

Влияние гемодилюции *in vitro* и *in vivo* на систему гемостаза

А. А. Кинзерский^{1*}, В. Т. Долгих², М. С. Коржук¹, Д. А. Кинзерская¹, С. В. Романенко¹

¹ Омский государственный медицинский университет Минздрава России
Россия, 644099, г. Омск, ул. Ленина, д. 12

² НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,
Россия, 10703, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

Effect of Hemodilution *in vitro* and *in vivo* on the Hemostatic System

Alexandr A. Kinzersky^{1*}, Vladimir T. Dolgikh², Mikhail S. Korzhuk¹,
Daria A. Kinzerskaya¹, Semyon V. Romanenko¹

¹ Omsk State Medical University, Ministry of Health of Russia,
12 Lenin Str., 644099 Omsk, Russia

² V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

Для цитирования: А. А. Кинзерский, В. Т. Долгих, М. С. Коржук, Д. А. Кинзерская, С. В. Романенко. Влияние гемодилюции *in vitro* и *in vivo* на систему гемостаза. *Общая реаниматология*. 2021; 17 (4): 48–64. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-4-1-0> [На русск. и англ.]

For citation: Alexandr A. Kinzersky, Vladimir T. Dolgikh, Mikhail S. Korzhuk, Daria A. Kinzerskaya, Semyon V. Romanenko. Effect of Hemodilution *in vitro* and *in vivo* on the Hemostatic System. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2021; 17 (4): 48–64. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-4-1-0> [In Russ. and Engl.]

Резюме

Цель исследования — определить в эксперименте, как гемодилюция раствором стерофундин/гелофузин (С/Г) в соотношении 2:1 влияет *in vitro* и *in vivo* на параметры системы гемостаза.

Материал и методы. Эксперименты провели на 75 крысах-самцах линии Wistar массой 270–380 г, наркотизированных тилетамин/золазепамом (40 мг/кг внутримышечно) + ксилазином (10 мг/кг внутримышечно). Животных разделили случайным образом на 4 группы: группа I — разведение образцов крови из сонной артерии С/Г *in vitro* на 25% ($n=12$), группа II — разведение крови *in vitro* на 37,5% ($n=11$), группа III — разведение *in vivo* на 25% ($n=10$), группа IV — контрольная ($n=42$) — без разведения. На первом этапе исследования сравнивали группы разведения *in vitro* с контрольной группой и между собой, на втором этапе — группу разведения *in vivo* сравнивали с контрольной группой. Для оценки влияния гемодилюции исследовали параметры низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ), тестов по оценке свертывания крови и общего анализа крови.

Результаты. При гемодилюции на 25% *in vitro* и *in vivo* С/Г в соотношении 2:1 изучаемые параметры системы гемостаза не выходили за рамки референсных границ, но *in vitro* отмечали тенденцию к усилению интенсивности ферментативного этапа свертывания и значимое усиление полимеризации сгустка по причине относительной недостаточности антикоагулянтов. Разведение крови *in vitro* на 37,5% значительно сокращало в крови количество фибриногена и тромбоцитов, ингибировало интенсивность протеолитического этапа свертывания, уменьшало плотность тромба в точке желирования ТЗ, на 5-й минуте после ее достижения и максимальную амплитуду (МА) кривой НПТЭГ, а также значительно уменьшало антикоагулянтную активность крови. Выявленные изменения параметров системы гемостаза значительно выходили за границы референсных значений. Показано, что при разведении *in vivo* на 25% значения показателя плотности тромба отрицательно коррелировали с интенсивностью контактной коагуляции (величина отрицательная), а при разведении *in vitro* на 37,5% эти значения положительно коррелировали также и с количеством тромбоцитов и содержанием фибриногена.

Заключение. Гемодилюция раствором С/Г в соотношении 2:1 на 25% по объему минимально изменяет параметры гемостаза *in vitro* и является относительно безопасной для системы гемостаза.

Ключевые слова: крысы линии Wistar; дилуционная коагулопатия; низкочастотная пьезотромбоэластография; свертывание крови

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Адрес для корреспонденции:

Александр Анатольевич Кинзерский*
E-mail: kinzerskij@mail.ru

Correspondence to:

Alexandr A. Kinzersky*
E-mail: kinzerskij@mail.ru

Summary

The aim of the study was to determine experimentally the effect of hemodilution by the 2:1 sterofundin/gelifusine (SG) solution on hemostatic parameters *in vitro* and *in vivo*.

Material and methods. Experiments were carried out on 75 male Wistar rats weighing 270–380 g and anesthetized with intramuscular tiletamine-zolazepam (40 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg). Animals were divided randomly into 4 groups: Group 1 — *in vitro* 25-percent dilution of carotid blood samples by the SG solution ($n=12$), Group 2 — *in vitro* 37.5-percent dilution of similar samples ($n=11$), Group 3 — *in vivo* 25-percent dilution ($n=10$), Group 4 — the controls ($n=42$) with no dilution. The first stage of the study compared the *in vitro* dilution groups with the control group and with each other; the second stage compared the *in vivo* dilution group with the control group. The parameters of low-frequency piezoelectric thromboelastography (LF-PTEG), clotting tests and complete blood count were studied to evaluate the effect of hemodilution.

Results. At a 25-percent hemodilution with 2:1 CG solution *in vitro* and *in vivo*, the hemostatic parameters remained within the reference limits, but a trend to increased intensity of the enzymatic reactions of the coagulation cascade and a significant increase in clot polymerization *in vitro* due to relative anticoagulant deficiency became evident. *In vitro* 37.5-percent blood dilution significantly reduced the blood level of fibrinogen and platelet count, inhibited the intensity of the proteolytic stage of coagulation, reduced the clot density at the T3 gelation point, at 5 minutes after reaching it and the maximum amplitude (MA) of the LFPTEG curve, as well as significantly reduced anticoagulant activity of the blood. The observed changes in hemostatic parameters were significantly outside the reference limits, which may affect the interpretation of the experimental results and be clinically important. We found negative correlation between clot density and platelet activity at 25-percent dilution *in vivo*, whereas at 37.5-percent dilution *in vitro* an additional positive correlations between platelet count and fibrinogen levels were determined.

Conclusion. A 25-percent hemodilution with 2:1 CG solution should be considered «safe» for the *in vivo* hemostatic system providing minimal effect on the *in vitro* parameters in the experiment.

Keywords: Wistar rats; dilutional coagulopathy; low-frequency piezoelectric thromboelastography; blood coagulation

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

DOI:10.15360/1813-9779-2021-4-1-0

Введение

На догоспитальном этапе пациентам с тяжелой травмой в состоянии травматического шока [1, 2] необходима малообъемная инфузионная поддержка до момента доставки в стационар и окончательной остановки кровотечения [3]. Цель малообъемной инфузии — попытка избежать избыточного подъема артериального давления и усиления кровотечения, а также развития дилуционной коагулопатии [4, 5]. Объем инфузии на догоспитальном этапе не должен превышать 1000–1500 мл или 20% объема циркулирующей крови [3]. Введение большего объема инфузионных сред у пациентов с артериальной гипотензией после травмы может увеличивать потребность в гемотрансфузии по прибытии в стационар [4, 6], а отсутствие инфузии способствует росту летальности [7]. Оптимальным уровнем систолического артериального давления (САД) на догоспитальном этапе рекомендовано считать 80–90 мм рт. ст., а у пациентов с сочетанной черепно-мозговой травмой — более 90 мм рт. ст. [3].

Выбор инфузионной среды также является ключевым вопросом. Известно, что коллоидные кровезаменители, в частности, производные гидроксипропилкрахмала (ГЭК), способны влиять на структуру формирующегося тромба,

Introduction

In prehospital patients with severe trauma and traumatic shock [1, 2], low-volume fluid therapy is necessary until hospitalization and ultimate control of bleeding [3]. The purpose of low-volume fluid therapy is to avoid excessive blood pressure rise and increased bleeding, as well as to prevent dilutional coagulopathy [4, 5]. Prehospital fluid volume should not exceed 1,000–1,500 ml or 20% of circulating blood volume [3]. Administration of a larger volume of fluids in hypotensive post-trauma patients may increase the need for blood transfusion on arrival to the hospital [4, 6], while lack of fluid therapy associates with increased mortality [7]. The optimal pre-hospital systolic blood pressure (SBP) is suggested to be kept at 80–90 mm Hg level, whereas in patients with traumatic brain injury it should exceed 90 mm Hg [3].

The choice of fluid is also a key issue. The colloidal blood substitutes, such as hydroxyethyl starch (HES) products, can affect the structure of the developing clot, cause platelet dysfunction and renal damage [8]. For this reason, the role of colloids in the current fluid therapy guidelines has been greatly reduced in favor of balanced salt solutions combined with a minor volume of colloids, such as gelatine preparations. The 2:1 or 1.5:1 salt/gelatine ratio is considered to be the safest and

вызывать дисфункцию тромбоцитов и повреждение почек [8]. По этой причине в современных рекомендациях по инфузионной терапии доля коллоидов значительно уменьшена, и выбор сделан в пользу солевых сбалансированных растворов, сочетающихся с небольшим количеством коллоидов, в частности, препаратами желатина. Соотношение солевой раствор/препарат желатина 2:1 или 1,5:1 признано наиболее безопасным и оптимальным по влиянию на систему гемостаза [3, 9]. Безопасность применения производных желатина обусловлена тем, что гемодилюционная коагулопатия, вызванная 20–40% разведением крови препаратами желатина, обратима при трансфузии сред, содержащих фибриноген, что недостижимо при использовании ГЭК [9, 10].

