

Сергей Петрович Данников^{1✉}, Инна Эриковна Антонова², Андрей Николаевич Квочко³

^{1,2,3}Ставропольский государственный аграрный университет, Ставрополь, Россия

¹ds.as@mail.ru

²bolshova.inna@yandex.ru

³kvochko@yandex.ru

ОЦЕНКА СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ПРИЖИЗНЕННОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ЗАБРЮШИННОЙ ГЕМАТОМЫ

Цель исследования – изучить динамику показателей системы гемостаза у кроликов после прижизненного экспериментального моделирования забрюшинной гематомы. Объект исследования – 50 самцов кроликов породы Серый Великан, из которых сформированы опытная и контрольная группы по 25 особей каждая. Животным опытной группы под неингаляционным наркозом проводили прижизненное моделирование забрюшинной гематомы по разработанному нами способу, включающему отбор крови из ушной артерии с добавлением антикоагулянта и с последующим введением аутокрови в забрюшинное пространство. Животные контрольной группы подвергались только неингаляционному наркозу. Прижизненное экспериментальное моделирование забрюшинной гематомы у кроликов приводило к ряду значимых изменений в системе гемостаза, которые были наиболее выражены в первые 14 сут после проведения эксперимента. Международное нормализованное отношение (МНО) в опытной группе животных имело достоверно низкие значения по сравнению с контрольной только на 1-е, 3-и и 7-е сут, а активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) – на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сут после проведения эксперимента. В уровне фибриногена плазмы крови между животными опытной и контрольной групп достоверных отличий выявлено не было. Тромбиновое время (ТВ) у животных опытной группы достоверно выше только на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сут, а содержание D-димера оказалось достоверно больше во всех исследуемых сроках после проведения эксперимента в сравнении с контрольной группой животных. Наивысший уровень D-димера в плазме крови животных опытной группы регистрировался на 7-е сут и, вероятно, свидетельствовал о том, что при забрюшинных гематомах в это время происходят самые активные процессы фибринолиза. Низкие значения МНО в первые 7 сут и АЧТВ в первые 14 сут, а также удлинение ТВ в первые 14 сут после проведения эксперимента дают основания полагать, что при забрюшинных гематомах в эти сроки повышается порог вероятности тромбообразования.

Ключевые слова: система гемостаза, забрюшинная гематома, экспериментальное моделирование, кролики

Для цитирования: Данников С.П., Антонова И.Э., Квочко А.Н. Оценка системы гемостаза кроликов после прижизненного экспериментального моделирования забрюшинной гематомы // Вестник КрасГАУ. 2024. № 1. С. 157–162.

Sergei Petrovich Dannikov^{1✉}, Inna Erikovna Antonova², Andrey Nikolaevich Kvochko³

