

УДК 681.2.083; 004.422.81; 616.895.8

Разработка и апробация нового метода определения параметров гемостаза у больных с психической патологией**Development and Testing of New Method for Definitions Hemostasis Parameters in Patients with Mental Pathology**<https://doi.org/10.30629/2618-6667-2019-17-3-38-43>Черемных Е.Г., Фактор М.И., Карпова Н.С., Брусов О.С.
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, РоссияCheremnykh E.G., Faktor M.I., Karpova N.S., Brusov O.S.
FSBSI «Mental Health Research Centre», Moscow, Russia

38

Обоснование: гемостаз является одной из самых важных защитных систем организма, а его отклонения от нормы могут приводить к фатальным результатам. Изменения гемостаза наблюдаются при многих заболеваниях, в том числе и психических. Кроме того, параметры этой системы могут меняться при лечении антипсихотиками.

Цель работы: разработка и апробация нового метода и прибора оценки параметров плазменного гемостаза у больных с психическими заболеваниями для оптимизации лечения и исключения фатальных исходов.

Материалы и методы: в исследованиях использовали свободную от тромбоцитов (PFP) замороженную (–80 °C) плазму крови больных шизофренией (16 пациентов) при поступлении в клинику ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» и при выписке. Контрольная группа состояла из 6 условно здоровых доноров без информации о соматических заболеваниях. Оценка плазменной коагуляции больных и здоровых доноров осуществляли с помощью разработанного нами прибора. В основе оценки гемостаза лежит определение величины сгустка пропорционально яркости изображения, которое меняется в результате образования и лизиса сгустка.

Результаты исследования: при апробации метода и прибора на первом этапе определены оптимальные концентрации активаторов коагуляции и фибринолиза, а также концентрации ионов кальция. Медианные значения всех параметров коагуляции и фибринолиза больных при поступлении в клинику, кроме параметра «время до начала образования сгустка», снижены по сравнению с объединенной плазмой доноров. Скорости образования и лизиса сгустка у больных статистически значимо снижены при выписке по сравнению с этими параметрами при поступлении. Следовательно, эти параметры могут служить оценкой изменения состояния систем коагуляции и фибринолиза при лечении.

Выводы: при апробации прибора и метода в процессе исследования коагуляции и фибринолиза больных шизофренией выявлены более низкие уровни параметров по сравнению с параметрами этих систем у доноров, а также показано снижение активности плазменной коагуляции и фибринолиза при лечении антипсихотиками.

Ключевые слова: прибор для оценки гемостаза; изменения гемостаза; шизофрения; антипсихотики.

Для цитирования: Черемных Е.Г., Фактор М.И., Карпова Н.С., Брусов О.С. Разработка и апробация нового метода определения параметров гемостаза у больных с психической патологией. *Психиатрия*. 2019;17(3):38–43.

Конфликт интересов отсутствует

Introduction: hemostasis is one of the most important protective systems of the organism, and its deviations from the norm can lead to fatal results. Changes in hemostasis are observed in many diseases, including mental pathology. In addition, parameters of this system may also change during antipsychotic therapy.

Objective: Development and testing of a new method and device for estimating plasma hemostasis parameters in patients with mental pathologies in order to optimize treatment and eliminate fatal outcomes.

Materials and methods: in the study we used frozen (–80 °C) platelet-free blood plasma (PFP) samples from patients with schizophrenia (16 patients), taken at admission to the clinic FSBSI «Mental Health Research Centre». Plasma coagulation of patients and healthy donors was assessed with the device of our design. Hemostasis assessment is based on the determination of the clot size in proportion to the brightness of the image, which changes as a result of clot formation and lysis.

Results: optimal concentrations of coagulation and fibrinolysis activators, as well as concentrations of calcium ions were determined during the first stage of testing the method and device. The median values of all parameters of coagulation and fibrinolysis except «time before the formation of a clot» in patients upon admission to the clinic were reduced relative with combined plasma donors. The rates of clot formation and lysis in patients are significantly reduced at discharge compared with these parameters at admission. Consequently, these parameters can serve as an estimate of the change in the state of the coagulation and fibrinolysis systems during treatment.

