

УДК 616-001.5-003.93:612.115

Особенности формирования, структурно-механические свойства фибрин-кровяного сгустка и его значение для регенерации кости при переломе

А. К. Попсуйшапка¹, В. А. Литвишко³, Н. А. Ашукина², З. Н. Данищук²

¹ Харьковская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины

² ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М. И. Ситенко НАМН Украины», Харьков

³ Чугуевская районная больница Харьковской области. Украина

The authors examined venous blood of three volunteers and determined the time of the formation (45–60 minutes) of a fibrin-blood clot in closed space in vitro, as well as they studied the effects of mechanical factors (pressure and mixing) on the rate of this formation. Dependence of the structure and mechanical properties of the formed fibrin upon the above factors was revealed. Histomorphological peculiarities of fibrin-blood clots, obtained from perifragmental regions in 12 cases with closed fractures of their extremities from 2 hours to 12 days after the injury, were studied. It was found out that poorly differentiated cells and fibroblasts entered the formed fibrin mesh on its periphery 2–4 hours after the fracture, and ingrowth of blood capillaries began. Reorganization of the clot was observed after 6–12 days.

Автори дослідили венозну кров трьох добровольців та визначили час утворення (45–60 хв) фібрин-кров'яного згустку в замкненому просторі in vitro, а також вивчили вплив на швидкість його формування механічних факторів (тиску та перемішування). Встановлено залежність структури та механічних властивостей сформованого фібрину від зазначених факторів. Вивчені гістоморфологічні особливості фібрин-кров'яних згустків, отриманих із навколівідламкових зон 12 постраждалих із закритими переломами кінцівок, у терміни від 2 год до 12 діб після травми. Виявлено, що через 2–4 год після перелому в утворену фібринову сітку по периферії проникають малодиференційовані клітини і фібробласти, починається вrostання кровоносних капілярів. Через 6–12 діб відмічена реорганізація згустку.

Ключевые слова: перелом, фибрин-кровяной сгусток, формирование, механические свойства, гистоморфологические особенности, реорганизация, пациенты

Введение

На роль фибрина как остеопластического материала указывал О. К. Хелимский [6]. В последние десятилетия появились работы, посвященные стимуляции репаративного остеогенеза высокими концентрациями аутотромбоцитов. Сегодня используют методики оптимизации регенерации кости с помощью плазмы [3] или аутогенного фибринового геля [2, 7, 8], обогащенного тромбоцитами. В последнем случае речь идет о фибрине, получаемом путем центрифугирования свежей венозной крови пациента и используемом для стимуляции у него же регенерации кости. Логично предположить, что образованный сразу после кровоизлияния фибрин

также должен обладать биологической активностью, которая определяет последующее течение репаративного процесса. Однако при этом возникает ряд вопросов, связанных с особенностями фибринообразования в замкнутом околоотломковом пространстве после перелома кости. Ранее мы показали, что именно фибрин-кровяной сгусток является предшественником периостального костного регенерата [5].

По своей сути фибриновый сгусток предназначен для выполнения механической функции — противодействия давлению крови. Он образуется в результате химических превращений растворимых молекул фибриногена плазмы крови в нерастворимые фибрин-полимерные комплексы. Это линейные

полимеры из нескольких молекул, соединенные между собой с помощью пептидных мостиков между боковыми радикалами лизина и глутамина и образующие сшитые между собой мононити, которые в свою очередь формируют прочную сеть, менее подверженную фибринолизу и устойчивую к нагрузкам. Таким образом, образовавшийся фибриновый сгусток — это трехмерная молекулярная сеть, в которой располагаются тромбоциты, эритроциты и лейкоциты [1]. Референтные интервалы показателей свертывания крови составляют 15 мин. Существуют также факты, которые указывают, что на скорость фибринообразования влияют механические факторы — взбалтывание, перемешивание, контакт плазмы с шероховатой поверхностью [4].

Цель работы: изучение особенностей формирования, структуры и механических свойств фибрин-кровяного сгустка, образовавшегося *in vitro* при действии механических факторов (давления и перемешивания), а также сгустков, сформировавшихся в околоотломковой зоне после перелома.

Материал и методы

Исследование проводили с венозной кровью здоровых добровольцев (возраст от 30 до 60 лет). Из кубитальной вены набирали шесть порций крови (по 3 мл) в шприцы объемом 5 мл так, чтобы в них не было пузырьков воздуха. Три порции были контрольными, их помещали на специально изготовленный стенд вертикально иглой вниз и оставляли в состоянии покоя. Канал иглы перекрывали.

