

DOI: 10.15593/RZhBiomech/2019.1.04
УДК 616-005.1:616-001.36



**Российский
Журнал
Биомеханики**
www.biomech.ru

АДАПТАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ ДЛЯ ПРИКЛАДНОЙ МЕДИЦИНЫ КРИТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

М.М. Манцкава^{1,2,3}, Н.Г. Момцелидзе^{1,2}, Е.Э. Лабадзе², М.Н. Гоцадзе², Г.Т. Кучава²

¹ Департамент реологии и диагностическо-аналитических услуг Центра экспериментальной биомедицины, Грузия, 0160, Тбилиси, ул. Готуа, 14, e-mail: mantskavamaka@bk.ru

² Отдел инновационных методологий и клинических исследований Общества реологов, Грузия, 0161, Тбилиси, ул. Долидзе, 22, e-mail: biomedicine.med@gmail.com

³ Тбилисский государственный медицинский университет, Грузия, 0161, Тбилиси, ул. Важа Пшавела, 33

Аннотация. Целью работы было исследование агрегации эритроцитов как основного реологического параметра крови при экспериментальной кровопотере различной степени тяжести. Авторами был рассчитан коэффициент критерия Крускала–Уоллиса. Опыты проводили на белых беспородных крысах обоих полов. Животных распределяли по подгруппам в зависимости от степени тяжести кровопотери, в подгруппах исследовали индекс агрегации эритроцитов валидным методом текстурного анализа. В результате статистической обработки данных установили, что во всех подгруппах агрегация эритроцитов увеличивалась по сравнению с контролем, и это увеличение было более заметным при больших кровопотерях. Определение критерия Крускала – Уоллиса поможет обобщить и адаптировать экспериментальные данные для медицины критических состояний, сделать прогноз перехода одной стадии шока в последующую. Это повысит эффективность лечения больных с геморрагическим шоком.

Ключевые слова: агрегация эритроцитов, геморрагический шок, критерий Крускала – Уоллиса.

ВВЕДЕНИЕ

В этом году впервые за последние 200 лет уровень смертности населения планеты превысил уровень рождаемости. Наряду с другими причинами, вызывающими повышение коэффициента смертности населения, геморрагический шок заслуживает особого внимания. На фоне урбанизации техногенных катастроф, вызванных увеличенной вооруженностью планеты, войнами, природными катаклизмами, несмотря на хорошо известный алгоритм заместительной инфузионной терапии, коэффициент инвалидизации и летальности при этой патологии остается высоким.

Геморрагический шок является сложным патофизиологическим процессом с неизученным до конца механизмом. Кровопотеря приводит к сбою работы многих систем организма. Особенно сильные изменения наблюдаются в реологической системе организма. Нарушается текучесть крови, которая в основном связана с агрегируемостью эритроцитов. Существует множество экспериментальных и клинических работ, посвященных геморрагическому шоку, хотя до сегодняшнего дня в

© Манцкава М.М., Момцелидзе Н.Г., Лабадзе Е.Э., Гоцадзе М.Н., Кучава Г.Т., 2019

Манцкава Майя Михайловна, д.б.н., профессор, Тбилиси

Момцелидзе Нана Гогиевна, д.б.н., Тбилиси

Лабадзе Екатерина Эдуардовна, врач-реолог, Тбилиси

Гоцадзе Майя Николаевна, врач-реолог, Тбилиси

Кучава Георгий Тенгизович, врач-реолог, Тбилиси

современной литературе нет данных о воздействии на гемореологические свойства крови с точки зрения улучшения клиники течения болезни. Не существует способа подсчета вероятности перехода компенсаторной фазы геморрагического шока в некомпенсаторную, нет оптимизированного менеджмента геморрагического шока, который позволил бы предвидеть разные ситуационные изменения систем организма. Все это, несомненно, важно с точки зрения повышения эффективности лечения геморрагического шока. Имея такие данные, прогноз лечения больных с кровопотерями стал бы лучше.

Целью работы было исследование агрегации эритроцитов как основного реологического параметра крови при экспериментальной кровопотере различной степени тяжести. Авторами был рассчитан коэффициент вероятности наступления события по критерию Крускала–Уоллиса [1]. Высчитав критерий Крускала–Уоллиса, можно обобщить, трансформировать и адаптировать экспериментальные данные для медицины критических состояний, сделать прогноз перехода одной стадии шока в последующую.