Conclusion: during approbation of the device and method in the process of coagulation and fibrinolysis research in patients with schizophrenia, lower levels of parameters were detected compared to donors, and a decrease in the activity of plasma coagulation and fibrinolysis during treatment with antipsychotics was shown.

Keywords: device for assessing hemostasis; changes in hemostasis; schizophrenia; antipsychotics.

For citation: Cheremnykh E.G., Faktor M.I., Karpova N.S., Brusov O.S. Development and Testing of New Method for Definitions Hemostasis Parameters in Patients with Mental Pathology. *Psychiatry*. 2019;17(3):38–43.

There is no conflict of interest

ВВЕДЕНИЕ

Гемостаз — это система крови для обеспечения целостности организма при разрушении тканей с помощью создания «заплатки» — тромба. Образование тромба является двухэтапным процессом и начинается с образования тромбоцитарной пробки, затем подключается система плазменной коагуляции — каскадная протеолитическая система с многочисленными положительными и отрицательными обратными связями, а также плотными связями с ангиотензивной и калликреин-кининовой системами, компонентами иммунитета. Одновременно с коагуляцией начинается и разрушение тромба — фибринолиз, дабы сохранять текучесть крови для всего организма и не распространять коагуляцию в неповрежденных сосудах. Однако поскольку динамические системы — коагуляция и фибринолиз — имеют петли амплификации (усиление за счет положительной обратной связи), то в результате сбоя регуляторных механизмов могут происходить тяжелейшие осложнения: при гиперкоагуляции — синдром ДВС (диссеминированного внутрисосудистого свертывания), тромбоэмболия лёгочной артерии и ишемический инсульт, а при гипокоагуляции — геморрагический инсульт.

Такие осложнения могут происходить и без нарушения целостности сосудов из-за дисбаланса коагуляции и фибринолиза вследствие активации провоспалительных факторов или действия лекарств. Из литературных источников известно, что препараты для лечения шизофрении могут вызывать неоднозначное изменение гемостаза. Например, при длительном введении хлорпромазина наблюдалось увеличение волчаночноподобного антикоагулянта и, соответственно, увеличение тромбопластинового времени [1] из-за снижения уровня коагуляции. Клозапин и оланзапин увеличивают концентрацию прокоагулянтных факторов [2, 3]. Однако информация о непосредственном действии антипсихотиков на систему гемостаза фрагментарна, а эффективные методы определения уровня коагуляции и фибринолиза требуют значительных ресурсов [4].

Поэтому с целью получения объективных данных о плазменном гемостазе у больных с психическими заболеваниями нами разработан новый метод, позво-

ляющий надежно, быстро и с минимальными затратами определять жизненно важные параметры плазменного гемостаза. Метод основан на программной обработке изображения и включает разработанный нами управляемый компьютером прибор и оригинальные методики его применения. Для апробации разработки проведены исследования параметров гемостаза у больных шизофренией при лечении антипсихотиками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Объекты исследования. При апробации метода использовали свободную от тромбоцитов (PFP) замороженную (-80°C) плазму крови больных шизофренией (16 пациентов) без уточнения диагноза и без информации о применяемых препаратах. Известно лишь то, что все пациенты получали лечение антипсихотиками.

Контрольная группа состояла из 6 условно здоровых доноров без информации о соматических заболеваниях. Кровь доноров центрифугировали в двух режимах — при 200 g и затем при 10 000 g, получая плазму PFP. Соединяя равные количества плазмы доноров, получили объединенную плазму доноров (Pool_6). Все образцы замораживали при -80°C . Образцы размораживали непосредственно перед исследованием.