Если в клинической практике существуют разработанные алгоритмы и схемы лечения, то в экспериментальной хирургии таких стандартов нет, объем инфузионной поддержки определяется эмпирически и зависит от вида экспериментального животного, выбранной инфузионной среды или соотношения сред и моделируемой патологической ситуации [11, 12]. В литературе имеются противоречивые данные: описано нарушение свертывания крови у животных уже при 7–50% гемодилюции кристаллоидами и 5–10% — коллоидами [13, 14]. Результаты подобных исследований зависят как от уровня технического оснащения, так и чувствительности метода исследования. Таким образом, остается открытым вопрос «безопасного» для системы гемостаза инфузируемого объема сбалансированного кристаллоидного и коллоидного раствора (препарата желатина) в соотношении 2:1 в эксперименте.

Одним из перспективных методов оценки системы гемостаза, который применяется в различных областях хирургии, является низкочастотная пьезотромбоэластография (НПТЭГ) [15, 16]. Данный метод позволяет количественно оценить параметры свертывающей и противосвертывающей системы крови от момента активации тромбоцитов до фибринолитического разрушения сгустка. Эта методика не использовалась для изучения дилуционной коагулопатии у травмированных пациентов, но может быть полезна ввиду своей высокой чувствительности для раннего выявления дилуционных нарушений свертывания крови.

Учитывая, что способ выполнения НПТЭГ был адаптирован для экспериментальных животных (крыс) [17, 18], нами поставлена цель — определить в эксперименте как гемодилюция раствором стерофундин/гелофузин (С/Г) в соотношении 2:1 влияет *in vitro* и *in vivo* на параметры системы гемостаза [19]. Полученные данные позволят выбрать оптималь-

optimal in terms of the effect on the hemostasis system [3, 9]. Safety of gelatine preparations is explained by the fact that hemodilution coagulopathy caused by 20–40% dilution of blood with gelatine preparations is reversible upon infusion of fluids containing fibrinogen, which is not feasible when using HES [9, 10].

While in clinical practice well-developed algorithms and treatment regimens exist, there are no such standards in experimental surgery; the volume of fluid therapy is determined empirically and depends on the type of experimental animal, the selected fluid or simulated condition [11, 12]. The literature data are conflicting; blood coagulation disorders have been described in animals at 7–50% hemodilution with crystalloids, and 5–10% dilution with colloids [13, 14]. The results of such studies depend on both the level of technical equipment and sensitivity of the research method. Thus, the search for an optimal volume of a balanced 2:1 crystalloid-colloid (gelatine preparation) intravenous solution which could be «safe» for the hemostatic system in an experiment remains relevant.

The low-frequency piezoelectric thromboelastography (LFPTEG) is one of the promising methods of hemostasis assessment, which is used in various surgical areas [15, 16]. This method allows quantitative assessment of blood coagulation and anti-coagulation systems from the moment of platelet activation until fibrinolytic clot destruction. This technique has not been used to study dilutional coagulopathy in trauma patients but might be useful due to its high sensitivity for early detection of dilutional clotting disorders.

This method has already been modified for use in experimental animals (rats) [17, 18]; our aim was to determine experimentally the effect of hemodilution with 2:1 sterofundin/gelofusine (SG) solution on hemostatic parameters *in vitro* and *in vivo* [19]. The obtained data will enable to choose the optimal volume of fluid therapy when modeling a particular pathological condition in experimental animals without any significant risk of affecting the hemostatic parameters.

Materials and Methods

The experiments were performed on 75 male Wistar rats weighing 270–380 g, anesthetized with tiletamine/zolazepam (40 mg/kg intramuscularly) + xylazine (10 mg/kg intramuscularly) at the Department of Pathological Physiology, Omsk State Medical University. The study was performed according to the requirements of the European Convention for the Protection of Experimental Animals (86/609/EEC, 1986) and the World Society for the Protection of Animals (WSPA), as well as the current legislation of the Russian Federation [20]. During the experiment, the animals were kept normothermic (37°C) by warming with an infrared lamp and fixed to the operating table. The animals were randomly divided into 4 groups: in group 1, blood samples from the carotid artery were diluted by

ный объем инфузионной терапии при моделировании того или иного патологического процесса у экспериментальных животных без риска значимо повлиять на параметры системы гемостаза.

Материал и методы

Эксперименты провели на 75 крысах-самцах линии Wistar массой 270–380 г, наркотизированных тилетамин/золазепамом (40 мг/кг внутримышечно) + ксилазином (10 мг/кг внутримышечно) на базе кафедры патологической физиологии Омского государственного медицинского университета. Исследование выполнили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (86/609/ЕЕС; 1986) и Всемирного общества защиты животных (WSPA), а также действующим законодательством РФ [20]. Во время эксперимента у животных поддерживали нормотермию (37°C) согреванием инфракрасной лампой, а также выполняли фиксацию к операционному столу. Животных случайным образом разделили на 4 группы: в I группе образцы крови из сонной артерии *in vitro* разводили С/Г на 25% ($n=12$), во II группе — на 37,5% ($n=11$), в III группе — разводили *in vivo* на 25% ($n=10$), в IV группе разведение не выполняли ($n=42$). На первом этапе исследования сравнивали параметры системы гемостаза между I, II и IV группой, а на втором этапе — между III и IV группой.

Для оценки влияния гемодилюции *in vitro* и *in vivo* С/Г на систему гемостаза исследовали параметры НПТЭГ, клоттинговых тестов и общего анализа крови (ОАК). НПТЭГ выполняли на отечественном приборе АРП-01М «Меднорд» (ООО «Меднорд-Техника», Россия) с информационной компьютерной системой (ИКС) «Гемо-3». Параметры ОАК: показатель гематокрита и количество тромбоцитов оценивали на автоматическом гематологическом анализаторе ABX Micros ES 60 (Horiba Medical, Япония). Параметры коагулограммы: уровень фибриногена и значение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), протромбинового времени (ПВ), тромбинового времени (ТВ), активность антитромбина III (АТ III) определяли на полуавтоматическом коагулометре Thrombotimer 4 (Behnk Elektronik, Германия) и на автоматическом анализаторе коагуляции крови Sysmex CA 600 (Sysmex Europe GmbH, Германия) соответственно. В I и II группе оценивали только концентрацию фибриногена и активность АТ III. В исследовании использовали реактивы фирмы ООО «Технология-Стандарт» (Россия).

Запись кривых НПТЭГ осуществляли по авторской методике [17, 18]. В настройках ИКС использовали дельту для принятия точки максимальной, равную 1, и время ожидания подъема кривой — 20 минут. Начало графиков не приводили к одному уровню, а расчет плотности сгустка (ПС) выполняли по формуле: $ПС=A_n-A_0$, где n — необходимая точка времени. Оценивали следующие стандартные величины НПТЭГ: время контактной коагуляции (T_1 , мин.), интенсивность контактной коагуляции (ИКК, величина в норме отрицательная, измеряемая в относительных единицах, о. е.), время достижения константы тромбиновой активности (T_2 , мин), кон-

25% with SG *in vitro* ($n=12$), in group 2 — by 37.5% ($n=11$), in group 3 the blood was diluted by 25% *in vivo* ($n=10$), while in group 4 no dilution was performed ($n=42$). The first stage of the study compared the parameters of the hemostasis system between groups 1, 2 and 4, and the second stage — between groups 3 and 4.

To assess the effect of *in vitro* and *in vivo* hemodilution by SG solution on the hemostasis system, the parameters of LFPTEG, clotting tests and complete blood count (CBC) were studied. LFPTEG was performed on ARP-01M apparatus «Mednord» («Mednord-Tekhnika», Russia) device with the Hemo-3 computer-based information system. Blood count parameters such as hematocrit and platelet count were measured using the automatic hematology analyzer ABX Micros ES 60 (Horiba Medical, Japan). Coagulation parameters including fibrinogen level and activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT), antithrombin III (AT III) activity were determined using a semi-automatic coagulometer Thrombotimer 4 (Behnk Elektronik, Germany) and automatic blood coagulation analyzer Sysmex CA 600 (Sysmex Europe GmbH, Germany), respectively. In groups 1 and 2, only fibrinogen level and AT III activity were evaluated. The reagents manufactured by Technologia-Standart Company (Russia) were used in the study.

