

*В. В. Большов, В.В. Дмитриев, Н.И. Петрович, М.Б. Борисенко*

## **ГЕМОСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВЯНОГО СГУСТКА ПРИ ГЕМОФИЛИИ А, ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРЕ И ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ**

В работе изучена ретракция, спонтанный фибринолиз, гемостатические свойства кровяного сгустка и оценена возможность использования местного гемостатика поликапрана при гемофилии А, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре и остром лимфобластном лейкозе у детей, нуждающихся в хирургической стоматологической помощи. Дополнительно у больных гемофилией А проведено три серии стендовых исследований по изучению влияния поликапрана и эpsilon-аминокапроновой кислоты (?-АКК) на гемостатические свойства сгустка, ретракцию и фибринолиз в условиях *in Vitro*. Установлено, что использование местного гемостатика поликапрана более оправдано, чем использование ?-АКК. Ключевые слова: дети, гемофилия А, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, острый лимфобластный лейкоз, кровяной сгусток, местные гемостатики, ?-АКК, поликапран.

Hemostatic properties of the blood clot in case of hemophilia A, idiopathic thrombocytopenic purpura, lymphoblastic leukosis in children Clot's retraction, fibrinolysis and hemostatic properties were studied and the possibility was evaluated of using of local hemostatic policapran in children with idiopathic thrombocytopenic purpura, lymphoblastic leukosis, hemophilia A, who needs in surgical stomatological treatment. Influence of policapran and aminocaproic acid on clot's hemostatic properties retraction and fibrinolysis *in vitro* were investigated in children with hemophilia A. It has been found that local hemostatic policapran is more significantly effective than aminocaproic acid in children with hemoragical problems. Key words: children, hemophilia A, idiopathic thrombocytopenic purpura, lymphoblastic leukosis, blood clot, local hemostasis, policapran, ?-aminocapraic acid.

Лечение осложненных форм кариеса, заболеваний пародонта, удаление зубов при нарушениях гемостаза сопряжено с возникновением тяжелых кровотечений. Для предотвращения геморрагических осложнений требуется заместительная терапия препаратами и компонентами крови в условиях стационара [9, 10].

Известны различные местные гемостатические средства и способы остановки кровотечений [1, 2, 3, 4]. Проблема эффективного гемостаза в амбулаторной практике до сих пор не утратила своего значения и практически не освещена в стоматологии детского возраста. Это оправдывает изучение патогенетических механизмов действия местного гемостатического средства поликапрана [6, 7, 8] и разработку научно-обоснованных методов его применения в современной стоматологии детского возраста.

Цель исследования: изучить ретракцию, спонтанный фибринолиз, гемостатические свойства кровяного сгустка и оценить возможность использования местного гемостатика поликапрана при гемофилии А,

идиопатической тромбоцитопенической пурпуре и остром лимфобластном лейкозе у детей, нуждающихся в хирургической стоматологической помощи.

Материал и методы. Обследовано 30 детей в возрасте от 5 до 14 лет, находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии и гематологии с 1995 по 2000 год с тяжелой формой гемофилии А– 10, идиопатической тромбоцитопенической пурпурой (ИТП) - 9, после успешного лечения по протоколу ALL-BFM-90 острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) - 11 пациентов. Оценка гемостатических свойств кровяного сгустка выполнялась в связи с необходимостью выбора местного гемостатика перед предстоящим оказанием стоматологической помощи. Пациенты в течение суток, предшествовавших исследованию, не получали фармакологических средств и препаратов крови, воздействующих на систему гемостаза. Клиника геморрагического синдрома у всех больных отсутствовала. Контрольную группу составили 12 соматически здоровых детей аналогичного возраста, находившихся на лечении по поводу грыжесечения в БелЦДХ (1-я клиническая больница г.Минска).