Оставшиеся три порции подвергали механическому воздействию. Первый вариант такого воздействия заключался в создании поршнем шприца постоянного давления, примерно соответствующего систолическому давлению крови в артериальных сосудах — 120 мм рт. ст. В результате расчета определено, что такое давление может быть воспроизведено при приложении силы 10 Н (что соответствует 1,024 кг) на поршень шприца объемом 5 мл. Экспериментально установлено, что сила трения между поршнем и стенкой шприца составила 0,24–0,27 кг или 2,4–2,6 Н. Это сила, которую необходимо было приложить, чтобы поршень мог полностью переместиться при вертикальном положении шприца. Поэтому с учетом дополнительного сопротивления прилагали силу, равную 14,7 Н (1,5 кг). Для проведения экспериментов был изготовлен стенд, на котором фиксировали в вертикальном положении все шесть шприцев, давление в трех из них создавали путем подвешивания груза (рис. 1).

Второй вариант механического воздействия на кровь, находящуюся в шприце, предполагал созда-

ние эффекта ее перемешивания путем ритмичного ежеминутного переворачивания и покачивания шприца в течение первых двух часов эксперимента. Шприцы подвешивали на нить, подвергали маятникообразным колебаниям.

Состояние фибрин-кровяного сгустка (в соответствующей паре шприцев) оценивали через 30 мин, 3 и 24 ч после забора крови.

По истечению указанного времени поршень из шприца извлекали вместе с содержимым и помещали на лист миллиметровой бумаги. Оценивали визуально состояние крови или сгустка, его форму, измеряли размеры (площадь и высоту). После извлечения сгустков суточной давности регистрировали количество оставшейся сыворотки в шприце. Сгустки подвергали исследованию на деформацию одностороннего сжатия. Для этого изготовили специальное приспособление, состоящее из двух пластин из легкого материала (пенополистерола), способных перемещаться одна относительно другой по направляющим стойкам. Сгусток помещали между пластинами и оказывали на него поэтапное дозированное давление грузами. При этом регистрировали изменение его формы фотометрически (рис. 2).

Сгустки взвешивали сразу после исследования механических свойств и повторно после их высыхания на следующий день. Это позволяло определить количество жидкости, которое содержалось в сгустках на момент исследования механических свойств.

Третий вариант механического воздействия состоял в создании давления на кровь напряженной резиновой оболочкой. Для этого набирали в два шприца по 3 мл крови, которую тут же переливали в резиновые емкости (пальцевые части резиновой перчатки). Затем одну из емкостей завязывали нитью таким образом, чтобы кровь в ней оказалась под

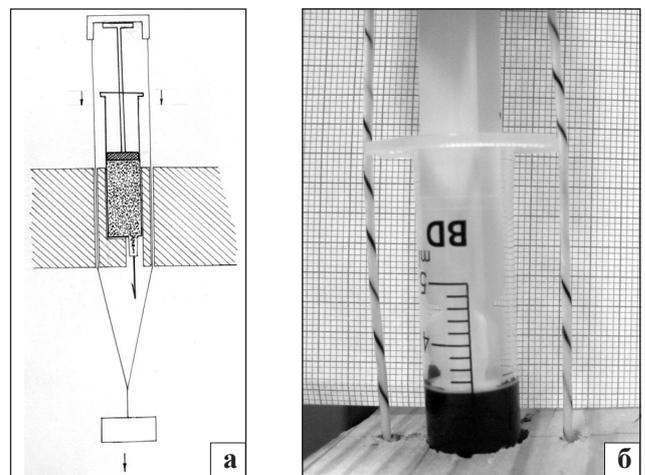


Рис. 1. Схема (а) и фото (б) стенда для фиксации шприцев с кровью и создания повышенного давления в них

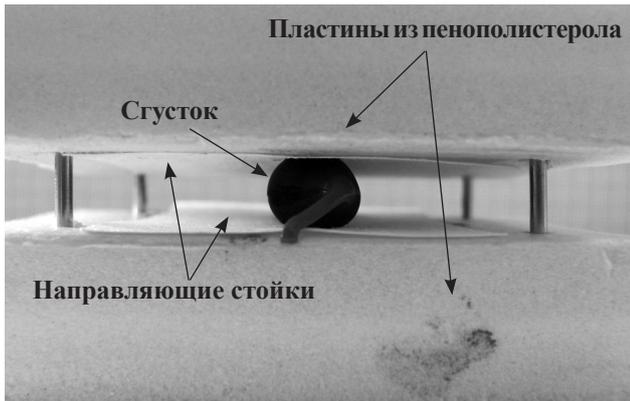


Рис. 2. Фото стенда для исследования фибрин-кровяного сгустка на одностороннее сжатие

повышенным давлением, созданным растянутой резиной, а вторую так, чтобы резиновая оболочка не была напряжена. Целью этой части эксперимента было проследить, изменяется ли давление в резиновом резервуаре при переходе жидкой крови в гелеобразное состояние. Объекты помещали на миллиметровую бумагу и измеряли их размеры фотометрически, что позволяло судить об изменении давления. Состояние фибрин-кровяного сгустка в резиновых оболочках оценивали через 24 ч после забора крови. Сгустки суточной давности подвергали гистоморфологическому исследованию. Для этого после фиксации в 10 % нейтральном формалине, обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации и спирте с эфиром (1:1) материал заключали в целлоидин. Изготовленные продольные и поперечные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизон.