The LFPTEG curves were recorded according to an original technique [17, 18]. In the software settings, we used a delta for taking the maximum point equal to 1 and the time to curve rise equal to 20 minutes. The starting areas of the plots were not adjusted to the same point, and clot density (CD) was calculated using the formula: $CD=A_n-A_0$, where n is the required time point. The following standard values of LFPTEG were assessed: contact coagulation time (T_1 , min), contact coagulation intensity (CCI in relative units (r. u.) (normally negative value), time to reach thrombin activity constant (T_2 , min), thrombin activity constant (TAC, r. u.), blood clotting time (T_3 , min), coagulation drive intensity (CDI, r. u.), clot polymerization intensity (CPI, r. u.), fibrin-platelet structure formation time (T_5 , min), maximum clot density (MA, r. u.), total blood clotting intensity (TBCI, r. u.), retraction and lysis of clot intensity (RLCI, %), total anticoagulation activity coefficient (TAAC, r. u.). Besides the standard LFPTEG values, the temporal and structural changes in clot formation using the clot density at minutes 0, 5, 10, and 15 (CDT_3 , CDT_3+5 , CDT_3+10 , CDT_3+15) from the moment of reaching the gelation point by the curve (T_3) which corresponds to the clotting time [21].

Blood sampling was performed 20 minutes after surgical access and placement of a 24G fluorinated ethylene propylene (FEP) catheter in the left carotid artery, when the effect of surgical exposure of the neurovascular bundle on systemic hemodynamics was neutralized. Blood exfusion was performed within 1 minute after preliminary flushing the catheter with 300 L of 0.9% sodium chloride solution. Blood dilution *in vitro* and *in vivo* was performed with 2:1 SG solution. The dilution solution was added to the test tube immediately before the study. *In vivo* 25% dilution was performed according to the following procedure. Through a 24G FEP catheter placed in the right femoral vein, 16 ml of dilution solution was injected at a rate of 1 ml/min, while blood was simultaneously drawn from the left carotid artery at a rate of 0.3 ml/min for 16 min. Systolic blood pressure (SBP) was

станту тромбиновой активности (КТА, о. е.), время свертывания крови (T_3 , мин), интенсивность коагуляционного драйва (ИКД, о. е.), интенсивность полимеризации сгустка (ИПС, о. е.), время формирования фибрин-тромбоцитарной структуры (T_5 , мин), максимальную плотность сгустка (МА, о. е.), интенсивность тотального свертывания крови (ИТС, о. е.), интенсивность ретракции и лизиса сгустка (ИРЛС, %), коэффициент суммарной противосвертывающей активности (КСПА, о. е.). Кроме стандартных показателей НПТЭГ, определили временно-структурную динамику тромбообразования по плотности сгустка на 0-й, 5-й, 10-й и 15-й минуте ($ПСТ_3$, $ПСТ_3+5$, $ПСТ_3+10$, $ПСТ_3+15$) от момента достижения кривой НПТЭГ точки желирования T_3 , соответствующей времени свертывания [21].

Забор крови осуществляли через 20 минут после хирургического доступа и установки катетера из фторэтиленпропилена диаметром 24 G в левую сонную артерию, когда нивелировалось влияние хирургического выделения сосудисто-нервного пучка на системную гемодинамику. Эксфузию крови выполняли в течение 1 минуты после предварительного промывания катетера 300 мкл 0,9% раствора натрия хлорида. Разведение крови *in vitro* и *in vivo* осуществляли раствором С/Г в соотношении 2:1. Добавление разводящего раствора в пробирку осуществляли непосредственно перед исследованием. Разведение *in vivo* на 25% выполняли по следующей методике. Через катетер из фторэтиленпропилена диаметром 24 G, установленный в правую бедренную вену, вводили 16 мл разводящего раствора со скоростью 1 мл/мин с одновременным забором из левой сонной артерии со скоростью 0,3 мл/мин крови в течение 16 мин. Каждые 5 минут контролировали систолическое артериальное давление (САД) и после разведения определяли содержание лактата крови.

Для оценки параметров НПТЭГ кровь без консерванта забирали в течение 8 секунд шприцем в следующем объеме: I группа — 0,3 мл, II группа — 0,25 мл, III и IV группа — 0,4 мл. Разведение *in vitro* перед исследованием осуществляли добавлением в кювету раствора С/Г в соотношении 2:1 у I группы 0,1 мл и у II группы — 0,15 мл.

Для ОАК кровь забирали в микрокювету с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) у I группы 0,15 мл, II группы — 0,125 мл, III и IV группы в объеме 0,2 мл. Разведение *in vitro* перед исследованием осуществляли добавлением раствора С/Г у I группы 0,05 мл и 0,075 мл — у II группы.

Для исследования параметров коагулограммы кровь забирали в объеме 0,9 мл с 0,1 мл 3,8% раствора цитрата натрия. После перемешивания крови с консервантом у I группы к 0,75 мл крови, у II группы — к 0,625 мл добавляли 0,25 мл и 0,375 мл раствора С/Г. У III и IV группы забор крови осуществляли в объеме 4,5 мл шприцем с 0,5 мл 3,8% цитратом натрия. Перед исследованием параметров коагулограммы все образцы крови центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин.

Так как количество наблюдений в каждой группе было небольшим, то для анализа результатов исследования применили непараметрические методы статистики. Для сравнения нескольких групп по множеству зависимых переменных применили непа-

монitored every 5 minutes and blood lactate levels were determined after dilution.

To evaluate the LFPTEG parameters, the following volumes of blood were drawn for 8 seconds using a syringe without anticoagulant: group 1 — 0.3 ml, group 2 — 0.25 ml, group 3 and group 4 — 0.4 ml. The pre-test *in vitro* dilution was performed by adding the following volumes of 2:1 SG solution to the cuvette: in group 1 — 0.1 ml, in group 2 — 0.15 ml.

Blood for CBC was collected in a microcuvette with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in the following volumes: group 1 — 0.15 ml, group 2 — 0.125 ml, and groups 3 and 4 — 0.2 ml. The pre-test *in vitro* dilution was performed by adding 0.05 ml (group 1) and 0.075 ml (group 2) of SG solution.

To study coagulation parameters, 0.9 ml of blood were drawn in a syringe containing 0.1 ml of 3.8% sodium citrate solution. After adding the preservative to blood, 0.25 and 0.375 mL of SG solution were added to 0.75 ml of blood in group 1 and to 0.625 ml of blood in group 2. In groups 3 and 4, 4.5 ml blood was collected in a syringe containing 0.5 ml of 3.8% sodium citrate. All blood samples were centrifuged for 15 min at 3000 rpm before the measurement of coagulation parameters.

Since the number of observations in each group was small, we applied nonparametric statistical methods to analyze the study results. Nonparametric multivariate M. J. Anderson permutational analysis (perMANOVA) was used to compare several groups on multiple dependent variables. The p-level correction for multiple pairwise comparisons of the groups was performed using the Benjamini–Yekutieli method. To clearly demonstrate the differences between the groups for all compared parameters, we used the principal coordinate method with the construction of an ordinal diagram and the principal component method with a graph. The nonparametric Kruskal–Wallis analysis of variance was performed to elaborate the differences between independent groups on the compared variables. Mann–Whitney test with the Bonferroni correction for multiple comparisons was used for pairwise comparisons for each variable between the independent groups. Spearman's rho test was used for correlation analysis. Statistical analysis of the results was performed using R programming language designed for statistical data processing and graphical representation [22]. Baseline data were entered into Microsoft Excel 2010 tables, and then tables in txt format were imported into RStudio, a free and open-source software development environment for the R programming language. In addition to the basic statistical packages, the packages «ggplot2», «ggpubr», «rstatix», «gridExtra», «cowplot», «ade4», «vegan», «ellipse» were installed and used. The packages «ade4» and «vegan» were used to perform perMANOVA, as well as principal component analysis and its visualization. The packages «ggplot2», «ggpubr», «rstatix», «gridExtra», «cowplot» were used to construct graphs. The «Hmisc» and «ellipse» packages were used for correlation analysis.

Results and Discussion

Nonparametric multivariate analysis of variance revealed a significant effect of blood dilution with SG solution *in vitro*, indicating that groups 1, 2, and 4 were not identical in the compared param-

раметрический многомерный анализ М. Д. Андерсен с пермутацией (perMANOVA). Коррекция уровня p на множественные попарные сравнения групп выполняли методом Беньямини–Йекутили. Для наглядной демонстрации различий между группами по всем сравниваемым параметрам использовали метод главных координат с построением ординационной диаграммы и метод главных компонент с графиком. С целью конкретизации различий между независимыми группами по сравниваемым показателям выполняли непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса. Для попарных сравнений по каждому показателю между независимыми группами применили тест Манна–Уитни с коррекцией уровня значимости с учетом множественности сравнений по методу Бонферрони. Для корреляционного анализа применили критерий Спирмена (ρ). Статистическую обработку полученных результатов выполнили с применением языка программирования R, который предназначен для статистической обработки данных и графического представления результатов статистических тестов [22]. Исходные данные вносили в таблицы Microsoft Excel 2010, после чего таблицы в txt формате загружались в RStudio — свободную среду разработки программного обеспечения с открытым исходным кодом для языка программирования R. Дополнительно к базисным статистическим пакетам загружали и использовали пакеты «ggplot2», «ggpubr», «rstatix», «gridExtra», «cowplot», «ade4», «vegan», «ellipse». Пакеты «ade4» и «vegan» применили для выполнения perMANOVA, а также для анализа главных компонент и его визуализация. Пакеты «ggplot2», «ggpubr», «rstatix», «gridExtra», «cowplot» применили для построения графиков. Для корреляционного анализа использовали пакет «Hmisc» и «ellipse».