Метод и прибор. Оценку плазменной коагуляции и фибринолиза больных шизофренией и здоровых доноров осуществляли с помощью разработанного нами прибора. Прибор представляет собой автоматизированное устройство для перемещения планшета и видеокамеры с возможностью регулирования температуры внутри корпуса. Видеокамера последовательно фиксирует изображение заданных в опыте лунок 96-луночного планшета с плазмой и активаторами коагуляции и фибринолиза. Далее изображение передается в компьютер и обрабатывается программой для вычисления параметров гемостаза. В настоящее время прибор выполнен в макетном варианте.

В основе оценки гемостаза лежит определение величины сгустка пропорционально яркости изображения, которое меняется в результате образования и лизиса сгустка. В начале опыта в плазме без сгустка количество ярких точек на изображении минимально, при добавлении в цитратную плазму раствора кальция



Рис. 1/ Fig. 1. Изображения лунки с плазмой в процессах коагуляции и фибринолиза/Images of plasma wells in coagulation and fibrinolysis processes

происходит коагуляция плазмы, и уровень яркости изображения увеличивается. Если в реакционную смесь добавлен активатор фибринолиза, то по мере лизиса сгустка общая яркость изображения уменьшается. На рис. 1 показаны изменения изображения лунки с плазмой в процессах коагуляции и лизиса сгустка.

Эти изменения оценивает управляющая прибором программа, которая суммирует яркостные параметры каждой точки изображения лунки в единицах яркости (BU). Яркость представляет собой цифровую величину от 0 до 255, при этом 0 соответствует черному цвету, 255 — белому, а все остальные цифры определяют градации серого цвета. Результат оформляется в виде графика, отражающего процессы образования и лизиса сгустка (рис. 2).

Вычисляемые в этом методе параметры образования и лизиса сгустка:

- время до начала образования сгустка — лагфаза (LPh), в минутах (min);
- максимальная величина сгустка (Cg_{Max}), в единицах яркости (BU);
- максимальная скорость образования сгустка (VCg_{Max}), в единицах BU/min;
- максимальная скорость лизиса сгустка (VF_{Max}), в единицах BU/min.

Скорость образования и лизиса сгустка вычисляли как тангенс угла наклона прямых, проведенных через каждые три точки графика при увеличении сгустка и при его уменьшении, затем из всех значений скорости выбирали максимальные для коагуляции и фибринолиза.

Оценивали процесс образования и лизиса сгустка в плазме с активаторами коагуляции и фибринолиза. В качестве активатора коагуляции использовали лиофилизированный тромбопластин из набора ПГ-2 фирмы ООО НПФ Ренам, который разводили 5 мл дистиллированной воды (TS) в соответствии с инструкцией к набору, а в качестве активатора фибринолиза — аптечный препарат «Актилизе» (DA) фирмы Boehringer Ingelheim. Рекальцификацию плазмы осуществляли раствором $CaCl_2$ (Ca^{++}). Себестоимость расходных материалов на одно исследование меньше 10 руб.

Концентрацию активаторов и ионов кальция определяли на первом этапе исследования. Для апроба-

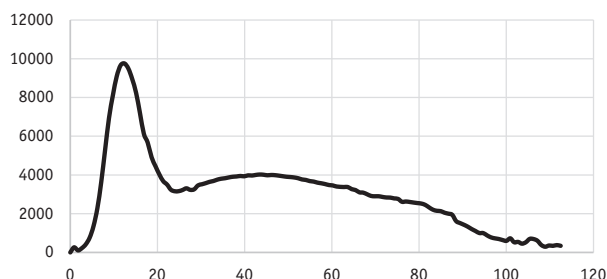


Рис. 2/ Fig. 2. Образование и лизис сгустка в объединенной плазме доноров/Clot formation and lysis in donor plasma

ции метода на втором этапе проводили исследования плазмы больных и доноров при выявленных условиях.