У каждого из волонтеров кровь брали трижды. Первую серию порций крови (6) исследовали на влияние давления, вторую — перемешивания и третью — давления в резиновой оболочке. Всего было выполнено 9 экспериментов с использованием 39 порций крови.

Кроме этого, гистологическому исследованию подвергали фибрин-кровяные сгустки, полученные из околоотломковой зоны во время открытого сопоставления костных фрагментов у 12 пострадавших с закрытым переломом конечности. Сроки, прошедшие с момента травмы, у них составили от 2 ч до 12 суток.

Результаты и их обсуждение

Состояние крови через 30 мин после забора. После извлечения крови из шприцев на бумагу (парно контрольную и порцию, которую подвергали механическому воздействию) выявлено, что во всех случаях кровь сохраняла жидкое состояние,

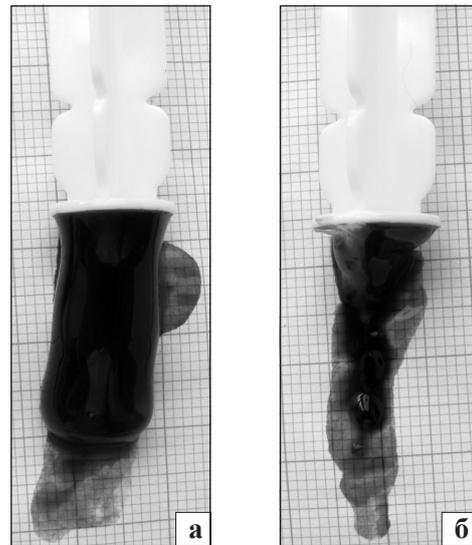


Рис. 3. Фото фибрин-кровяных сгустков, изъятых через 3 ч из шприца, находившегося в состоянии покоя (а) и подвергнутого перемешиванию (б)

при этом она образовывала лужицу площадью порядка 9–12 см². При следующем наблюдении за этими порциями вылитой крови установлено, что она превращалась в гелеобразный сгусток через 15–20 мин после извлечения из шприца.

Состояние крови через 3 ч после забора. Сразу же обратил на себя внимание тот факт, что спустя указанное время в шприце формируется фибрин-кровяной сгусток, который прикреплен к поршню и имеет форму мешочка студенистой консистенции. При этом основной закономерностью было то, что наиболее объемный и целостный сгусток мы получали в порциях, которые подвергали перемешиванию (рис. 3, а). Жидкий осадок в этом случае представлял собой осветленную (с малым количеством эритроцитов) сыворотку.

В порциях крови, находившихся в состоянии покоя и в покое под давлением, в эти сроки сгусток был значительно меньших размеров, не приобретал каплеобразную форму и легко разрушался при перемещении (рис. 3, б). Жидкая часть содержимого шприца при этом была представлена темной жидкостью, больше напоминавшую кровь.

Состояние сгустков крови через 24 ч. Отмечено разделение содержимого шприца на сформировавшийся фибрин-кровяной сгусток и сыворотку. После извлечения поршня из шприца во всех случаях сгусток был прикреплен к поверхности поршня, а его форма зависела от условий механического воздействия. В порциях, подвергнутых перемешиванию, сгусток имел цилиндрическую форму (рис. 4, а), а во всех остальных случаях — каплеобразную (рис. 5, а).

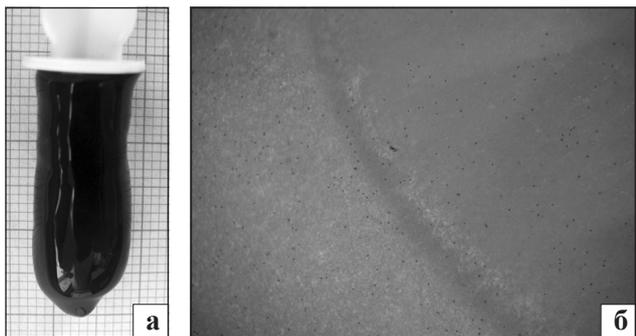


Рис. 4. Фото формы и микроскопического строения фибрин-кровяного сгустка, сформировавшегося при перемешивании крови (через 24 ч): а) общий вид; б) разнородная структура фибрина в поверхностном слое и центральной части сгустка, гематоксилин и эозин, ок. 10, об. 10

В процессе микроскопического исследования установлено, что по всей территории сгустка, образованного при перемешивании, располагалась сеть фибриновых волокон. Между ними находились преимущественно эритроциты, а также единичные лейкоциты. Однако отмечено, что ячейки фибриновой сети по периферии сгустка были мельче по сравнению с теми, которые формировались в центральной части (рис. 4, б). На некоторых участках

на поверхности плотного фибрина отмечали конгломераты тромбоцитов.