^{1,2,3}Stavropol State Agrarian University", Stavropol, Russia

¹ds.as@mail.ru

²bolshova.inna@yandex.ru

³kvochko@yandex.ru

THE HEMOSTASIS SYSTEM EVALUATION IN RABBITS AFTER LIFETIME EXPERIMENTAL MODELING OF RETROPERITONEAL HEMATOMA

The purpose of research is to study the dynamics of the hemostasis system in rabbits after intravital experimental modeling of retroperitoneal hematoma. The object of the study was 50 male rabbits of the Gray Giant breed, from which experimental and control groups of 25 individuals each were formed. Animals of the experimental group under non-inhalation anesthesia underwent intravital modeling of a retroperitoneal hematoma using a method we developed, including taking blood from the ear artery with the addition of an anticoagulant and subsequent injection of autologous blood into the retroperitoneal space. Animals in the control group were subjected to non-inhalational anesthesia only. Intravital experimental modeling of retroperitoneal hematoma in rabbits led to a number of significant changes in the hemostatic system, which were most pronounced in the first 14 days after the experiment. The international normalized ratio (INR) in the experimental group of animals had significantly low values compared to the control group only on the 1st, 3rd and 7th days, and the activated partial thromboplastin time (aPTT) – on the 1st, 3rd days, 7th and 14th days after the experiment. There were no significant differences in the level of fibrinogen in blood plasma between the animals of the experimental and control groups. Thrombin time (TT) in animals of the experimental group was significantly higher only on the 1st, 3rd, 7th and 14th days, and the D-dimer content was significantly higher in all studied periods after the experiment in comparison with the control group animals. The highest level of D-dimer in the blood plasma of animals in the experimental group was recorded on the 7th day and probably indicated that in retroperitoneal hematomas the most active processes of fibrinolysis occur at this time. Low values of INR in the first 7 days and aPTT in the first 14 days, as well as prolongation of TT in the first 14 days after the experiment, give reason to believe that with retroperitoneal hematomas, the threshold for the likelihood of thrombus formation increases during these periods.

Keywords: hemostasis system, retroperitoneal hematoma, experimental modeling, rabbits

For citation: Dannikov S.P., Antonova I.E., Kvochko A.N. The hemostasis system evaluation in rabbits after lifetime experimental modeling of retroperitoneal hematoma // Bulliten KrasSAU. 2024;(1): 157–162. (In Russ.).

Введение. Гемостаз охватывает строго регулируемые процессы свертывания крови, активации тромбоцитов и восстановления сосудов. После травмы система гемостаза задействует множество сосудистых и внесосудистых рецепторов, которые действуют совместно с компонентами крови, устраняя повреждения, нанесенные сосудистой сети и окружающим тканям [1].

Последствия нарушений системы гемостаза, как врожденных, так и приобретенных, часто представляют значительную проблему в диагностике и терапии. Логичное и эффективное лечение зависит: от правильной идентификации задействованных гемостатических компонентов; понимания сложных, тонко модулируемых взаимодействий различных систем ферментов / ингибиторов; знания механизма, с помощью которого различные, по-видимому, не связанные между собой патологические процессы могут ускорять нежелательные явления, такие как тромбоз, эмболия или кровотечение [2].

Фибрин играет важную роль в гемостазе как первичный продукт каскада свертывания и конечный субстрат для фибринолиза. На активность фибринолиза в значительной степени влияет структура сгустка, изоформы и полиморфизмы фибриногена, скорость образования тромбина, реактивность связанных с тромбом клеток (тромбоциты) и общая биохимическая среда. Регулирование фибринолитической системы, как и каскада свертывания, осуществляется широким спектром кофакторов, рецепторов и ингибиторов. Фибринолитическая активность может генерироваться либо на поверхности фибринсодержащего тромба, либо на клетках, которые экспрессируют профибринолитические рецепторы [3].

Забрюшинные гематомы у животных могут иметь разное происхождение и характер [4–7], при этом специфика их образования и действие на гомеостаз организма остаются малоизученными, а сведения об оценке динамики показа-

телей системы гемостаза при данной патологии в доступной литературе отсутствуют.

Цель исследования – изучить динамику показателей системы гемостаза у кроликов после прижизненного экспериментального моделирования забрюшинной гематомы.

Объекты и методы. Объектом исследования служили 50 самцов кроликов породы Серый Великан, из которых сформированы опытная (25 особей) и контрольная (25 особей) группы.

Животным опытной группы под неингаляционным наркозом проводили прижизненное моделирование забрюшинной гематомы по разработанному нами способу [8], включающему отбор крови из ушной артерии с добавлением антикоагулянта и с последующим введением аутокрови в забрюшинное пространство. Для этого животное фиксируют на операционном столе в боковом положении с подготовкой операционного поля в правой или левой поясничной области, после чего, отступив 2 см от поперечно-реберного отростка 3-го поясничного позвонка, проводят разрез кожи длиной до 1 см с последующим введением вращательно-поступательными движениями в операционную рану через внутреннюю косую брюшную мышцу под углом 45 градусов по отношению к остистым отросткам по направлению к брюшной полости канюли из хирургической стали с боковым отверстием размером G16 70 мм на глубину 3–4 см. Убедившись в правильности положения канюли по рентгенографии, вводят предварительно отобранную из ушной артерии аутокровь. Объем введенной аутокрови в забрюшинное пространство составлял 1,0 % от массы тела кролика.