Статистическая обработка проведена с использованием программы Statistica 8.0. Поскольку когорта больных гетерогенна и результаты исследования не имеют нормального распределения, то для оценки статистической значимости отличий параметров, полученных при исследовании плазмы при поступлении в клинику, и параметров плазмы при выписке использовали непараметрический парный тест Вилкоксона с уровнем значимости $p < 0,005$. Для оценки взаимосвязи вычисляемых параметров, характеризующих образование и лизис сгустка, использовали корреляционный анализ по Спирману.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап — выявление условий исследования

Исследования *in vitro* являются моделями процессов, происходящих в организме. Главная цель при разработке новых методов — достижение наибольшей сопоставимости результатов опыта и состояния исследуемой системы организма. Эта цель достигается путем выявления наиболее значимых условий и концентраций добавляемых компонентов в исследовании. Для настоящего исследования такими параметрами являются активаторы коагуляции и фибринолиза, а также концентрация ионов кальция, поскольку ферменты каскадного процесса коагуляции зависят от ионов кальция. Все компоненты выбирали исходя из максимальных значений указанных четырех параметров, характеризующих плазменную коагуляцию и фибринолиз.

При определении оптимальных концентраций этих компонентов проводили оценку влияния разных концентраций одного из них при фиксированных значениях двух других. Оценку разных концентраций активаторов коагуляции, фибринолиза и влияния ионов кальция осуществляли на плазме, смешанной в равных количествах из образцов плазмы 6 доноров ($Pool_6$). Эту плазму в объеме 80 мкл вводили в лунки планшета, добавляли активаторы коагуляции, фибринолиза и раствор Ca^{++} .

В соответствии с критериями максимальных величин параметров образования и лизиса сгустка выявлен следующий состав для проведения исследования: в каждую лунку с 80 мкл плазмы добавляли 6 мкл TS, разведенного 1:1000; 20 мкл раствора DA разведенного 1:150; 15 мкл 0,00625M раствора Ca^{++} .

Второй этап — апробация разработанного метода

На втором этапе сравнивали образование и лизис сгустка в образцах плазмы 16 больных шизофренией при поступлении в клинику и при выписке, а также в образцах плазмы 6 доноров. При выбранных условиях исследования у 2 больных и 1 донора скорость фибринолиза VF_{Max} около нуля.

Таблица 1/Table 1

Параметры образования и лизиса сгустка у больных при поступлении в клинику (индекс 1) и при выписке (индекс 2)/The parameters of formation and lysis of the clot in patients upon admission to the clinic (index 1) and at discharge (index 2)

№	Cg _{Max} 1	Cg _{Max} 2	VCg _{Max} 1	VCg _{Max} 2	VF _{Max} 1	VF _{Max} 2	LPh1	LPh2
1	5801	7649	1432	1102	-279	-392	0,65	3,1
2	3145	2541	1269	478	-554	-46	4,9	9,3
3	14826	3918	3075	634	-607	-284	3,1	4,4
4	5061	5082	792	801	-123	-44	4	4,4
5	12655	13884	4080	3016	-850	-862	3,1	3,5
6	9192	10601	1017	982	-216	-172	2,2	2,7
7	11416	1949	2319	342	-1695	-207	4	5,7
8	3549	5703	776	1021	-317	-551	4	3,5
9	12112	10364	1725	1341	-765	-278	2,4	3,5
10	4063	2796	694	535	-302	-459	4,9	4,9
11	4913	4456	1215	1563	-673	-636	4,8	4,4
12	5085	8120	687	1000	-321	-882	4	4,9
13	11329	8538	1789	1317	-1006	-768	10,6	14
14	5169	662	1407	221	-388	-172	3,1	5,8
15	7277	5156	1710	1000	-670	-654	3,1	3,5
16	14425	2103	3131	419	-1403	-288	2,2	4,9
*М	6539	5119	1419,5	991	-580,5	-340	3,55	4,4

*М — медиана.

Для образца Pool₆ график образования и лизиса сгустка при выбранных условиях показан на рис. 2. Вычисленные параметры для этой плазмы: Cg_{Max} = 9758BU, VCg_{Max} = 2761 BU/min, VF_{Max} = -071 BU/min, LPh = 3,1 min. Знак «минус» при цифре скорости лизиса определяет уменьшение величины сгустка. Результаты исследования плазмы больных показаны в табл. 1.