В сгустке, образованном в покое, в месте прикрепления к поршню толстые фибриновые волокна формировали крупноячеистую сеть, между ними располагались тонкие фибриновые волокна и единичные эритроциты (рис. 5, б). Аналогичной структуры была и тонкая оболочка, расположенная по периферии сгустка, которая, по всей видимости, и поддерживала его форму. На остальной территории сгустка обнаружены плотно упакованные эритроциты (рис. 5, в), между которыми было трудно дифференцировать фибриновые перегородки. Такую картину можно объяснить тем, что в покое происходило фракционирование плазмы и форменных элементов крови. Последние оседали, а плазма, оставаясь сверху, контактировала с шероховатой (активной) поверхностью поршня шприца. Естественно, фибриноген плазмы концентрировался вверху и превращался в фибрин, в результате чего именно здесь формировалась наиболее плотная фибриновая структура.

Результаты исследования фибрин-кровяных сгустков на деформацию одностороннего сжатия

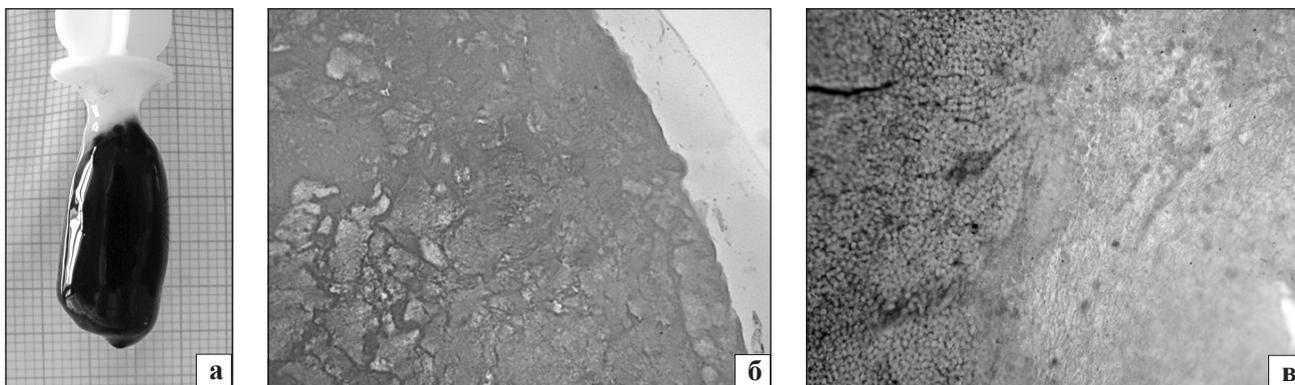


Рис. 5. Фото формы и микроскопического строения фибрин-кровяного сгустка, сформировавшегося в состоянии покоя (под давлением) (через 24 ч): а) общий вид; б) микроструктура фибрина в части, прилегающей к поршню, ок. 10, об. 4; в) микроструктура участка, расположенного вблизи поверхности сгустка. Граница перехода плотного слоя фибрина в фибрин-эритроцитарную часть сгустка, ок. 10, об. 10. Гематоксилин и эозин

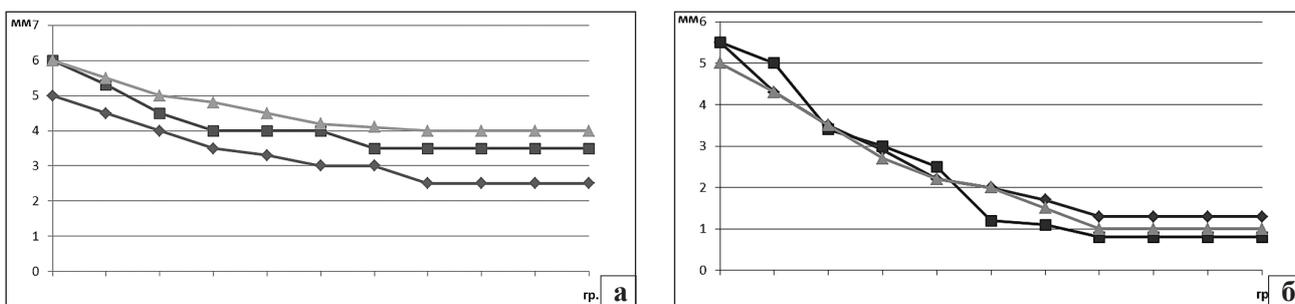


Рис. 6. Графики изменения высоты фибрин-кровяных сгустков под действием силы на сжатие: а) при перемешивании; б) в состоянии покоя