Результаты и обсуждение

Непараметрический многомерный дисперсионный анализ выявил статистически значимое влияние разведения крови раствором С/Г *in vitro* как фактора, указывая на то, что группы I, II и IV не идентичны по совокупности сравниваемых показателей ($p=0,00009$). Групповое попарное сравнение выявило статистически значимые различия по совокупности анализируемых параметров между группами разведения *in vitro* (I и II) и контрольной группой (IV) (таблица). Метод главных координат и

Значения вероятностей для непараметрического дисперсионного анализа М. Д. Андерсон (perMANOVA) и при попарном сравнении групп, отличающихся по разведению крови *in vitro*.

Probability values for the M. J. Anderson nonparametric analysis of variance (perMANOVA) and *in vitro* pairwise comparison of groups differed in blood dilution.

The null hypothesis	P_1	P_2	P_3
Dilution does not affect the parameters	0.00009	—	—
No differences between Groups 0 and 25%	—	0.0003	0.0008
No differences between Groups 0 and 37.5%	—	0.0001	0.0006
No differences between Groups 25 and 37.5%	—	0.03	0.06

Note. P_1 — probability of null hypothesis rejection error by perMANOVA; P_2 , P_3 — probability of null hypothesis rejection error in pairwise comparison of groups without correction and with correction for multiple comparisons by Benjamini–Yekutieli method.

Примечание. The null hypothesis — нулевая гипотеза; dilution does not affect the parameters — разведение не влияет на параметры; no differences — не отличаются. P_1 — вероятность ошибки отклонения нулевой гипотезы при проведении perMANOVA; P_2 , P_3 — вероятность ошибки отклонения нулевой гипотезы при проведении попарного сравнения групп без коррекции и с коррекцией на множественные сравнения по методу Беньямини–Йекутили.

eters ($P=0.00009$). Group pairwise comparison revealed significant differences between the *in vitro* dilution groups (1 and 2) and the control group (4) based on the totality of analyzed parameters seen in Table. The method of principal coordinates and construction of the ordination diagram illustrate the results obtained above (Fig. 1, 2). Centroids of the dilution groups are plotted close to each other, but at a considerable unequal distance from the centroid of the control group. These differences between the dilution groups can be clearly seen on the principal component plot, where the groups are visualized as three ellipses oriented in space. Despite the significant distance of the dilution groups from the control, group 1 stands closer and deviates from the control group plane by a smaller angle than group 2. This indicates an increase in the differences in some of the studied hemostasis parameters when the percentage of blood dilution increases, which may significantly affect the hemostasis system when simulating a particular pathological condition and using fluid therapy with the specified combined crystalloid/colloid solution.

The results of nonparametric Kruskal–Wallis analysis of variance and pairwise comparison by Mann–Whitney test with the Bonferroni correction for multiple comparisons revealed significant differences between the groups in specific parameters (Fig. 3, 4).

A paradoxical increase of intensity of enzymatic and polymerization stages of clotting manifested as reduced clotting time T_3 ($P=0.042$) and increased intensity of clot polymerization ($P=0.049$) along with the decrease of AT III activity ($P=0.0017$) despite significant decrease of clot density at CDT3 gelation point ($P=0.0074$) and platelet count ($P=0.0022$) were observed in the 25% *in vitro* hemodilution.

No significant correlation between clot density at CDT₃, CDT₃+5, CDT₃+10, CDT₃+15, MA, and LFPTEG parameters (CCI and T₁) characterizing the initial platelet activation was found at 25% *in vitro* dilution. Also, there was no significant correlation between the clot density at the above time points and platelet count. The paradoxical en-

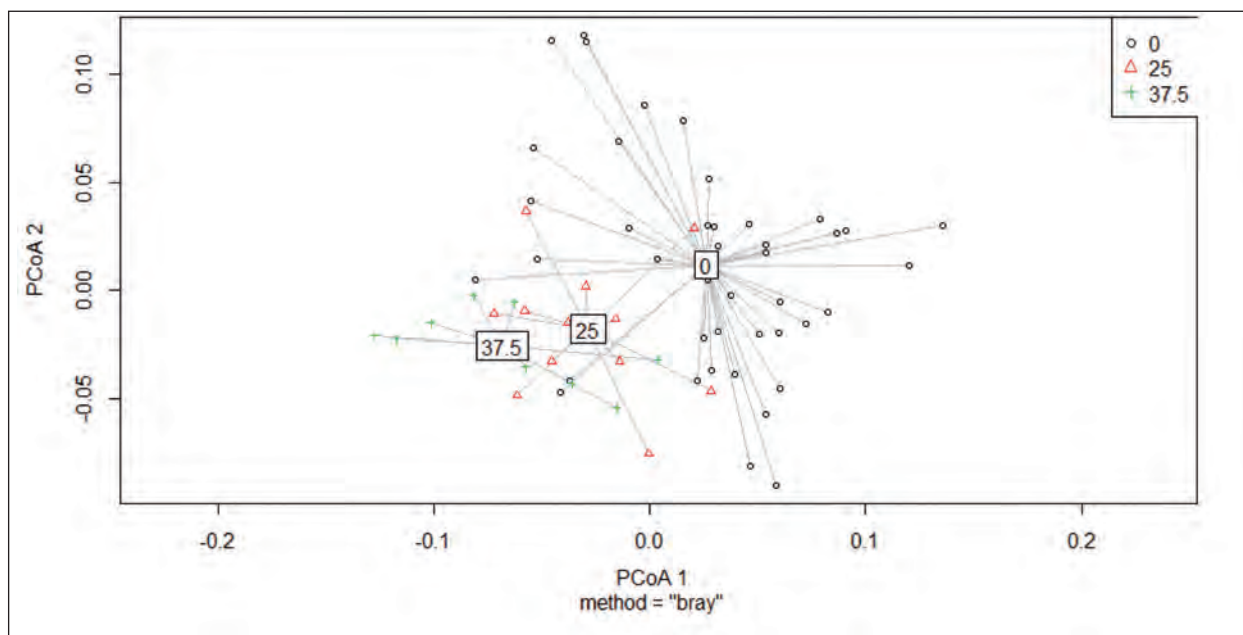


Рис. 1. Ординационная диаграмма: центры групп в пространстве двух главных координат (PCoA).

Fig. 1. Ordination diagram: centroids of groups in the space of two principal coordinates (PCoA).

Note. 0 — Group 4 without dilution at studied parameters (°), 25 — Group 1 with the *in vitro* 25-percent dilution at studied parameters (Δ), 37.5% — Group 2 with the *in vitro* 37.5-percent dilution at studied parameters (+).

Примечание. 0 — IV группа без разведения 0 % с изучаемыми параметрами (°), 25 — I группа с разведением *in vitro* на 25% с изучаемыми параметрами (Δ), 37,5% — II группа с разведением *in vitro* на 37,5% с изучаемыми параметрами (+).

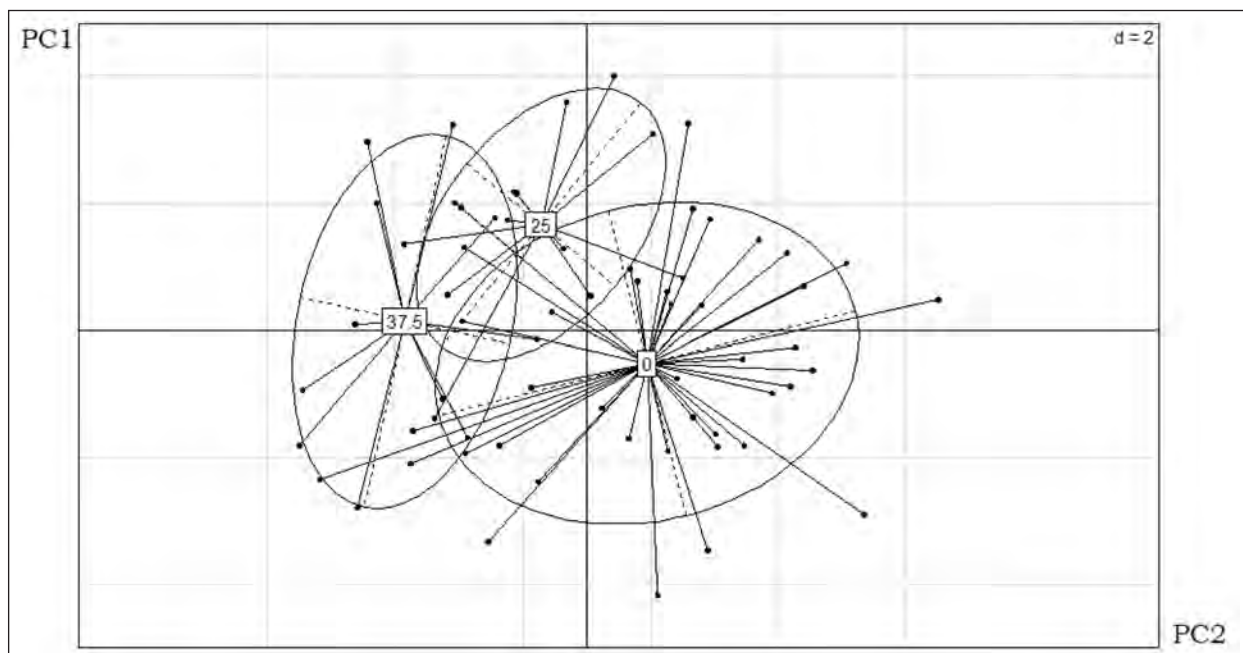


Рис. 2. Визуальная оценка различий в пространстве первых двух главных компонент для групп по исследуемым параметрам.