Животные контрольной группы подвергались только неингаляционному наркозу.

Отбор проб крови у животных опытной и контрольной группы проводили натошак посредством венепункции подкожной вены предплечья в вакуумные пробирки фирмы «МиниМед» (Россия) с цитратом натрия (1 : 9) 3,8 % через 1, 3, 7, 14 и 28 сут после проведения эксперимента. После забора крови животных выводили из эксперимента.

Определение протромбинового времени (ПТВ) с получением международного нормали-

зованного отношения (МНО), а также активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), тромбинового времени (ТВ) и уровня фибриногена проводили на автоматическом анализаторе коагуляции крови серии СА-600 производства Sysmex (Япония) с помощью реактивов фирмы Siemens (Германия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением Ньюмена-Кейлса в программе Primer of Biostatistics 4.03. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Показатели системы гемостаза кроликов после прижизненного экспериментального моделирования забрюшинной гематомы представлены в таблице.

Протромбиновое время является одним из наиболее важных лабораторных тестов для определения функциональности системы свертывания крови. Он используется для диагностики заболеваний свертывающей системы крови, оценки риска кровотечения у пациентов, перенесших оперативные вмешательства, наблюдения за пациентами, получающими терапию пероральными антикоагулянтами, и оценки функции печени [9]. Международное нормализованное отношение (МНО) – это стандартизованный показатель протромбинового теста, который рассчитывается на основании протромбинового времени пациента, протромбинового времени нормы и международного индекса чувствительности [10]. При изучении МНО у кроликов после прижизненного экспериментального моделирования забрюшинной гематомы установлено, что на 1-е, 3-и и 7-е сут после проведения эксперимента этот показатель в опытной группе имеет на 15,55 %, 7,53 и 5,76 % соответственно достоверно более низкие значения по сравнению с контрольной группой. На 14-е и 28-е сут после проведения эксперимента достоверных различий МНО между опытной и контрольной группой уже не определяется. При сравнении МНО между сроками исследования после проведения эксперимента в опытной группе достоверных различий не выявлено, при этом значение данного показателя имеет тенденцию к повышению (табл.).

**Показатели системы гемостаза кроликов
после экспериментального моделирования абдоминальной гематомы**

Группа (n = 5)	Срок исследования после проведения эксперимента, сут				
	1	3	7	14	28
	M±m				
МНО, у. е.					
Контрольная	0,550±0,014	0,514±0,008	0,514±0,005	0,530±0,009	0,524±0,007
Опытная	0,476±0,004*	0,478±0,004*	0,486±0,007*	0,504±0,005	0,524±0,005
АЧТВ, с					
Контрольная	139,20±3,60	124,60±4,19	129,80±2,54	129,40±1,36	129,00±2,30
Опытная	91,20±1,46*	101,40±1,21*#	103,00±1,52*	109,40±1,63*	123,40±2,23#
Фибриноген, г/л					
Контрольная	3,080±0,045	3,420±0,234	3,386±0,097	2,652±0,137	3,076±0,179
Опытная	2,890±0,083	3,540±0,099#	3,716±0,034	2,710±0,097#	2,882±0,046
ТВ, с					
Контрольная	16,90±0,10	17,52±0,25	19,64±0,58	19,06±0,29	17,38±0,19
Опытная	23,40±0,66*	21,70±0,69*#	26,76±0,87*#	21,10±0,27*#	19,08±0,21#
D-димер, нг/мл					
Контрольная	41,0±1,9	43,6±1,5	53,0±1,6	71,8±2,8	41,2±7,0
Опытная	90,2±2,1*	167,2±3,9*#	250,2±4,9*#	140,4±4,1*#	122,6±7,5*#