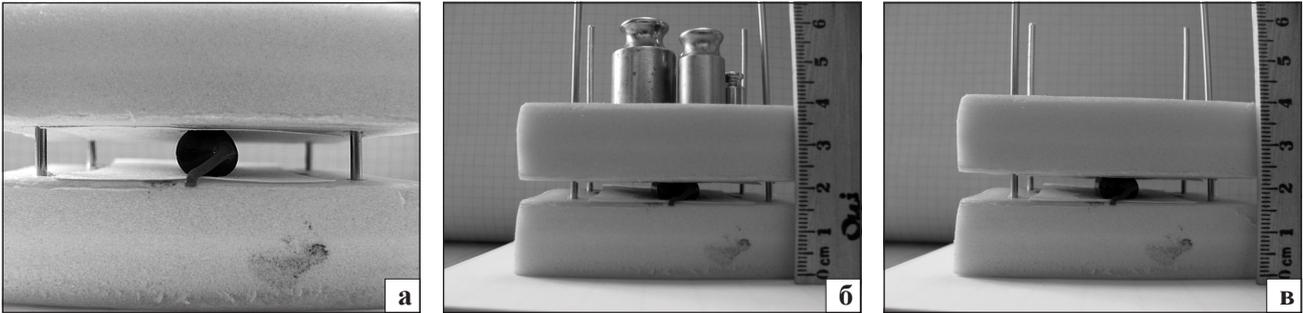


Рис. 7. Фото изменения формы фибрин-кровяного сгустка, образовавшегося в условиях перемешивания крови: а) без нагрузки; б) при нагрузке 100 г; в) после удаления нагрузки

представлены в виде графиков (рис. 6). На них видно, что сгусток наиболее интенсивно деформировался на начальных этапах ступенчатой нагрузки. В дальнейшем по мере увеличения силы степень его деформации существенно уменьшалась. Величина деформации сгустков, образовавшихся в покое, была значительно большей по сравнению с теми, которые формировались при перемешивании крови. Такая закономерность прослеживалась во всех трех экспериментах, где сравнивали свойства сгустка при образовании его в покое и при перемешивании. Действие давления в покое на кровь существенно не повлияло на механические свойства образованных сгустков по сравнению с контролем.

Важно отметить еще одну особенность механических свойств сгустка, сформированного при перемешивании. После удаления максимального силового воздействия форма фибрин-кровяного сгустка частично восстанавливалась (рис. 7). Это дает основание считать, что деформирование сгустка происходит по пластично-упругому типу — в начале действия силы он деформируется пластично, а при повышении внутреннего напряжения приобретает упругие свойства.

Особый интерес представляют данные о строении сгустков, полученных в резиновой оболочке. Выявлено, что через 24 ч после удаления резиновой оболочки, сгусток сохранял такую же округлую форму. Макроскопически на разрезе структура сгустка была неоднородной — по периферии располагалась полоса розового цвета, центральная часть была темно-красной (рис. 8). Микроскопически периферическая зона содержала эритроциты, между которыми образовался фибрин. Центральная часть была плотно заполнена эритроцитами.

*Гистоморфологическая структура фибрин-кровяных сгустков, изъятых из межотломковой зоны в первые сутки после перелома кости, была схожей с той, которую мы наблюдали *in vitro*. На гистопрепаратах определяли участки как плотно*

упакованных фибриновых волокон, так и сеть более тонких волокон с ячейками разного размера. Обращало на себя внимание наличие участков с преимущественно продольным расположением фибриновых волокон, а также формирование ячеек между волокнами округлой или овальной формы (рис. 9). При этом отмечено формирование сосудистых щелей округлой формы различного диаметра, который значительно превышал диаметр ячеек фибриновой сети. На гистопрепаратах капиллярные щели казались пустыми, что можно объяснить наличием в них жидкого содержимого, находящегося под определенным давлением.

В сгустках, полученных из межотломковой зоны через 2–4 суток после перелома, происходили изменения, которые характеризовались проникновением в фибриновую сеть фибробластов, располагающихся своей продольной осью параллельно фибриновым перегородкам, и образованием сосудов (рис. 10).