Fig. 2. Visual assessment of spatial differences of the two major components for the groups in the studied parameters.

Note. 0 — Group 4 without dilution, 25 — Group 1 at 25-percent dilution, 37.5 — Group 2 at 37.5-percent dilution; vertical axis — first principal component (PC1); horizontal axis — second principal component (PC2).

Примечание. 0 — IV группа без разведения 0%. 25 — I группа с разведением 25%, 37,5 — II группа с разведением 37,5%; ось ординат — первая главная компонента (PC1); ось абсцисс — вторая главная компонента (PC2).

построение ординационной диаграммы иллюстрируют полученные выше результаты (рис. 1, 2). Центроиды групп разведения расположены близко друг к другу, но на значительном нерав-

hancement of the enzymatic and polymerization phases can be explained in this study by the relative lack of anticoagulants. We revealed an inverse strong significant correlation ($\rho = -0.76$, $P = 0.004$)

ном удалении от центра контрольной группы. Эти различия между группами разведения хорошо заметны на графике главных компонент, где группы визуализированы в виде трех ориентированных в пространстве эллипсов. Несмотря на значительное удаление групп разведения от контрольной, группа I стоит ближе и на меньший угол отклоняется от плоскости контрольной группы, чем группа II. Это указывает на рост различий по некоторым изучаемым показателям системы гемостаза при увеличении процента разведения крови, что может значительно влиять на состояние системы гемостаза при моделировании того или иного патологического процесса, когда проводится инфузионная терапия представленным сочетанием кристаллоидного и коллоидного раствора.

По результатам непараметрического дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса и попарного сравнения тестом Манна–Уитни с коррекцией на множественные сравнения по методу Бонферрони определили значимые различия между группами по конкретным параметрам (рис. 3, 4).

При гемодилуции *in vitro* на 25% произошло парадоксальное усиление интенсивности ферментативного и полимеризационного этапа свертывания: уменьшилось время свертывания T_3 ($p=0,042$) и выросла интенсивность полимеризации сгустка ($p=0,049$) на фоне уменьшения активности АТ III ($p=0,0017$), несмотря на то, что значимо снизилась плотность тромба в точке желирования ПСТЗ ($p=0,0074$) и количество тромбоцитов ($p=0,0022$).

При 25% разведении *in vitro* значимой корреляции между плотностью сгустка в точках времени ПСТ₃, ПСТ₃+5, ПСТ₃+10, ПСТ₃+15, МА и параметрами НПТЭГ ИКК и T_1 , характеризующих начальную активацию тромбоцитов, не выявили. Значимая корреляция плотности сгустка в перечисленных точках времени с количеством тромбоцитов отсутствовала. Парадоксальное усиление ферментативного и полимеризационного этапа можно объяснить в данном исследовании относительной недостаточностью антикоагулянтов. Выявили обратную сильную значимую корреляционную связь ($\rho=-0,76$, $p=0,004$) между ИПС и КСПА, отражающего суммарную антикоагулянтную активность крови.

При гемодилуции *in vitro* на 37,5% значимо снизилась концентрация фибриногена ($p=4,2e-05$) и количество тромбоцитов в заданном объеме ($p=3,3e-05$). Значимо уменьшилась интенсивность протеолитического этапа свертывания — ИКД ($p=0,01$) и плотность тромба в точке желирования ПСТ₃ ($p=0,00053$), через 5 минут после ее достижения ПСТ₃+5 ($p=0,0051$)

between CPI and TAAC, reflecting total blood anti-coagulant activity.

The *in vitro* 37.5% hemodilution significantly reduced the fibrinogen level ($P=4.2e-05$) and the platelet count in a specified volume ($P=3.3e-05$). Significant decrease of the proteolytic clotting stage intensity (CDI) ($P=0.01$) and clot density at the gelation point CDT₃ ($P=0.00053$), CDT₃+5 ($P=0.0051$) and MA ($P=0.0022$) was found. The AT III activity ($P=2e-06$) and TAAC ($P=0.00014$) also significantly decreased indicating changes in total anticoagulant activity of serine protease inhibitors, non-specific serine protease inhibitors (α_2 -macroglobulin), protein C system, active complex inhibitors (tissue factor pathway inhibitor), fibrin degradation products (FDP) and antiaggregants (cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), prostaglandin I₂, nitric oxide). Although there was no significant change in T_2 , T_3 and TAC, a significant very strong negative ($\rho=-0.91$ and $\rho=-0.87$; $P=0.0001$ and $P=0.0005$) and moderate positive correlation ($\rho=0.65$; $P=0.032$) with CDI, respectively, was found. Inhibition of the proteolytic phase occurred along with a trend to reduced thrombin activity due to dilution. We also found that, at this dilution, clot density at CDT₃ ($\rho=-0.64$; $P=0.036$), CDT₃+5 ($\rho=-0.73$; $P=0.011$), CDT₃+10 ($\rho=-0.72$; $P=0.013$), CDT₃+15 ($\rho=-0.65$; $P=0.031$) and MA ($\rho=-0.66$; $P=0.029$) had negative correlation with contact coagulation time T_1 . Contact coagulation intensity, which is normally negative -3.57 ; -10.0 (Q1, Q3), significantly correlated only with the clot density at CDT₃+15 ($\rho=-0.65$, $P=0.032$). A strong significant positive correlation between the platelet count and clot density at CDT₃+5 ($\rho=0.7$; $P=0.016$) and CDT₃+10 ($\rho=0.64$; $P=0.033$) was revealed. Similar correlations were found between the fibrinogen level and clot density at CDT₃+15 ($\rho=0.65$; $P=0.029$) and MA ($\rho=0.64$; $P=0.033$). Thus, the clot density at 37.5% dilution *in vitro* is affected by platelet activity and count as well as the fibrinogen level. The 37.5% dilution begins to significantly affect the density of the forming clot by decreasing the platelet count and activity, as well as by reducing the fibrinogen level.

When comparing group 1 with group 2, a progressive decrease in the coagulation drive intensity ($P=0.0084$) was observed, which represents a decrease in the level and/or activity of coagulation factors and reduced thrombin activity. Correspondingly, coagulation time was prolonged ($P=0.024$), approaching that of the control group ($P=0.88$). At the same time, the clot density did not change significantly at all control points (Fig. 3), similarly to the platelet count ($P=0.15$) and fibrinogen level ($P=0.44$).

Although the 25% dilution group (group 1) *in vitro* was significantly different from the control group (group 4) in platelet count, AT III activity,