Одновременное определение ретракции, спонтанного фибринолиза и гемостатических свойств кровяного сгустка осуществлялось микрометодом В.А.Бандарина, Е.П.Иванова, В.А.Сятковского и Л.Н.Трусова (1971) [5] в неполярной среде (касторовое масло) с использованием ретрафракциметра – специального, прозрачного стеклянного резервуара, к которому припаян, градуированный на 50 делений, капилляр объёмом 100 мкл. Резервуар ретрафракциметра заполняли касторовым маслом и прогревали в вертикальном положении при 37°С на водяной бане. После пункции периферической вены без наложения жгута микропипеткой с пластиковым наконечником вносили в касторовое масло прогретого ретрафракциметра 100 мкл цельной нестабилизированной крови на глубину 3-5 мм. Затем, закрытый резиновой пробкой ретрафракциметр с небольшим пузырьком воздуха помещали на водяную баню в горизонтальном положении для регистрации времени свертывания крови и начала ретракции. Ретрафракциметр инкубировали 2 часа от начала исследования. Концентрация фибриногена (г/л) в плазме стабилизированной цитратной (1:9) крови определялась суховоздушным методом Р.А.Рутберг (1961). Рассчитывалась величина гематокритного показателя ( $\times 10^{-2}$  л/л).

Дополнительно у больных гемофилией А проведено три серии стендовых исследований по изучению влияния поликапрана и эпислон-аминокапроновой кислоты (?-АКК) на гемостатические свойства сгустка, ретракцию и фибринолиз в условиях *in Vitro*. Первая серия: в пластиковую пробирку содержащую 30 мкл 5%-раствора ?-АКК вносили 1000 мкл цельной нестабилизированной крови больного гемофилией, создавая концентрацию препарата в крови 1,5 мг/мл. Необходимое количество крови вносили в наполненный касторовым маслом ретрафракциметр, а затем заполняли гепаринизированный капилляр для определения гематокритного показателя. Оставшуюся кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 1:9 для последующего определения концентрации фибриногена. Вторая серия: в пластиковую пробирку содержащую 30 мкл изотонического

раствора натрия хлорида вносили 1000 мкл нестабилизированной цельной крови больного гемофилией. Последующие действия были аналогичны таковым в первой серии. В третьей серии 100 мкл нестабилизированной цельной крови наносили на квадратную пластину поликапрана, размером 4x4 мм. После нанесения и равномерного распределения крови по всей площади пластину поликапрана цепляли кончиком иглы и погружали в касторовое масло (на выполнение процедуры отводилось не более 1 минуты), заполнявшее резервуар прогретого ретрафракциметра. Последний инкубировали 2 часа при 37°C. Результаты исследования обработаны статистически.

Результаты и обсуждение.

Увеличение объема кровяного сгустка у больных ИТП до  $0,68 \pm 0,02$  л/л было сопряжено ( $r = -0,68$ ;  $p < 0,05$ ) со снижением ( $p < 0,01$ ) его ретракции до  $36,0 \pm 2,0\%$  по сравнению с контролем  $0,42 \pm 0,01$  л/л и  $79,0 \pm 4,3\%$ , соответственно (табл.1).

Изменение структуры сгустка произошло преимущественно за счет увеличения объема сыворотки, содержащейся в сгустке через 2 часа после свертывания крови, на что указывало снижение в 2,4 раза соотношения форменных элементов и сыворотки в сгустке до  $0,74 \pm 0,05$  усл.ед. ( $p < 0,01$  по сравнению с контролем  $1,8 \pm 0,1$  усл.ед.). Лизис фибрина сгустка  $1,5 \pm 0,15$  г/л, влияющий на высвобождение эритроцитов из сгустка и величину третьей фракции, был только на треть ниже ( $p < 0,01$ ), чем в контроле  $2,3 \pm 0,15$  г/л. Увеличение объема сгустка в сочетании со снижением ретракции сопровождалось изменением его структуры и потерей гемостатических свойств, на что указывало снижение ( $p < 0,01$ ) показателя структурной характеристики до  $4,9 \pm 0,3$  г/л 2.