В результате дальнейшей реорганизации (6–12-е сутки) фибринового сгустка формировалась грануляционная ткань с высокой плотностью клеток (малодифференцированных, остеобластического и фибробластического ряда) и кровеносных сосудов капиллярного типа разного диаметра (рис. 11, а). Отмечены участки, на которых еще сохранились

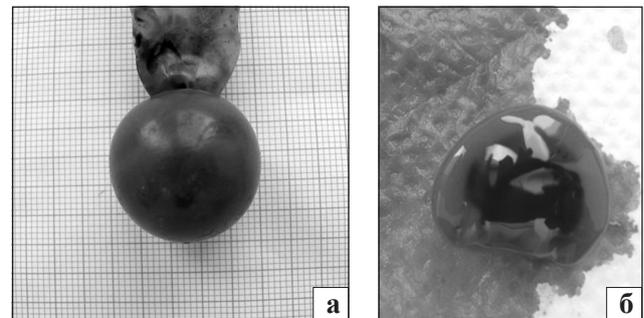


Рис. 8. Фото формы сгустка, образованного в резиновой оболочке под давлением через 24 ч после забора крови (а), сгусток в разрезе (б)

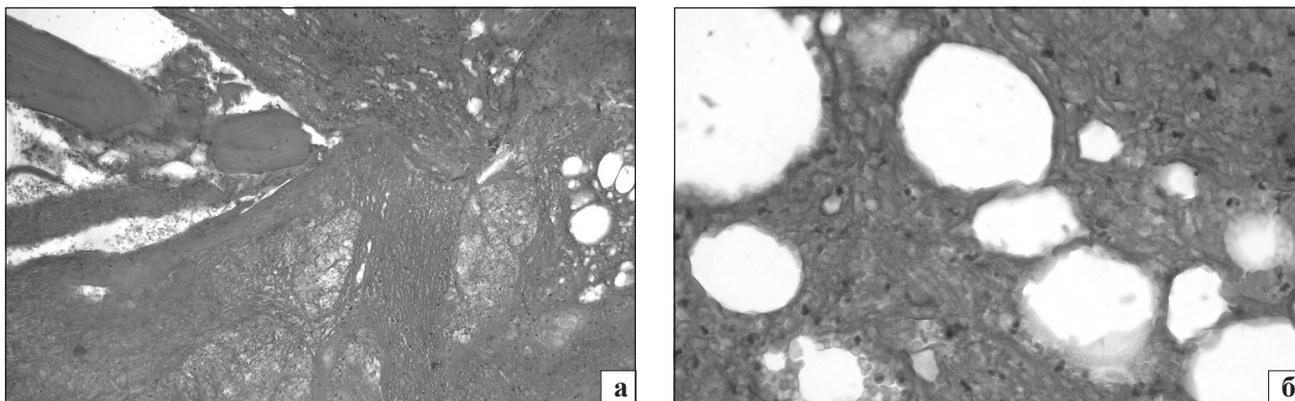


Рис. 9. Микрофото гистопрепаратов, 1-е сутки после травмы: а) участки с равнонаправленным расположением фибриновых волокон, ок. 10, об. 10; б) сосудистые щели разного диаметра, ок. 10, об. 40. Гематоксилин и эозин

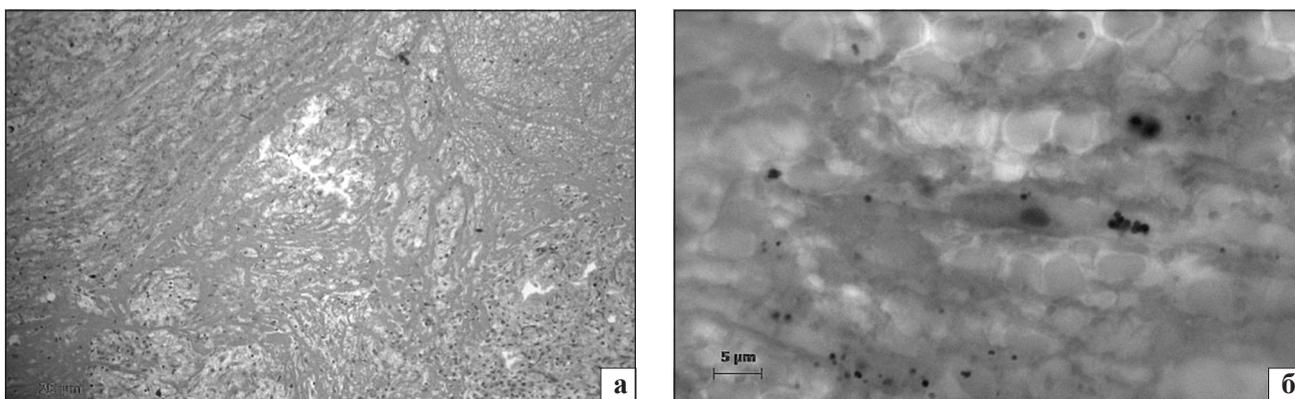


Рис. 10. Микрофото гистопрепарата. Фибриновый сгусток, изъятый во время открытого вправления отломков на 2-е сутки после диафизарного перелома плечевой кости: а) ок. 10, об. 10, б) ок. 10, об. 100. Гематоксилин и эозин