Медианные значения всех параметров, кроме лаг-фазы LPh, при поступлении больных снижены по сравнению с объединенной плазмой доноров. При этом диапазон различия у больных параметра LPh1 при поступлении значителен — от 0,65 до 10,6 мин, при выписке диапазон различия LPh2 также велик — от 2,7 до 14 мин. Значения параметра Cg_{Max} у всех пациентов, кроме №5, снижены при выписке. Медианное значение Cg_{Max}2 снижено по сравнению с Cg_{Max}1 на 22%. Значения параметра VCg_{Max} и его изменение при выписке значительно варьируются, а медианное значение VCg_{Max}2 по сравнению с VCg_{Max}1 снижено на 31%. Скорость фибринолиза у 9 пациентов снижается при выписке, у 7 — выше или равной таковой при поступлении.

Коэффициенты корреляции по Спирману (R) для пар параметров при поступлении и выписке равны:

- Cg_{Max}1 vs VCg_{Max}1, R = 0,84, p < 0,0001;
- Cg_{Max}2 vs VCg_{Max}2, R = 0,82, p < 0,0001;
- Cg_{Max}1 vs VF_{Max}1, R = 0,57, p < 0,02;
- LPh1 vs LPh2, R = 0,65, p < 0,006.

Корреляция между максимумом сгустка и скоростью коагуляции и фибринолиза отдельно при посту-

плении и выписке является свидетельством того, что эти параметры объективно характеризуют индивидуальную оценку плазменного гемостаза. При сравнении этих параметров при поступлении и при выписке корреляция отсутствует, что может свидетельствовать о применении разных лекарственных препаратов и/или их различном воздействии на пациентов.

Критерий Вилкоксона для Cg_{Max}1 и Cg_{Max}2 Z = 2,6 при p = 0,008, для LPh1 и LPh2 Z = 3,03 при p = 0,002, что говорит о статистически значимом различии этих параметров гемостаза у больных при поступлении и при выписке, т.е. параметры коагуляции и фибринолиза изменяются при лечении антипсихотиками. Следовательно, эти параметры могут служить оценкой изменения состояния систем коагуляции и фибринолиза при лечении.

Как правило, при поступлении в клинику все больные имели опыт не одного года применения антипсихотиков, и весьма вероятно, это были разнообразные препараты, как типичные, так и атипичные антипсихотики. Поэтому параметры гемостаза этих пациентов и при поступлении, и при выписке отличаются от соответствующих параметров доноров. Эти параметры достоверно изменены при выписке по сравнению с результатами исследования при поступлении. У большинства пациентов изменения параметров гемостаза свидетельствуют об уменьшении активности плазменной коагуляции и фибринолиза. Эти изменения являются отражением уменьшения нейровоспаления при лечении антипсихотиками, но в то же время эти изменения

могут отражать и снижение защитных механизмов, так как плазменный гемостаз является активным участником противовоспалительной защиты организма. Поэтому своевременная и адекватная коррекция плазменного гемостаза поможет оптимизировать лечение и избежать неблагоприятных осложнений, а новый метод и прибор позволяют реализовать объективную оценку гемостаза. Кроме того, представленный прибор и программа управления позволяют оценивать не только гемостаз, но и функциональную активность системы комплемента сыворотки крови и токсичность лекарственных препаратов [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан прибор для автоматизации различных биологических методик, связанных с обработкой изображения, не только для оценки гемостаза, но и для определения функциональной активности системы комплемента и токсичности лекарственных препаратов.