Авторы надеются, что данная работа положит начало новой эре гемореологических исследований в области шока, где анализ малых рядов экспериментальных данных позволит предоставлять специалистам биомедицины значимые и актуальные выводы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на белых беспородных крысах обоих полов со средней массой 300 ± 23 г. Анестезию выполняли уретаном (*Purum*, Швейцария) (1 мл 20%-ного раствора уретана на 100 г, массы тела). Анестезия длилась 4 часа. Моделирование геморрагического шока разных стадий осуществляли стандартным методом [2, 3]. Животных распределяли по подгруппам в зависимости от степени тяжести кровопотери. I подгруппа – кровопотеря менее 8% от веса животного, в среднем 2,5 млг (I стадия шока); II подгруппа – кровопотеря 12–15% от веса животного (II стадия шока); III подгруппа – кровопотеря более 15% от веса животного. В каждой подгруппе находилось по четыре особи обоих полов. Контрольную группу составили 8 практически здоровых животных обоих полов. Для определения дополнительного критерия шока (кроме выраженности кровопотери) животным измеряли артериальное давление в хвостовой артерии с помощью манометра *MPX5050D* (*Motorola*). По рекомендации производителя в случае беспородных крыс измерялся усредненный показатель диастолического и систолического давления. Никаких фармакологических препаратов экспериментальным животным не вводили.

Воспроизводили полезную модель с помощью экспериментальной установки, предназначенной для моделирования геморрагической гипотензии. Задачей модели является исключение гемолиза эритроцитов при экспериментальной геморрагической гипотензии. Поставленная задача решалась так, что в устройстве, состоящем из колонки для сбора крови, соединенной со шприцем и манометром, был установлен воздушный клапан после колонки [4]. Лабораторно-экспериментальное исследование агрегации эритроцитов проводилось через 15 минут после кровопускания. Группу ложноотрицательных животных в эксперимент не вводили. В подгруппах измеряли коэффициент агрегируемости эритроцитов методом текстурного анализа на компьютерной установке *TAS-plus* (производитель – фирма *Lietz*, Германия). Для определения валидности методов, описывающих свойства эритроцитов, использовался аппарат *HUMACOUNT*, мод. *HUMACOUNT* (*Human GmbH*, Германия), приобретенный в рамках гранта *FR/420/7270/12*. Опираясь на данные, полученные путем исследования микрокапли крови аппаратом *HUMACOUNT*, оценивалась агрегация эритроцитов

оригинальными, созданными исследовательской группой авторов запатентованными методами [6, 7]. Для достижения главной цели работы был определен критерий Крускала – Уоллиса. Статистический анализ данных проводился стандартными подпрограммами *Origin 4.1. (Microcat Software Inc)* и *Microsoft Excel*. Условия проведения работы на животных соответствовали Европейской конвенции по защите экспериментальных животных, принятой в 1986 г. в Страсбурге [7], на проведение эксперимента было получено согласие Этического комитета организаций, на базе которых выполнена работа.

ЧИСЛЕННАЯ СТРУКТУРА МОДЕЛИ

В контрольных экспериментах индекс агрегации эритроцитов был равен 20,5. В зависимости от количества потерянной крови у животных средние значения индекса агрегации эритроцитов отличались друг от друга достоверно. Индекс агрегации эритроцитов животных в подгруппах приведен в таблице.

Значения индекса агрегации эритроцитов и среднее значение усредненного систолического и диастолического давления животных с экспериментальным геморрагическим шоком в зависимости от объема потерянной крови ($M \pm m$)

Параметр	Подгруппа											
	I				II				III			
Объем потерянной крови, мл	2,5				3,5				4,5			
Номер животного	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Индекс агрегации эритроцитов, %	17	16	20	21	23	22	24	23	33	29	32	28
Средний индекс агрегации эритроцитов, %	$18,5 \pm 2,38$				$23,0 \pm 0,80$				$30,5 \pm 2,38$			
Среднее давление, мм рт. ст.	75 ± 4				45 ± 7				23 ± 18			

В ранних работах авторов было описано, что именно увеличение агрегируемости эритроцитов вызывает нарушение кровотока при геморрагическом шоке и является ответственным за развитие критических ситуаций [3, 8]. Поэтому была исследована агрегация эритроцитов как необходимого и достаточного гемореологического маркера. Оказалось, что при экспериментальном геморрагическом шоке агрегируемость эритроцитов по сравнению с контролем нарушена. При этом чем больше кровопотеря, тем больше увеличение индекса агрегации эритроцитов.

Для достижения цели данной работы был рассчитан критерий Крускала – Уоллиса (обобщенный критерий Манна – Уитни) и упорядочены все значения агрегируемости эритроцитов по возрастанию. Также каждому значению присвоен ранг R – номер его места в упорядоченном ряду. Было два совпадающих значения, и им были присвоен общий ранг (слово «ранг» – это математический термин Крускала–Уоллиса, не путать с дефинициями «ранг стресса» и «ранг шока» в других работах авторов [9]), равный среднему из тех мест, которые эти величины делят между собой в общем упорядоченном ряду. Затем были вычислены суммы рангов, относящихся к каждой подгруппе, и для каждой подгруппы определен средний ранг.