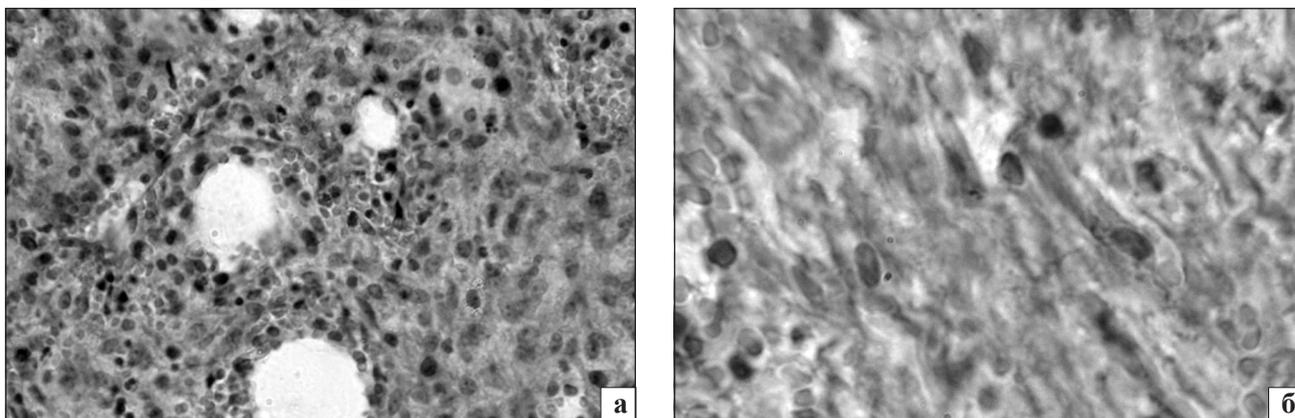


Рис. 11. Микрофото гистопрепарата. 10-е сутки после диафизарного перелома бедренной кости у больного 38 лет. Реорганизация фибринового сгустка: а) грануляционная ткань, ок. 10, об. 40; б) фибробласты, расположенные длинной осью вдоль фибриновых волокон, ок. 10, об. 100. Гематоксилин и эозин

фибриновые волокна, вдоль них своей длинной осью располагались клетки фибробластического ряда (рис. 11, б).

Проведенные эксперименты выявили ряд особенностей, характерных для фибринообразования в крови, находящейся в замкнутом пространстве, что важно для понимания процессов, происходящих в межтканевых гематомах.

Первая особенность состоит в том, что процесс образования сгустка в объеме крови занимает значительно больше времени, чем принято считать. Известно, что процесс коагуляции составляет от 4 до 12 мин. Вероятно, этот показатель зависит от объема крови, физических, механических и биологических факторов. Формирование фибринового сгустка как структурного образования

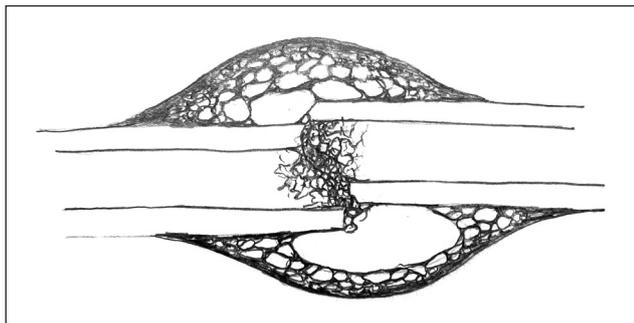


Рис. 12. Схематическое изображение структуры фибрина в межотломковом пространстве

в замкнутом пространстве (без контакта с воздухом) регистрируется, по нашим экспериментальным наблюдениям, через 45–60 мин после забора крови из сосудистого русла. На скорость фибринообразования оказывает влияние механическое воздействие в виде перемешивания крови.

Процесс свертывания крови начинается с высвобождения или активации тромбопластина. Установлено, что выделение тромбопластина тромбоцитами или активизация тромбопластина плазмы связаны с контактом крови с шероховатой поверхностью. Поверхность, покрытая силиконом, останавливает активацию тромбопластина, и свертывания плазмы не происходит [3]. В нашем исследовании это подтверждается тем, что сгусток прочно прикреплялся к шероховатой поверхности поршня. Между стенкой шприца и сгустком адгезии не было, что можно объяснить наличием силикона, входящего в состав пластика (для обеспечения эластичности и скольжения).

Результаты исследования показывают, что фибрин образует наиболее плотную ячеистую структуру по поверхности, на которой он начинает формироваться, далее его структура постепенно переходит в менее плотную с образованием больших ячеек. Таким образом, строение фибрина в замкнутом межотломковом пространстве можно представить следующим образом (рис. 12).

Характерно, что форменные элементы крови оказываются включенными в структуру сгустка, находясь между перемычками фибринового каркаса. Это дает основание предположить, что полимеризация фибрина происходит также на поверхностях эритроцитов и других форменных элементов крови.