Примечание: (*) – статистическая значимость различий (при $p < 0,05$) в идентичных сроках исследования у опытной группы по сравнению с контрольной; (#) – у каждого последующего срока исследования опытной группы по сравнению с предыдущим.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) может отражать дефицит следующих факторов: высокомолекулярный кининоген; прекалликреин; XII, XI, IX, VIII, X и V факторы; протромбин и фибриноген [11]. Анализируя АЧТВ у кроликов после прижизненного экспериментального моделирования абдоминальной гематомы выяснено, что значение данного показателя у опытной группы достоверно выше только на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сут после проведения эксперимента на 52,63; 22,88; 26,02 и 18,28 % соответственно по сравнению с контрольной группой. В опытной группе АЧТВ у экспериментальных животных достоверно удлиняется только с 1-х до 3-х сут (на 11,18 %) и с 14-х до 28-х сут (на 12,80 %).

Фибриноген и фактор XIII являются двумя важнейшими белками, которые непосредственно участвуют в образовании фибринового геля в качестве заключительного этапа последовательности реакций, запускаемых прокоагулянтным стимулом, а также, в дополнение к их гемостатической функции, влияют на врожденный иммунитет, клеточно-опосредованные реакции, такие как заживление ран, реакция на повреждение ткани или воспалительные процессы [12]. Содержание фибриногена в плазме крови кроликов после прижизненного моделирования

экспериментальной абдоминальной гематомы достоверно не изменяется по сравнению с контрольной группой. Однако в опытной группе значение этого показателя, имея волнообразную динамику, достоверно увеличивается с 1-х до 3-х сут после проведения эксперимента на 22,49 %, а с 7-х до 14-х сут – достоверно уменьшается на 37,12 %.

Тромбиновое время (ТВ) – это анализ свертываемости крови, который отражает превращение фибриногена в фибрин после добавления тромбинового реагента. Измерение свертываемости фибриногена и ТВ позволяет выявлять врожденные и приобретенные качественные и количественные нарушения фибриногена, которые могут привести к тромботическим явлениям или кровотечениям [13]. При оценке ТВ у кроликов после прижизненного экспериментального моделирования абдоминальной гематомы установлено, что значение данного показателя в опытной группе достоверно больше на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сут после проведения эксперимента – на 38,46; 23,86; 36,25 и 10,70 % соответственно по сравнению с контрольной группой. В опытной группе динамика изменения ТВ имеет волнообразный характер и с 1-х до 3-х сут после эксперимента достоверно уменьшается на 7,83 %; с 3-х до 7-х сут – достоверно воз-

растает на 23,32; с 7-х до 14-х сут – достоверно уменьшается на 26,82 и с 14-х до 28-х сут – вновь достоверно уменьшается на 10,59 %.

Низкие значения МНО в первые 7 сут и АЧТВ в первые 14 сут, а также удлинение ТВ в первые 14 сут после проведения эксперимента дают основания полагать, что при забрюшинных гематомах в эти сроки повышается порог вероятности тромбообразования.

D-димер представляет собой растворимый продукт разложения фибрина, который образуется в результате упорядоченного расщепления тромбов фибринолитической системой. Многочисленные исследования показали, что D-димер служит ценным маркером активации свертывания и фибринолиза [14]. При анализе уровня D-димера в плазме крови кроликов после прижизненного экспериментального моделирования забрюшинной гематомы выяснено, что значение данного показателя в опытной группе на 1-е сут после проведения эксперимента достоверно выше в 2,2 раза; на 3-е сут – в 3,84; на 7-е сут – в 4,72; на 14-е сут – в 1,96 и на 28-е сут – в 2,98 раза, чем в контрольной группе. В опытной группе животных уровень D-димера в плазме крови достоверно увеличивается с 1-х до 3-х сут на 85,37 % и с 3-х до 7-х сут – на 49,64 %, а затем достоверно уменьшается с 7-х до 14-х сут на 78,21 % и с 14-х до 28-х сут на 14,52 %. Наивысший уровень D-димера в плазме крови животных опытной группы регистрируется на 7-е сут и, вероятно, свидетельствует, что при забрюшинных гематомах в это время происходят самые активные процессы фибринолиза.