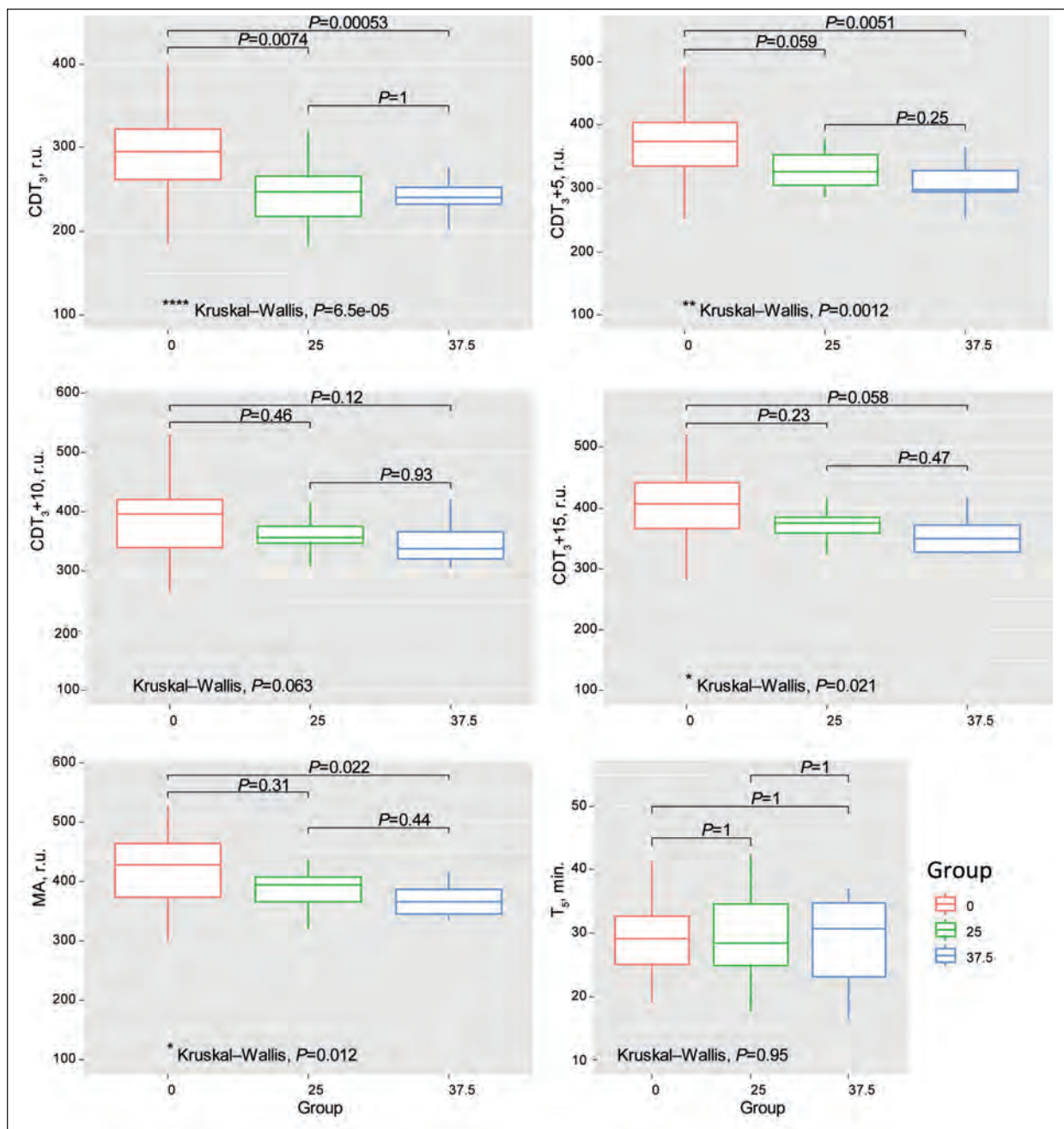


Рис. 3. Динамическое изменение плотности тромба от точки желирования — T₃ до полной ретракции сгустка (MA) при разведении *in vitro* до 25% (I) и 37,5% (II) в сравнении с контрольной группой 0% (IV).

Fig. 3. Changes in clot density from T₃ gelation point to complete clot retraction (MA) at the *in vitro* 25-percent dilution (1) and 37.5-percent dilution (2) compared with «no dilution» control group (4).

Note. For fig. 3, 4, 7: r. u. — relative units. For fig. 3, 7: CDT_{pt} — the clot density LFTEG achieving the point T_{pt} to characterize the clotting time; CDT_{pt+5/+10/+15} — the clot density 5/10/15 min after LFTEG achieving the point T₃ to characterize the clotting time; MA — the maximum clot density. The significance level determined by the Mann-Whitney pairwise test was corrected for multiple comparisons using the Bonferroni method.

Примечание. Для рис. 3, 4, 7: г.у. — относительные единицы. Для рис. 3, 7: CDT_{pt}, г.у. — плотность сгустка (тромба) при достижении кривой НПТЭГ точки T_{pt}, характеризующей время свертывания; CDT_{pt+5/+10/+15} — плотность сгустка (тромба) через 5, 10, 15 минут после достижения кривой НПТЭГ точки T₃, характеризующей время свертывания; MA — максимальная плотность сгустка. Уровень значимости при проведении попарного теста Манна-Уитни скорректирован на множественные сравнения методом Бонферрони.

и MA ($p=0,0022$). Также значимо снизилась активность АТ III ($p=2e-06$) и КСПА ($p=0,00014$), характеризующего общую антикоагулянтную активность ингибиторов сериновых протеаз, неспецифических ингибиторов сериновых

clotting time, clot density at the gelation point and polymerization intensity, these parameters remain within the reference limits [17, 18], except for CPI, which is ultimately negligible, since no differences were seen between groups in the time of the fibrin-

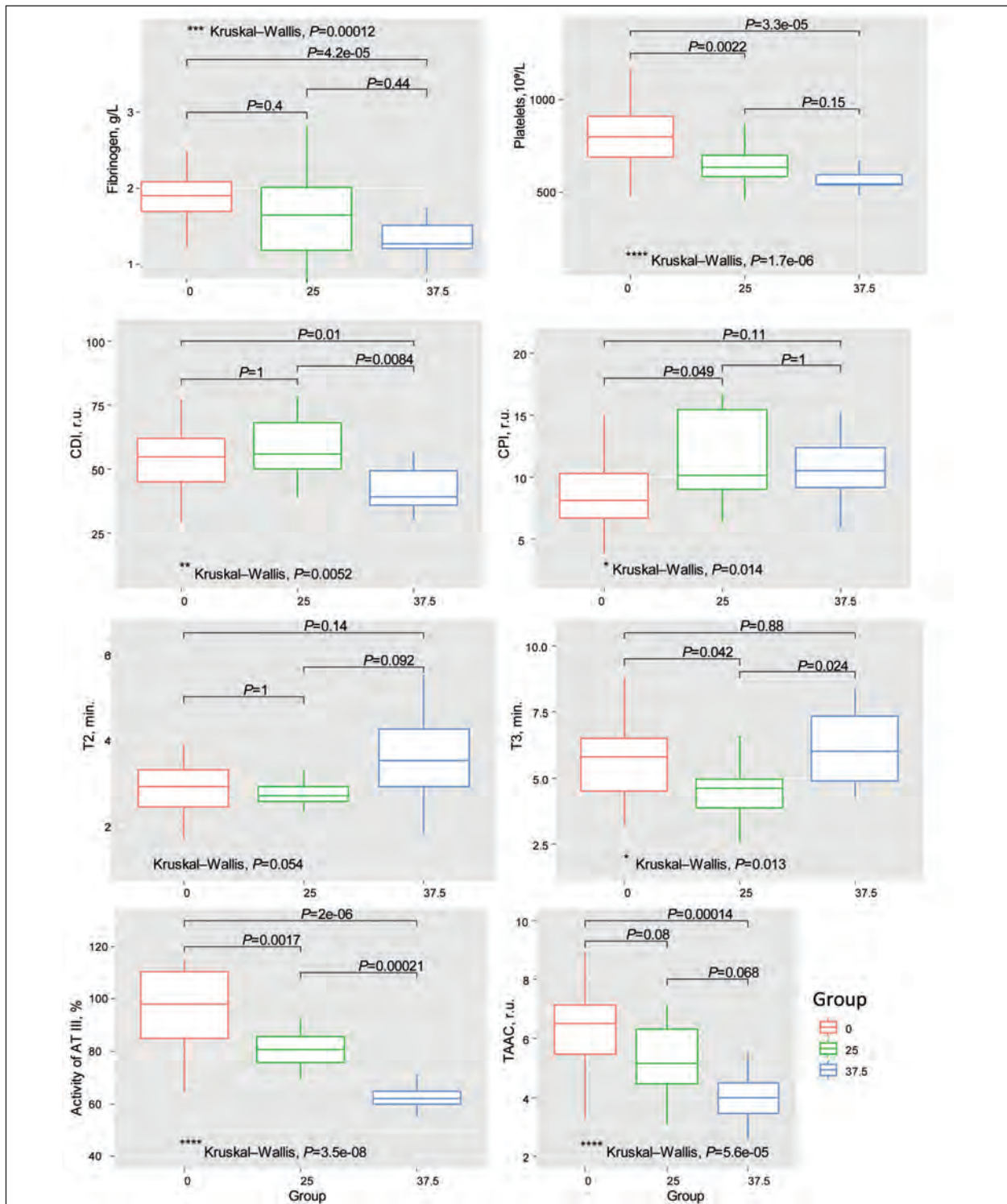


Рис. 4. Значимые изменения параметров системы гемостаза при разведении *in vitro* на 25% (I) и 37% (II) в сравнении с контрольной группой 0% (IV).

Fig. 4. Significant changes in hemostatic parameters at the 25-percent *in vitro* dilution (1) and 37-percent *in vitro* dilution (2) compared with «no dilution» control group (4).

Note. For fig. 4, 7: CDI — the coagulation drive intensity; CPI — the clot polymerization intensity; T₂, min — the time of reaching the thrombin activity constant; T₃, min — the clotting time; AT III, % — activity of antithrombin III; TAAC — the total anticoagulant activity coefficient. The significance level determined by the Mann-Whitney pairwise test was corrected for multiple comparisons using the Bonferroni method.

Примечание. Для рис. 4, 7: Platelets — тромбоциты; CDI, г. у. — интенсивность коагуляционного драйва; CPI — интенсивность полимеризации сгустка; T₂, min — время достижения константы тромбиновой активности; T₃, min — время свертывания крови; AT III, % — активность антитромбина III; TAAC, г. у. — коэффициент суммарной противосвертывающей активности. Уровень значимости при проведении попарного теста Манна-Уитни скорректирован на множественные сравнения методом Бонферрони.