Таблица 1

Гемостатические свойства кровяного сгустка при гемофилии, ИТП и после лечения ООЛ у детей

Гемостатический показатель	Контроль n=12	Заболевание крови		
		гемофилия n = 10	лейкоз n = 12	ИТП n = 9
Фибриноген плазмы, г/л	$2,7 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,25$	$2,6 \pm 0,15$	$2,5 \pm 0,2$
Тромбоциты венозной крови, $\times 10^9 / л$	$320,0 \pm 10,2$	$391,0 \pm 6,4^*$	$240,0 \pm 8,3^*$	$60,0 \pm 7,6^*$
Гематокрит, $\times 10^{-2}$ л/л	$42,0 \pm 1,5$	$38,0 \pm 2,0$	$40,0 \pm 1,8$	$39,0 \pm 2,5$
Ретракция сгустка, %	$79,0 \pm 4,3$	$65,0 \pm 4,5$	$60,0 \pm 3,5^*$	$36,0 \pm 2,0^*$
Фибрин крови, г/л	$6,3 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,3^*$	$6,2 \pm 0,4$	$6,1 \pm 0,4$
Спонтанный фибринолиз (Сф), г/л	$2,3 \pm 0,15$	$2,2 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,15^*$
Соотношение форменных элементов и сыворотки в стке (S), усл. ед	$1,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,12^*$	$1,0 \pm 0,06^*$	$0,74 \pm 0,05^*$
Объем сгустка (V), л/л	$0,42 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,03$	$0,68 \pm 0,02^*$
Структурная характеристика сгустка (J), г/ л <sup>2</sup>	$19,9 \pm 1,4$	$15,1 \pm 1,2^*$	$8,3 \pm 0,5^*$	$4,9 \pm 0,3^*$

ПРИМЕЧАНИЕ: \*- достоверность различия сравниваемого показателя с контролем  $p < 0,01$

Объем сгустка у детей, прошедших курс лечения ОЛЛ  $0,49 \pm 0,03$  л/л был значимо ( $p < 0,01$ ) меньше, чем у больных ИТП и незначительно превышал ( $p < 0,05$ ) значение аналогичного показателя в контроле. Увеличение объема сгустка было обусловлено снижением его ретрактивных свойств, на что указывал индекс ретракции  $60,0 \pm 3,5\%$ . Спонтанный фибринолиз  $2,34 \pm 0,4$  г/л был таким

же, как и в контроле, а соотношение объема форменных элементов и сыворотки в сгустке  $1,0 \pm 0,06$  усл.ед. почти в 2 раза меньше. Увеличение объема сгустка и снижение ретрактивных свойств сгустка сопровождалось снижением гемостатических свойств, что подтверждалось снижением ( $p < 0,01$ ) показателя структурной характеристики сгустка до  $8,3 \pm 0,6$  г/л<sup>2</sup>.

Относительное снижение до  $62,0 \pm 4,5\%$  ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем) индекса ретракции кровяного сгустка зарегистрировано у детей, страдающих гемофилией А. Фибрин крови  $8,7 \pm 0,3$  г/л превышал ( $p < 0,01$ ), а лизис фибрина сгустка  $2,2 \pm 0,2$  г/л был таким же как в контроле, что свидетельствовало о повышенном содержании фибрина в сгустке. Фибрин лизированный в сгустке составил 25% от всего фибрина крови, в то время как для контроля это соотношение превысило 36%. Лизис фибрина сгустка при гемофилии менее интенсивен, чем у здоровых детей. Объем сгустка  $0,44 \pm 0,05$  л/л не отличался от контроля, а показатель его структурной характеристики  $15,1 \pm 0,8$  г/л<sup>2</sup> был меньше  $19,9 \pm 1,4$  г/л<sup>2</sup> ( $p < 0,01$ ) что свидетельствовало о снижении гемостатических свойств кровяного сгустка.

Повышение гемостатических свойств за счет изменения структурной характеристики возможно путем повышения ретракции или торможения лизиса фибрина сгустка. Ретрактивные свойства сгустка во многом зависят от количества и функциональных свойств тромбоцитов, на которые воздействовать фармакологически не всегда представляется возможным. При ИТП тромбоцитопения ( $60,0 \pm 7,6$ )  $\times 10^9$ /л сопровождалась нарушением ретракции и синерезиса фибринового сгустка. После лечения ОЛЛ у детей уровень тромбоцитов составил ( $240,0 \pm 8,3$ )  $\times 10^9$ /л. Снижение ретрактивных свойств сгустка при содержании тромбоцитов, приближавшемся к норме, отражало функциональную недостаточность последних. Сохраненная ретрактивная способность сгустка и относительное торможение интенсивности фибринолиза отличали гемофилию от ИТП и ОЛЛ. Патогенетически оправдано применение при гемофилии, ИТП и ОЛЛ местного гемостатика, преимущественно воздействующего на ретрактивные свойства сгустка и в меньшей мере угнетающего фибринолиз.