При апробации разработки в процессе исследования коагуляции и фибринолиза больных шизофренией выявлены более низкие уровни параметров по сравнению с параметрами этих систем у доноров, а также показано снижение активности плазменной коагуляции и фибринолиза при лечении антипсихотиками.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Zarrabi MH, Zucker S, Miller F, et al. Immunologic and coagulation disorders in chlorpromazine-treated patients. *Ann. Intern Med.* 1979;91(2):194–199. DOI: 10.7326/0003-4819-91-2-194.
2. Carrizo E, Fernández V, Quintero J, et al. Coagulation and Inflammation Markers During Atypical or Typical Antipsychotic Treatment in Schizophrenia Patients and Drug Free First-degree Relatives Schizophrenia Research. 2008;103(1–3):83–93. DOI: 10.1016/j.schres.2008.03.004.
3. Masopust J, Malý R, Vališ Martin. Risk of venous thromboembolism during treatment with antipsychotic agents. *Psychiatry and Clinical Neurosciences.* 2012;66(7):541–552. <http://dx.doi.org/10.1111/pcn.12001>.
4. Брусков ОС, Матвеев ИА, Кириллов ПС и др. Оценка риска тромботических нарушений у больных шизофренией и шизоаффективными расстройствами в остром периоде болезни с использованием технологии «фибродинамика». *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С.Корсакова.* 2017;11:91–100. doi: [10.17116/jnevro20171171191-100](http://dx.doi.org/10.17116/jnevro20171171191-100) ID: 30765063. [Brusov OS, Matveev IA, Kirillov PS i dr. Risk assessment of thrombotic events in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder in the acute state: the «fibrinodynamics» technology. *Journal of neurology and psychiatry imeni S.S. Korsakova.* 2017;11:91–100. (In Russ.). [org/10.17116/jnevro20171171191-100](http://dx.doi.org/10.17116/jnevro20171171191-100) ID: 30765063].
5. Черемных ЕГ, Савин МВ, Растрига СН и др. Прибор для биологических исследований. Патент № Ru 2673745, 02.04.2018. [Cheremnyh EG, Savin MV, Rastriga SN i dr. Pribor dlya biologicheskikh issledovanij Patent № Ru 2673745, 02.04.2018. (In Russ.)].

Информация об авторах

Черемных Елена Григорьевна, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, лаборатория биохимии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия. ORCID 0000-0001-5166-4462

E-mail: elcher10@yandex.ru

Фактор Магнолия Иосифовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория биохимии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия. ORCID 0000-0003-4366-5558

E-mail: magnolia-faktor@mail.ru

Карпова Наталья Сергеевна, научный сотрудник, лаборатория биохимии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия. ORCID 0000-0003-2061-8097

E-mail: nat_karpova@mail.ru

Брусков Олег Сергеевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биохимии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия. ORCID 0000-0003-1269-679X

E-mail: oleg.brusow@yandex.ru

Information about the authors

Elena G. Cheremnykh, Cand. of Sci. (Technical), Senior Researcher, Laboratory of Biochemistry, FSBSI «Mental Health Research Centre», Moscow, Russia. ORCID 0000-0001-5166-4462

E-mail: elcher10@yandex.ru

Magnolia I. Faktor, PhD, Cand. of Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Biochemistry, FSBSI «Mental Health Research Centre», Moscow, Russia. ORCID 0000-0003-4366-5558

E-mail: magnolia-faktor@mail.ru

Natalia S. Karpova, Researcher, Laboratory of Biochemistry, FSBSI «Mental Health Research Centre», Moscow, Russia. ORCID 0000-0003-2061-8097

E-mail: nat_karpova@mail.ru

Oleg S. Brusov, PhD, Cand. of Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Biochemistry, FSBSI «Mental Health Research Centre», Moscow, Russia. ORCID 0000-0003-1269-679X

E-mail: oleg.brusow@yandex.ru

Автор для корреспонденции/Corresponding author

Елена Григорьевна Черемных/Elena G. Cheremnykh

E-mail: elcher10@yandex.ru

Дата поступления 19.07.2019

Date of receipt 19.07.2019

Дата принятия 10.09.2019

Accepted for publication 10.09.2019