Средние ранги были не близки друг к другу, это позволило констатировать, что межгрупповые различия реальны и связаны с разными уровнями кровопотери. Значение критерия Крускала – Уоллиса H является мерой такого расхождения средних рангов. При отсутствии межгрупповых различий средние ранги групп были близки, что указывало на гипотезу об отсутствии межгрупповых различий.

У авторов было всего три группы (I подгруппа, II подгруппа, III подгруппа). Опираясь на вышесказанное, построили ряды так, чтоб в верхней строке были расположены значения индекса агрегации эритроцитов, в нижней строке – ранги R . Ниже табличные данные представлены в виде совокупности рядов по подгруппам.

1) I подгруппа

Индекс агрегации эритроцитов	16	17	20	21
Ранг	1	2	3	4

2) II подгруппа

Индекс агрегации эритроцитов	22	22	23	24
Ранг	5,5	5,5	6	7

3) III подгруппа

Индекс агрегации эритроцитов	28	29	32	33
Ранг	8	9	0	1

Средний ранг R_1 в I подгруппе был равен 2,5; средний ранг R_2 в подгруппе II – 6; средний ранг R_3 в подгруппе III – 12. Средний ранг R для объединенной группы был равен 6. Затем нашли взвешенную сумму квадратов отклонений средних по группам от общего среднего D . Это прямой аналог межгрупповой вариации. $D = n_1 (R_1 - R) + n_2 (R_2 - R) + n_3 (R_3 - R)$, где R_1, R_2, R_3 – ранги подгрупп, R – ранг объединенной группы, n_1, n_2, n_3 – количество измерений в подгруппах. В нашем случае D было равно: $D_r = 4 \times (3,5) + 4 \times 0 + 4 \times 6 = 38$. В нашем случае Критерий Крускала – Уоллиса H был равен

$$H = \frac{12D}{N(N+1)} = \frac{12 \sum n(R - R_i)^2}{N(N+1)},$$

где N – число членов всех групп, R_i – средний ранг i -ой группы.

Суммирование в приведенной формуле производилось по всем группам. Далее было найдено критическое значение H . В случае трех групп приближение проводилось с помощью критерия χ^2 Пирсона. Это непараметрический метод, который позволяет оценить значимость различий между фактическим (выявленным в результате исследования) количеством исходов или качественных характеристик выборки,

попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. Выражаясь проще, метод позволяет оценить статистическую значимость различий двух или нескольких относительных показателей (частот, долей), пригоден, если численность каждой группы не меньше 5. Однако в каждой группе экспериментальных животных было по четыре особи.

Итак, для того чтобы понять, одинаково ли действие разных объемов кровопускания на показатель агрегации в разных группах, были объединены все параметры рядов, упорядочены по возрастанию. Совпадающим значениям рангов присвоили среднее между ними. При большом числе совпадающих рангов значение H

следует поделить на
$$\frac{\sum (\tau_i - 1)\tau_i i(\tau_i + 1)}{N(N^2 - 1)},$$
 где τ_i – число рангов в i -й связке, а

суммирование производится по всем связкам. Однако в работе было только одно совпадение. Был вычислен критерий Крускала – Уоллиса H , сравнено вычисленное значение H с критическим значением χ^2 для числа степеней свободы на единицу меньше числа групп. Так как вычисленное значение H оказалось больше критического, различия групп статистически значимы.

Усредненное систолическое и диастолическое давление в контрольной группе равнялось 85 ± 3 мм рт. ст. По мере увеличения кровопотери происходило логическое изменение давления. Мониторинг давления подчеркивал зависимость степени компенсации кровообращения от выраженности геморрагического шока. При малых кровопотерях артериальное давление было приближенным к нормальному, а далее уменьшалось по мере увеличения объема потерянной крови.

Кризис макро- и микрокровообращения при кровопотере имеет особый специфический характер. Количество агрегатов в крови играет определенную роль в магистральных артериях и особую главенствующую роль в микроциркуляторном русле. Циркулирующая в сосудах кровь негомогенна. Параболический профиль крови изменяется по мере уменьшения калибра сосудов [4]. Даже у здоровых млекопитающих и людей эритроциты в циркулирующей в организме крови более или менее хаотично склеиваются между собой, присоединяя разрозненные эритроциты, которые, соединяясь своими поверхностями, образуют монетные столбики – агрегаты (не конгломераты!). Агрегаты составляют 15–30% всей общей площади эритроцитов [4, 5]. Анализируя полученные данные, установили, что при кровопускании даже сравнительно маленьких объемов агрегация эритроцитов увеличивалась. Видимо, при кровопотере изменение агрегируемости сопряжено с включением компенсаторных реакций организма, и/или усиленная агрегация является основой для включения этого механизма. При увеличении объемов крови при кровопускании происходило дальнейшее усиление внутрисосудистой агрегации эритроцитов. Этот факт вызывает уменьшение скорости кровотока в микрососудах, вплоть до развития полного стаза крови, что заканчивается закупоркой всех открытых капилляров и исчезновением слепых, иногда на фоне неизменного перфузионного давления [5].