Добавление 30 мкл физраствора к 1000 мкл цельной крови больного гемофилией существенно не отразилось на ретракции и гемостатических свойствах сгустка. Прием внутрь разовой дозы  $\gamma$ -АКК 100 мг/кг массы тела (при условии одномоментного поступления фармсредства во внутрисосудистое пространство) способен вызвать повышение концентрации препарата в крови до 1,5 мг/мл.) Присутствие в крови (in Vitro)  $\gamma$ -АКК сопровождалось снижением ( $p < 0,05$ ) лизиса фибрина сгустка до  $1,3 \pm 0,3$  г/л по сравнению с аналогичным показателем  $2,2 \pm 0,2$  г/л, зарегистрированным в присутствии физраствора (табл.2).

Таблица 2

Влияние in Vitro поликапрана и  $\gamma$ -АКК на фибринолитическую активность и гемостатические свойства кровяного сгустка при гемофилии у детей

Гемостатический показатель	Контроль n = 12	Фармакологическое средство		
		физраствор n = 10	ε-АКК n = 10	поликапран n = 10
Фибриноген плазмы, г/л	2,7±0,3	3,3±0,25	3,4±0,15	3,3±0,2
Тромбоциты венозной крови, x10 <sup>9</sup> /л	320,0±10,2	380,0±6,0*	380,0±6,0*	391,0±6,4*
Гематокрит, x 10 <sup>-2</sup> л/л	42,0±1,5	37,8±2,0	38,0±2,0	38,0±2,0
Ретракция сгустка, %	79,0±4,3	65,5±4,0	67,0±3,5	0
Фибрин крови, г/л	6,3±0,4	8,6±0,3*	8,7±0,4*	8,7±0,3
Спонтанный фибринолиз (Сф), г/л	2,3±0,15	2,2±0,2	1,3±0,3*	0
Соотношение форменных элементов и сыворотки в сгустке (S), усл. ед.	1,8±0,1	1,2±0,12*	1,4±0,06*	∞
Объем сгустка (V), л/л	0,42±0,01	0,44±0,05	0,53±0,03	>1,0
Структурная характеристика сгустка (J), г/л <sup>2</sup>	19,9±1,4	15,0±0,7*	18,3±0,4	∞
<b>ПРИМЕЧАНИЕ:</b> *- достоверность различия сравниваемого показателя с контролем p<0,01				

Ретракция 67,0±3,5% и соотношение форменных элементов и сыворотки сгустка 1,4±0,06 усл.ед. не отличались от таковых в присутствии физраствора 65,5±4,0% и 1,2±0,12 усл.ед., соответственно. Угнетение фибринолиза и увеличение доли эритроцитов в сгустке при сохраненном содержании сыворотки сопровождалось повышением показателя его структурной характеристики до 18,3±0,4 г/л<sup>2</sup>, что не отличалось от контроля 19,9±1,4 г/л<sup>2</sup>. Данное обстоятельство определяло механизм воздействия ε-АКК: за счет торможения фибринолиза формирование гемостатически полноценного сгустка. Свертывание крови и начало ретракции зарегистрированы в первой и второй сериях после 30-ой минуты инкубации.

Нанесение 100 мкл цельной крови, содержащей (391,0±6,4) x 10<sup>9</sup>/л тромбоцитов, фибриногена 3,3±0,2 г/л плазмы, с гематокритным показателем 38,0±2,0 л/л на стандартную пластину поликапрана сопровождалось (в течение 10-15 минут после начала инкубации) формированием свертка, состоящего из однородной вязкой массы темно-коричневого цвета. Сверток с трудом разделялся на фрагменты при попытке его механического разрушения. Признаков гемолиза, ретракции, появления свободных эритроцитов в течении 2 часов отмечено не было. Волокна монокарбоксилцеллюлозы, пропитываясь жидкой частью крови, превратились в однородную структуру, включавшую фибрин и клеточные элементы. По-видимому, благодаря присутствию ε-АКК в составе Поликапрана лизиса фибрина и высвобождения третьей фракции не произошло. Угнетение фибринолиза и формирование жесткой структуры, состоящей из фибрина и клеточных элементов, фиксированных на матрице монокарбоксилцеллюлозы, определили механизм быстрого гемостатического действия препарата и преимущества его использования в качестве местного гемостатика по сравнению с ε-АКК.