протеаз (α_2 -макроглобулина), системы протеина С, ингибиторов активных комплексов (ингибитор пути тканевого фактора — ТФPI), продуктов деградации фибрина (ПДФ) и дезагрегантов (циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), простагландин I_2 , оксид азота). Несмотря на отсутствие значимого изменения T_2 , T_3 и КТА обнаружили соответственно значимую очень сильную отрицательную ($\rho=-0,91$ и $\rho=-0,87$; $p=0,0001$ и $p=0,0005$) и среднюю положительную корреляционную связи ($\rho=0,65$; $p=0,032$) с ИКД. Ингибирование протеолитического этапа протекало на фоне тенденции к снижению активности тромбина вследствие разведения. При данном уровне разведения крови, плотность сгустка в точках ПСТ₃ ($\rho=-0,64$; $p=0,036$), ПСТ₃+5 ($\rho=-0,73$; $p=0,011$), ПСТ₃+10 ($\rho=-0,72$; $p=0,013$), ПСТ₃+15 ($\rho=-0,65$; $p=0,031$) и МА ($\rho=-0,66$; $p=0,029$) отрицательно коррелировала с временем контактной коагуляции T_1 . Интенсивность контактной коагуляции (параметр в норме имеет отрицательные значения: -3,57; -10,0 (Q1; Q3)) значимо коррелировала только с плотностью сгустка в точке времени ПСТ₃+15 ($\rho=-0,65$, $p=0,032$). При этом выявили выраженную положительную, значимую корреляционную связь между количеством тромбоцитов и плотностью сгустка в точках ПСТ₃+5 ($\rho=0,7$; $p=0,016$) и ПСТ₃+10 ($\rho=0,64$; $p=0,033$). Аналогичной силы корреляционные связи обнаружили между концентрацией фибриногена и плотностью сгустка в точках ПСТ₃+15 ($\rho=0,65$; $p=0,029$) и МА ($\rho=0,64$; $p=0,033$). Таким образом, на плотность сгустка *in vitro* при разведении на 37,5% влияет активность тромбоцитов, их количество и содержание фибриногена. Данные показывают, что разведение на 37,5% начинает существенно влиять на плотность формирующегося тромба вследствие уменьшения количества тромбоцитов, их активности и снижения концентрации фибриногена.

При сравнении I и II групп между собой отмечали прогрессивное уменьшение интенсивности коагуляционного драйва ($p=0,0084$), что отражает уменьшение концентрации и/или активности факторов свертывания и активности тромбина. Соответственно с этим удлиняется время свертывания ($p=0,024$), приближаясь по значению к контрольной группе ($p=0,88$). При этом плотность тромба во всех контрольных точках значимо не меняется (рис. 3), также, как и количество тромбоцитов ($p=0,15$) и концентрация фибриногена ($p=0,44$).

Несмотря на то, что группа с разведением на 25% (I) *in vitro* статически значимо отличалась от контрольной группы (IV) по количеству тромбоцитов, активности АТ III, времени свер-

platelet structure formation (T_5) (Fig. 3). Fibrinogen, platelets, CDI, CDT₃, CDT₃+5, MA, АТ III, and ТААС continue to decrease significantly with increasing dilution to 37.5%, going beyond the reference ranges [17, 18], which may affect the interpretation of the experimental results and be clinically relevant. Thus, 25% hemodilution can be considered to have the least impact on the hemostatic system *in vitro*.

Given that *in vitro* no compensation for coagulation abnormalities occurring in dilution is possible, an *in vivo* evaluation of the impact of 25% hemodilution on the hemostatic system was warranted. According to the results of the experiment, the reference values of hematocrit ($M\pm 1.96*SD$) in the 25% dilution *in vivo* group (group 3) were $31.16\pm 3.64\%$, while in the control group (group 4) they were $41.98\pm 5.04\%$. The reference values of lactate level in group 3 were 1.19 ± 0.96 mmol/l and 1.24 ± 1.04 mmol/l in group 4. The Mann–Whitney test ($P=0.98$) and the permutational test with 10,000 iterations found no significant differences in lactate level between the two groups ($P=0.76$). The systolic BP did not fall below 100 mm Hg. Thus, simulation of 25% hemodilution *in vivo* in experimental animals was accomplished without signs of shock.

As in the case of the *in vitro* dilution, the *in vivo* dilution had a significant impact on the studied parameters characterizing the hemostatic system ($P=0.015$), which is clearly illustrated in the ordinal diagram (Fig. 5).

This can be seen by analyzing the principal component graph, where the ellipses reflecting the groups with 25% (group 3) and 0% (group 4) dilution overlap with a slight deviation in angle though (Fig. 6).

In vivo blood dilution did not result in significant changes in LFPTEG parameters and did not affect the clot density at all time points (Fig. 7). APTT and PT tended to decrease, which contradicts the concept of dilutional coagulopathy. A 25% *in vivo* dilution caused a significant decrease in fibrinogen level, АТ III activity, reduced platelet count, and prolonged TT (Fig. 7). All parameters remained within the reference ranges even though their significant (albeit clinically non relevant) changes were recorded [17, 18]. Thus, the use of low-volume fluid therapy when modeling a particular pathological condition in experimental animals (rats) with a volume of up to 16 ml 2:1 SG solution and achieving hematocrit of approximately 30% can be considered feasible, safe and not affecting the critical coagulation and anticoagulation parameters.

As in the *in vitro* study, a strong to medium significant negative correlation between CD at CDT₃ ($\rho=-0.74$; $P=0.015$), CDT₃+5 ($\rho=-0.8$; $P=0.006$), CDT₃+10 ($\rho=-0.74$; $P=0.015$), CDT₃+15 ($\rho=-0.63$; $P=0.049$), MA ($\rho=-0.63$; $P=0.049$) and

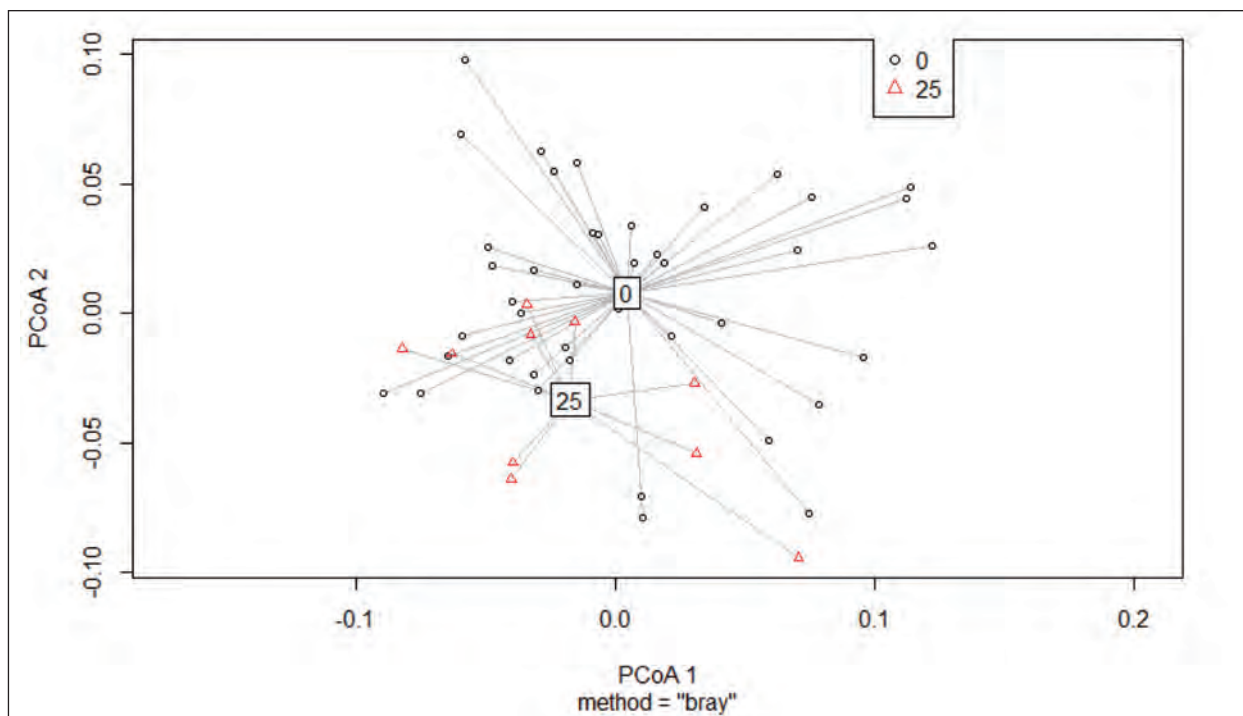


Рис. 5. Ординационная диаграмма: центры групп в пространстве двух главных координат (PCoA).

Fig. 5. Ordination diagram: centroids of groups in the space of two principal coordinates (PCoA).