Заключение. Прижизненное экспериментальное моделирование забрюшинной гематомы у кроликов приводит к ряду значимых изменений в системе гемостаза, которые наиболее выражены в первые 14 сут после проведения эксперимента. МНО в опытной группе животных имеет достоверно низкие значения по сравнению с контрольной только на 1-е, 3-и и 7-е сут, а АЧТВ – на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сут после проведения эксперимента. В уровне фибриногена плазмы крови между животными опытной и контрольной группы достоверных отличий выявлено не было. ТВ у животных опытной группы достоверно выше только на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сут, а содержание D-димера оказалось достоверно больше во всех исследуемых сроках после проведения эксперимента в сравнении с контрольной группой животных.

Список источников

1. New fundamentals in hemostasis / H.H. Versteeg [et al.] // *Physiol Rev.* 2013. Vol. 93, № 1. P. 327–358.
2. Bick R.L., Murano G. Physiology of hemostasis // *Clin Lab Med.* 1994. Vol. 14, № 4. P. 677–707.
3. Chapin J.C., Hajjar K.A. Fibrinolysis and the control of blood // *Blood Rev.* 2015. Vol. 29, № 1. P. 17–24.
4. Diekstall M., Rijkenhuizen A. Mesorectal hematoma associated with colic and caudal neurological signs in a horse // *Pferdeheilkunde.* 2018. Vol. 34, № 3. P. 232–236.
5. Renal cell carcinoma in a stallion with hematuria and hemoperitoneum / M. Franz [et al.] // *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G: Grosstiere – Nutztiere.* 2006. Vol. 34, № 6. P. 397–398; 405–409.
6. Hepatosplenic T-cell lymphoma in a mare / P. Roccabianca [et al.] // *Veterinary pathology.* 2002. Vol. 39, № 4. P. 508–511.
7. Saetra T., Breuhaus B., Hildebran A. Unilateral nephrolithiasis with renal rupture in a horse // *Veterinary Education.* 2018. Vol. 30, № 12. P. 635–639.
8. Пат. № 2793527(13) С1 Российская Федерация МПК G09B 23/28 (2006.01) A61B 17/00 (2006.01) A61B 17/34 (2006.01). Способ прижизненного моделирования забрюшинной гематомы у кроликов / Данников С.П., Антонова И.Э., Скрипкин В.С., Квочко А.Н., Дилекова О.В.; заявитель Ставропольский гос. аграр. ун-т. № 2022121425; заявл. 05.08.2022; опубл. 04.04.2023, Бюл. № 10. 10 с.
9. Riley R.S., Rowe D., Fisher L.M. Clinical utilization of the international normalized ratio (INR) // *J Clin Lab Anal.* 2000. Vol. 14, № 3. P. 101–114.
10. Improving harmonisation International Normalized Ratio (INR): time to think outside the box? / E.J. Favaloro [et al.] // *Clin Chem Lab Med.* 2010. Vol. 48, № 8. P. 1079–1090.
11. Ignjatovic V. Activated partialthromboplastin time // *Methods Mol Biol.* 2013. Vol. 992. P. 111–120.
12. Hoppe B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation // *Thromb Haemost.* 2014. Vol. 112, № 4. P. 649–658.
13. Ignjatovic V. Thrombin clotting time // *Methods Mol Biol.* 2013. Vol. 992. P. 131–138.