Полученные данные и расчет критерия Крускала – Уоллиса показали, что по мере увеличения объема потерянной крови усиливается нарушение агрегации эритроцитов с высокой достоверностью, и всегда в случае увеличения кровопотери обязательно происходит увеличение агрегируемости эритроцитов. С точки зрения эффективности лечения, несомненно, важно контролировать агрегацию эритроцитов при кровопотерях любого объема. Высокая точность расчетов и достоверность измерений дали возможность адаптировать экспериментальные данные. Если воспользоваться данным критерием как инструментом качественной оценки события, то можно определить индекс агрегации эритроцитов у пациента, вычислить

приближенный объем кровопотери, что особенно важно для эффективности лечения таких больных. Авторами впервые были предложены такие оптимизированные эксперименты, где число особей сравнительно невелико, но дает возможность точного прогнозирования предстоящих ситуаций. Для эффективности лечения больных очень важно знать, какое количество крови было потеряно пациентом до поступления в стационар. По известным причинам это не всегда можно установить. Если учесть, что изменения лабораторных гемодинамических показателей при шоковых ситуациях запаздывают во времени, то определение индекса агрегации эритроцитов очень важно с целью оценки кровопотери и для прогноза последующих явлений.

Авторы надеются, что исследования в этой области будут продолжены в мультидисциплинарном ракурсе. Трансформация экспериментальных данных при помощи математических функций является одним из инновационных и оптимальных методов исследования патофизиологических процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Только совместные фундаментальные исследования в области биомеханики, математической физиологии и реологии крови смогут пролить свет на механизм развития такого патофизиологического процесса, как геморрагический шок, и дать возможность адаптации экспериментальных данных для прикладной медицины критических состояний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. – М.: Физматлит, 2006. – 468 с.
2. Коваленко Н.Я., Мацеевский Д.Д. Сердечно-сосудистая система у крыс с различной устойчивостью к острой кровопотере // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1998. – № 32. – С. 36.
3. Манцкава М.М., Момцелидзе Н.Г., Давлианидзе Л.Ш. Новая классификация стадий геморрагического шока, основанная на изменении агрегации эритроцитов // Научная конференция Национального общества по изучению шока: материалы. – М., 2013. – С. 42.
4. Baskurt O., Neu B., Meiselman H. Red blood cell aggregation // Clinical research. – 2012. – Vol. 1. – P. 1–26.
5. Bishop J.J., Nance P.R., Popel A.S., Intaglietta M., Johnson P.C. Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules // American Journal of Physiology. – 2001. – Vol. 280, № 1. – P. 222–236.
6. Ctusъu D., Cruntu I.D., Rusu V. Study on erythrocyte aggregation using computerized image analysis methods // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. – 2013. – Vol. 117, № 3. – P. 801–805.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes, no. 123 of 18 March 1986 [ЭП]. – URL: <http://www.worldlii.org/int/other/COETSER/1986/1.html> (дата обращения: 15.01.2019).
8. Mantskava M., Momtselidze N., Davlianidze L. Blood rheological properties in blood loss (an experimental study) // Reanimatology. – 2014. – Vol. 10, № 5. – P. 27–32.
9. Mantskava M., Momtselidze N., Davlianidze L., Mitagvaria N. Hemorrhagic shock and stress. Cause and consequence of hemorheology disturbances on the example of the changes in erythrocyte aggregation // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2014. – Vol. 10, № 2. – P. 238–246.

ADAPTATIONS OF SOME EXPERIMENTAL DATA FOR APPLIED MEDICINE OF CRITICAL STATES

**M.M. Mantskava, N.G. Momtselidze, E.E. Labadze,
M.N. Gotsadze, G.T. Kuchava (Tbilisi, Georgia)**

The purpose of the work was research of erythrocyte aggregation as the main rheological blood parameter at experimental blood loss of varying degrees of heaviness. The authors calculated the Kruskal–Wallis criterion. Experiments were conducted on white outbred rats of both sexes. The animals were distributed over subgroups depending on degrees of heaviness of blood loss, in subgroups the erythrocyte aggregation index was investigated by a valid texture analysis method. As a result of statistical data processing, it was found out that in all subgroups the aggregation of erythrocytes increased compared to control and this increase was more evident at large blood loss. The definition of the Kruskal–Wallis criterion will help to generalize and adapt the experimental data for medicine of critical states to make a prediction of the transfer of the one shock phase to the next one. It will increase the efficiency of treatment of patients with hemorrhagic shock.

Key words: erythrocyte aggregation, hemorrhagic shock, criterion Kruskal–Wallis.

Получено 1 февраля 2019