Как видим, сам сгусток имеет форму и способен противодействовать нагрузкам. Под действием определенной нагрузки он подвергается пластично-упругому деформированию. Нуждается в пояснении установленный нами факт, что в условиях перемешивания крови сгусток формируется быстрее

и более устойчив к деформированию, о чем свидетельствует его форма и степень деформации при сжатии. Это можно объяснить строением фибринового каркаса. Кровь в состоянии покоя разделяется на две фракции, эритроциты и другие форменные элементы оседают, а плазма остается сверху. Поскольку основная часть фибриногена находится в плазме, его полимеризация происходит в этой части и главным образом на шероховатой поверхности поршня. Поэтому основная масса фибрина концентрируется в верхней части и при этом лишь его незначительная часть формирует оболочку, удерживающую форменные элементы. В этом случае кровянистая часть сгустка, вероятно, содержит тонкие внутренние перегородки, плохо контурируемые при световой микроскопии, что обуславливает его низкую механическую прочность.

При перемешивании крови сгусток также имеет внешнюю оболочку, состоящую из плотного фибрина, но кроме этого значительная часть фибрина находится внутри сгустка в виде ячеистой структуры. Причем это не просто сеть фибриновых волокон, как указывают авторы, а фибриновые мембраны, образующие замкнутые полости, в которых заключены эритроциты и сыворотка. Так, результаты взвешивания показали, что после перемешивания сгустки имели массу на 0,3–0,4 г больше, чем сгустки, образовавшиеся в покое. После высушивания их масса была одинаковой или незначительно отличалась. Именно с наличием замкнутых полостей, содержащих жидкое содержимое, мы связываем упругие свойства сгустка. Важно также и то, что нити фибрина со временем подвергаются ретракции, это приводит к повышению давления жидкости в ячейках, увеличивая внутреннее напряжение в самом фибрине.

Можно предположить, что во внутритканевом замкнутом пространстве наиболее интенсивное образование фибрина происходит на поверхностях отслоившихся тканей. По направлению к центру гематомы его плотность уменьшается, как представлено на рисунке (рис. 12).

Выводы

Фибрин-кровяной сгусток образовывается в замкнутом пространстве *in vitro* через 45–60 мин после взятия крови из вены.

На скорость образования сгустка и его механические свойства оказывает влияние эффект перемешивания крови в течение первых двух часов.

Образовавшийся фибрин-кровяной сгусток через 24 ч имеет определенную форму и обладает свойством упруго-пластичного деформирования.

Сгусток, полученный при перемешивании крови, в меньшей степени деформируется при сжатии по сравнению со сгустком, образованным в состоянии покоя. При перемешивании формируется сгусток с относительно равномерным распределением фибриновых перегородок и ячеек, заполненных форменными элементами крови и сывороткой, что обуславливает повышенную способность противодействовать силе сжатия.

Фибрин образует структуру с ячейками овальной или округлой формы. Его плотность по периферии более высокая, чем в центральной части.

Список литературы

1. Долгов В. В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В. В. Долгов, П. В. Свиринов. — Москва: «Триада», 2005. — 227 с.
2. Зубенко А. Г. Оптимізація перебігу репаративного остеогенезу при переломах великогомілкової кістки (експериментально-клінічне дослідження): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук / А. Г. Зубенко. — Київ, 2011. — 19 с.
3. Сочетанное использование остеопластики и обогащенной тромбоцитами плазмы в травматологии и ортопедии / И. А. Кирилова, Н. Г. Фомичев, В. Т. Подорожная, Ю. В. Эттейн // Травматология и ортопедия России. — 2008. — № 3 (49). — С. 63–67.
4. Маркосян А. А. Физиология свертывания крови / А. А. Маркосян. — М.: «Медицина», 1966. — 463 с.
5. Роль фибринового сгустка и механических напряжений в нем в процессе образования первичного костного регенерата при переломе кости / А. К. Попсуйшапка, В. А. Литвишко, Н. А. Ашукина, О. А. Подгайская // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2010. — № 3. — С. 22–27.
6. Хелимский О. К. Об остеопластических свойствах фибрина излившейся крови / О. К. Хелимский // Труды Ленинградского института травматологии и ортопедии. — 1956. — № 5. — С. 64.
7. Three dimensional architecture and cell composition of a choukroun's patelet-rich fibrin clot and membrane / Dohan Ehrenfest, M. D. Corso, A. Diss et al. // J. Periodontol. — 2010. — Vol. 81, № 4. — P. 546–555.
8. An opportunity in perio-implantology: the PRF (in French) / J. Choukroun, F. Abba, C. Schoeffler, A. Vervelle // Implantodontie. — 2001. — Vol. 42. — P. 55–62.

Статья поступила в редакцию 20.06.2013