) частиц. В то же время наблюдается умень-

шение вклада в светорассеивание среднемолекулярных (на 83,37 %) и высокомолекулярных (75,49 %) частиц (Рис. 4). Выявленные изменения были статистически достоверными при $p < 0,05$.

По отношению к ЛК-спектрам плазмы крови пациентов I группы выявлено увеличение вклада в светорассеивание сверхнизкомолекулярных (на 23,97 %), низкомолекулярных (на 148,48 %) и сверхвысокомолекулярных (на 156,20 %) частиц. В то же время наблюдается уменьшение вклада в светорассеивание среднемолекулярных (на 81,94 %) и высокомолекулярных (66,67 %) частиц (Рис. 5). Выявленные изменения были статистически достоверными при $p < 0,05$.

Выводы

1. Получены усредненные гистограммы ЛК-спектров плазмы крови для групп пациентов без нарушений системы гемостаза и при умеренных нарушениях системы гемостаза.
2. У пациентов хирургического профиля в послеоперационный период умеренные патологические изменения со стороны системы гемостаза, сопровождаются значимыми изменениями ЛК-спектров плазмы крови аутоиммунно-интоксикационной направленности.
3. Выявленные закономерности свидетельствуют, что лазерная корреляционная спектроскопия плазмы крови может быть использована как дополнительный экспресс-метод для ранней диагностики нарушений системы гемостаза

Литература

1. Современные представления о системе гемостаза / Г. Л. Волков, Т. Н. Платонова, А. Н. Савчук [и др.] — К.: Наук. думка, 2005. — 296 с.
2. Некоторые вопросы физиологии и патологии тромбоцитарного звена системы гемостаза / Н. Т. Ватутин, Е. В. Кетинг, Н. В. Калинкина, Е. В. Склянная // Кровообіг та гемостаз. — 2008. — N 3. — С. 41-49.
3. Чермних С. В. Аутогемотрансфузія в профілактиці післяопераційних ускладнень при кесаревому розтині: Автореф. дис... канд. мед. наук / С.В. Чермних; Ін-т педіатрії, акушерства та гінекології АМН України. — К., 1998. — 18 с.
4. Іващук О. І. Локальний гемостаз в хірургії виразки дванадцятипалої кишки, ускладненої кровотечею, у хворих старше 60 років / О.І. Іващук // Клініч. хірургія. — 2002. — N 5-6. — С. 11-12.
5. Старіков А. В. Фармакокінетика і фармакодинаміка медикаментозних засобів, що використовують в інтенсивній терапії пацієнтів із гемокоагуляційними порушеннями / А.В. Старіков // Кровообіг та гемостаз. —

6. Іващук О. І. Хірургічний гемостаз гострокровоточивої виразки задньої стінки дванадцятипалої кишki / О. І. Іващук, І. О. Малишевський // Клініч. анатомія та операт. хірургія. — 2011. — 10, N 3. — С. 46-48.
7. Долгов В. Б. Лабораторная диагностика нарушенний обмена белков / В. Б. Долгов, О. П. Шевченко. — М., 1997. — 64 с.
8. Карпищенко А. И. Медицинские лабораторные технологии / А. И. Карпищенко. — СПб, 1999 — 649 с.
9. Арефьев И. М. Лазерный корреляционный спектроскоп для иммунологических и вирусологических анализов / И. М. Арефьев, А. Н. Еськов, И. К. Юдин // Мед. техника. — 1979. — № 2. — С. 30-34.
10. Бажора Ю. И. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине / Ю. И. Бажора, Л. А. Носкин — Одесса.: «Друк», 2002. — 400 с.
11. Лебедев А. Д. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии / А. Д. Лебедев, Ю. Н. Левчук, В. А. Носкин — К.: Наукова думка, 1987. — 256 с.
12. Соколовский В. С. Экспресс-оценка системы гомеостаза в динамике физической нагрузки спортсменов, занимающихся циклическими и ациклическими видами спорта / В. С. Соколовский, Л. А. Носкин, Ю. И. Бажора // Теория и практика физической культуры. — 1991. — № 11. — С. 2-6.
13. Simmons P. Plasma Protein Diagnostics / P. Simmons. — Somerville: Behring Diagnostics. — 1994. — 543 р.

Д.О. Тимчишин, С.Л. Кутковець, О.О. Тимчишина. Рання діагностика порушень системи гемостазу за допомогою лазерної кореляційної спектроскопії плазми крові. Україна.

Ключові слова: коагулопатія, гіпокоагуляція, лазерна кореляційна спектроскопія.

Отримані усереднені гістограми ЛК-спектрів плазми крові для груп пацієнтів без порушень системи гемостазу і при помірних порушеннях системи гемостазу за типом гіпокоагуляції. У пацієнтів хірургічного профілю в післяоператійному періоді помірні патологічні зміни з боку системи гемостазу, супроводжуються значимими змінами ЛК-спектрів плазми крові. Виявлені закономірності свідчать, що лазерна кореляційна спектроскопія плазми крові може бути використана як додатковий експрес-метод для виявлення коагулопатій при скринінгових дослідженнях системи гемостазу.

D.O.Tymchishin, C.L.Kutkovets, O.O.Tymchishina. Early diagnostics of violations of system of hemostasis with application of laser cross-correlation spectroscopy of plasma of blood. Ukraine.

Keywords: *koagulopatiya, hypocoagulation, laser correlation spectroscopy*

Average histograms of LC-ranges of plasma of blood for groups of patients without violations of system of a hemostasis are received and at moderate violations of system of a hemostasis as hypocoagulation. At patients of a surgical profile in the postoperative period moderate pathological changes from hemostasis system, are accompanied by significant changes of LC-ranges of plasma of blood. The revealed regularities testify that the laser correlation spectroscopy of plasma of blood can be used as an additional express method for identification of koagulopatiya at screening researches of system of a hemostasis.