14. Weitz J.I., Fredenburgh J.C., Eikelboom J.W. A Test in Context: D-Dimer // *J Am Coll Cardiol*. 2017. Vol. 70, № 19. P. 2411–2420.
8. Pat. № 2793527(13) C1 Rossijskaya Federaciya MPK G09B 23/28 (2006.01) A61B 17/00 (2006.01) A61B 17/34 (2006.01). Sposob prizhiznennogo modelirovaniya zabryushinnoj gematomy u krolikov / *Dannikov S.P., Antonova I.E., Skripkin V.S., Kvochko A.N., Dilekova O.V.*; заявитель Ставропол'sкий гос. аграр. ун-т. № 2022121425; заявл. 05.08.2022; опубли. 04.04.2023, *Byul.* № 10. 10 s.
9. *Riley R.S., Rowe D., Fisher L.M.* Clinical utilization of the international normalized ratio (INR) // *J Clin Lab Anal*. 2000. Vol. 14, № 3. P. 101–114.
10. Improving harmonisation International Normalized Ratio (INR): time to think outside the box? / *E.J. Favaloro* [et al.] // *Clin Chem Lab Med*. 2010. Vol. 48, № 8. P. 1079–1090.
11. *Ignjatovic V.* Activated partialthromboplastin time // *Methods Mol Biol*. 2013. Vol. 992. P. 111–120.
12. *Hoppe B.* Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation // *Thromb Haemost.* 2014. Vol. 112, № 4. P. 649–658.
13. *Ignjatovic V.* Thrombin clotting time // *Methods Mol Biol*. 2013. Vol. 992. P. 131–138.
14. Weitz J.I., Fredenburgh J.C., Eikelboom J.W. A Test in Context: D-Dimer // *J Am Coll Cardiol*. 2017. Vol. 70, № 19. P. 2411–2420.

References

1. New fundamentals in hemostasis / *H.H. Versteeg* [et al.] // *Physiol Rev*. 2013. Vol. 93, № 1. P. 327–358.
2. *Bick R.L., Murano G.* Physiology of hemostasis // *Clin Lab Med*. 1994. Vol. 14, № 4. P. 677–707.
3. *Chapin J.C., Hajjar K.A.* Fibrinolysis and the control of blood // *Blood Rev*. 2015. Vol. 29, № 1. P. 17–24.
4. *Diekstall M., Rijkenhuizen A.* Mesorectal hematoma associated with colic and caudal neurological signs in a horse // *Pferdeheilkunde*. 2018. Vol. 34, № 3. P. 232–236.
5. Renal cell carcinoma in a stallion with hematuria and hemoperitoneum / *M. Franz* [et al.] // *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G: Grosstiere – Nutztiere*. 2006. Vol. 34, № 6. P. 397–398; 405–409.
6. Hepatosplenic T-cell lymphoma in a mare / *P. Roccabianca* [et al.] // *Veterinary pathology*. 2002. Vol. 39, № 4. P. 508–511.
7. *Saetra T., Breuhaus B., Hildebran A.* Unilateral nephrolithiasis with renal rupture in a horse // *Veterinary Education*. 2018. Vol. 30, № 12. P. 635–639.

Статья принята к публикации 19.10.2023 / The article accepted for publication 19.10.2023.

Информация об авторах:

Сергей Петрович Данников¹, профессор кафедры физиологии, хирургии и акушерства, доктор биологических наук

Инна Эриковна Антонова², аспирант кафедры физиологии, хирургии и акушерства

Андрей Николаевич Квочко³, заведующий кафедрой физиологии, хирургии и акушерства, доктор биологических наук, профессор

Information about the authors:

Sergei Petrovich Dannikov¹, Professor at the Department of Physiology, Surgery and Obstetrics, Doctor of Biological Sciences

Inna Erikovna Antonova², Postgraduate student at the Department of Physiology, Surgery and Obstetrics

Andrey Nikolaevich Kvochko³, Head of the Department of Physiology, Surgery and Obstetrics, Doctor of Biological Sciences, Professor