Дефицит фактора VIII при гемофилии А пролонгирует первую фазу свертывания крови. При гемофилии А легкой степени (фактор VIII более 5%) свертывание крови и формирование сгустка наступают раньше, чем при средней (фактор VIII 5%-2%) и тяжелой форме заболевания (фактор VIII 1% и

менее). При выраженном дефиците VIII фактора образование гемостатически стойкой структуры на основе поликапрана наступило раньше (10-15 минута), чем завершилось свертывание в присутствии ?-АКК (30-ая минута и более). Заменяя медленно образующиеся нити фибрина, монокарбоксилцеллюлоза превратилась в жесткую матрицу, на которой впоследствии сформировался сгусток. Поэтому поликапран наиболее эффективен при легких формах заболевания и может использоваться в качестве самостоятельной монокомпонентной терапии. Потенцирование гемостатического эффекта поликапрана при тяжелой форме заболевания достигается предварительным введением пациенту соответствующей дозы препаратов, повышающих уровень плазменного фактора VIII до 5% и более, что ускоряет процесс свертывания крови.

Выбор местного гемостатика при гемофилии А, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре и после лечения острого лимфобластного лейкоза у детей определяется патогенетическим механизмом посткоагуляционных изменений при формировании сгустка. Местное использование поликапрана более оправдано, чем использование только одной ?-АКК.

#### Литература

1. Денисенко А.Г. Местная гемостатическая терапия при хирургической санации стоматологических больных с повышенным риском кровоточивости: Автореф. дис... канд. мед. наук:14.00.21 /Киев. мед. ин-т им. А.А.Богомольца. – Киев,1987. - 18 с.
2. Князев С.В. Патогенетические основы тактики стоматологического ведения больных гемофилией А: Автореф. дис... канд. мед. наук:14.00.21, 14.00.16. – М., 1994. - 22 с.
3. Лалаев К. В. Клинические и биологические аспекты применения препарата капрофера при неспецифических заболеваниях челюстно-лицевой области: (Эксперим. и клинич. исслед.) Автореф. дис... д-ра мед. наук:14.00.12, 14.00.15. – Ерев. гос. мед. ун-т им. Мхитара Гераци. - Ереван, 1995. - 57 с.
4. Лысенко С.И. Профилактика и патогенетическое лечение кровотечений после удаления зубов: Автореф. дис... канд. мед. наук: 14.00.21 /Киев. мед. ин-т им. А.А.Богомольца. –Киев, 1991. - 16 с.
5. Микрометод одновременного определения ретракции, спонтанного фивринолиза и гемостатических свойств кровяного сгустка /В.А.Бондарин и др. //Лаб. дело. – 1971, № 12. – С. 716-720.
6. Поликапран – местный гемостатик в гематологической практике. Средства и методы биоспецифической коррекции в гематологии и трансфузиологии /В.В.Большов и др. //4 съезд гематологов и трансфузиологов Белоруссии: Тез. докл. – Минск, 1988 – С. 17-18.
7. Поликапран – местный полифункциональный гемостатик в хирургической, гематологической и нейрохирургической практике /В.В.Большов, В.А.Климанский, Ю.Н.Андреев и др. //10 съезд хирургов Белоруссии: Тез. докл. – Минск, 1981 – С. 174-175.

8. Применение новых рассасывающихся материалов в хирургии поджелудочной железы / В.В.Большов и др. // Здоровоохранение Белоруссии.- 1978. – № 6. – С. 21-23.
9. Соболева О.И Профилактика некоторых стоматологических заболеваний и геморрагических осложнений у больных наследственными коагулопатиями: Автореф. дис... канд. мед. наук: 14.00.29 /Ленингр. НИИ гематологии и переливания крови –Л., 1990. - 23 с.
10. Якунина Л.Н. Современные принципы лечения кровотечений при гемофилии у детей //Педиатрия. – 1999. - № 2. – С. 78-82.