Note. 0 — Group 4 with no dilution at studied parameters (°); 25 — Group 3 with *in vivo* 25-percent dilution at studied parameters (△).

Примечание. 0 — IV группа без разведения 0% с изучаемыми параметрами (°); 25 — III группа с разведением *in vivo* на 25% с изучаемыми параметрами (△).

тивания, плотности сгустка в точке желирования и интенсивности полимеризации, указанные параметры не выходят за рамки референсных границ [17, 18], кроме ИПС, что, в конечном итоге, незначимо, так как различий между группами по времени формирования фибрин-тромбоцитарной структуры (T_3) не получено (рис. 3). С увеличением разведения до 37,5% существенно продолжает уменьшаться количество фибриногена, тромбоцитов, ИКД, ПСТ₃, ПСТ₃+5, МА, АТ III, КСПА, значительно выходя за референсные границы [17, 18], что может повлиять на интерпретацию результатов экспериментов и быть клинически значимым. Таким образом, гемодилюцию на 25% можно считать наименее влияющей на систему гемостаза *in vitro*.

Учитывая, что вне организма отсутствует возможная компенсация тех или иных отклонений в системе гемостаза при разведении в пробирке, требуется оценка влияния 25% гемодилюции на систему гемостаза *in vivo*. По результатам эксперимента референсные значения гематокрита ($M \pm 1,96 * SD$) в группе с 25% разведением *in vivo* (III) составила $31,16 \pm 3,64\%$, а в контрольной группе (IV) — $41,98 \pm 5,04\%$. Референсные значения содержания лактата в III группе составили $1,19 \pm 0,96$ ммоль/л, в IV — $1,24 \pm 1,04$ ммоль/л. При проведении теста Манна-Уитни ($p=0,98$) и теста пермутации с

contact coagulation time (T_1), as well as a negative correlation between CCI and CD at CDT_3 ($\rho=-0.59$; $P=0.012$), CDT_3+5 ($\rho=-0.66$; $P=0.012$), CDT_3+10 ($\rho=-0.57$; $P=0.012$) were revealed *in vivo*. No significant correlation between fibrinogen level, platelet count and CD at CDT_3 , CDT_3+5 , CDT_3+10 , CDT_3+15 , and MA was found. Thus, *in vivo* clot density at 25% dilution is primarily affected by platelet activity rather than their count and fibrinogen level.

As a diagnostic criterion of dilutional coagulopathy, 1.5-fold PT and APTT prolongation [23] is used. In our study, PT and APTT tended to decrease, and TT was significantly shorter in 25% dilution *in vivo*. The decrease of TT is associated with accelerated fibrin monomer formation from fibrinogen under the action of thrombin and reduced anticoagulant system activity [24] with a significant decrease of its key component (AT III). According to LFPTEG, at 25% dilution there was a trend to increased fibrin monomer polymerization (CPI) and enhanced proteolytic phase of blood coagulation (CDI) *in vivo*, as well as a significant enhancement of these phases (CPI, T_3) *in vitro*. Imbalance between pro- and anticoagulants at a minor 25% blood dilution, which results in prevailing procoagulation, may be useful for early control of bleeding in low-volume fluid infusions, that is consistent with the previous findings [25].

Reduced clot density at minutes 5, 10, 15 after reaching the gelation point and maximum clot den-

10000 итерациями статистически значимых различий по концентрации лактата между двумя группами не обнаружили ($p=0,76$). САД не снижалось ниже 100 мм рт. ст. Таким образом, моделирование гемодилюции *in vivo* на 25% у экспериментальных животных достигнуто без признаков шока.

Как и в случае разведения *in vitro*, разведение *in vivo* статистически значимо влияло на изучаемые параметры, важные для оценки системы гемостаза ($p=0,015$), что наглядно иллюстрировано на ординационной диаграмме (рис. 5).

Визуально в этом можно убедиться, проанализировав график главных компонент, где эллипсы, отражающие группы с 25% (III) и 0% (IV) разведением, накладываются друг на друга, но с небольшим отклонением по углу (рис. 6).

Разведение крови *in vivo* не привело к статистически значимым изменениям параметров НПТЭГ и не отразилось на плотности сгустка во всех временных точках (рис. 7). АЧТВ и ПВ имели тенденцию к уменьшению, что противоречит понятию «дилюционная коагулопатия». Разведение *in vivo* на 25% вызвало значимое снижение концентрации фибриногена, активности АТ III, уменьшило количество тромбоцитов и удлинило ТВ (рис. 7). Несмотря на статистическую значимость этих перемен, все показатели остались в рамках референсных

значений (МА or MCF) according to rotational thromboelastometry (ROTEM) and thromboelastography (TEG) is used as a diagnostic marker of coagulopathy [26]. Hemodilution coagulopathy can be accurately diagnosed using ROTEM and TEG by reduced clot density at the CDT_3+10 and MA time points in 33–40% dilution with isotonic crystalloid solutions [9, 27–29] and in 20–35% dilution with gelatine preparations [30]. At these points, a strong correlation between clot density and fibrinogen level was noted. No significant changes in other TEG parameters such as R-time, K-time, α angle or similar ROTEM parameters representing the proteolytic and partly polymerization phases of clotting were found [27, 29]. Significant changes in these parameters were recorded only at 40% dilution with gelatine preparations [30]. Our study using LFPTEG has found that as early as at 25–37.5% dilution with 2:1 mixed crystalloid/colloid solution *in vitro*, a reduced density at the gelation point of CDT_3 and CDT_3+5 , increased clot polymerization (CPI), reduced intensity of proteolytic phase of clotting (CDI) and decreased activity of anticoagulant system (TAAC) occur. In addition, LFPTEG was used to discover the key contribution of platelet activity to clot compaction and a less significant role of platelet count at a 25% dilution. The subsequent decrease of clot density is associated with both low platelet activity and reduced platelet count and fibrinogen level.

We can conclude that LFPTEG method is highly sensitive and informative when compared

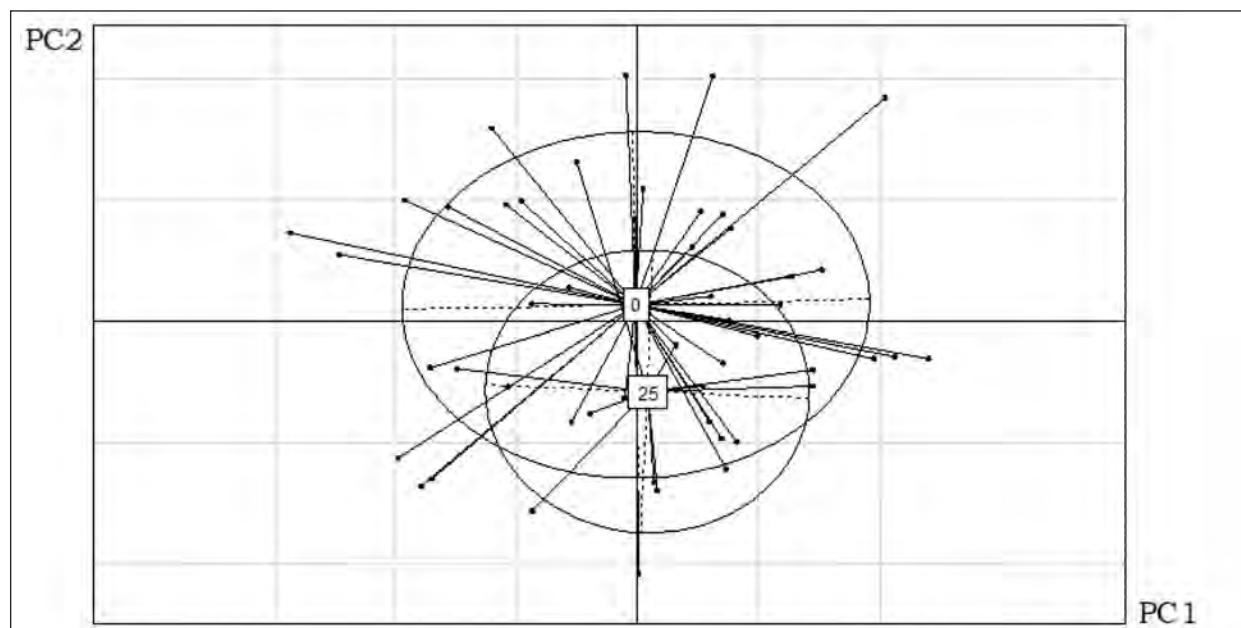


Рис. 6. Визуальная оценка различий в пространстве первых двух главных компонент при сравнении групп по изучаемым параметрам.

Fig. 6. Visual assessment of spatial differences in the first two major components when comparing groups by the studied parameters.

Note. 0 — Group 4 with no dilution; 25 — Group 3 with the 25-percent dilution *in vivo*; horizontal axis — first principal component (PC1); vertical axis — second principal component (PC2).

Примечание. 0 — IV группа без разведения 0%; 25 — III группа с разведением *in vivo* на 25%; по оси абсцисс — первая главная компонента (PC1); по оси ординат — вторая главная компонента (PC2).

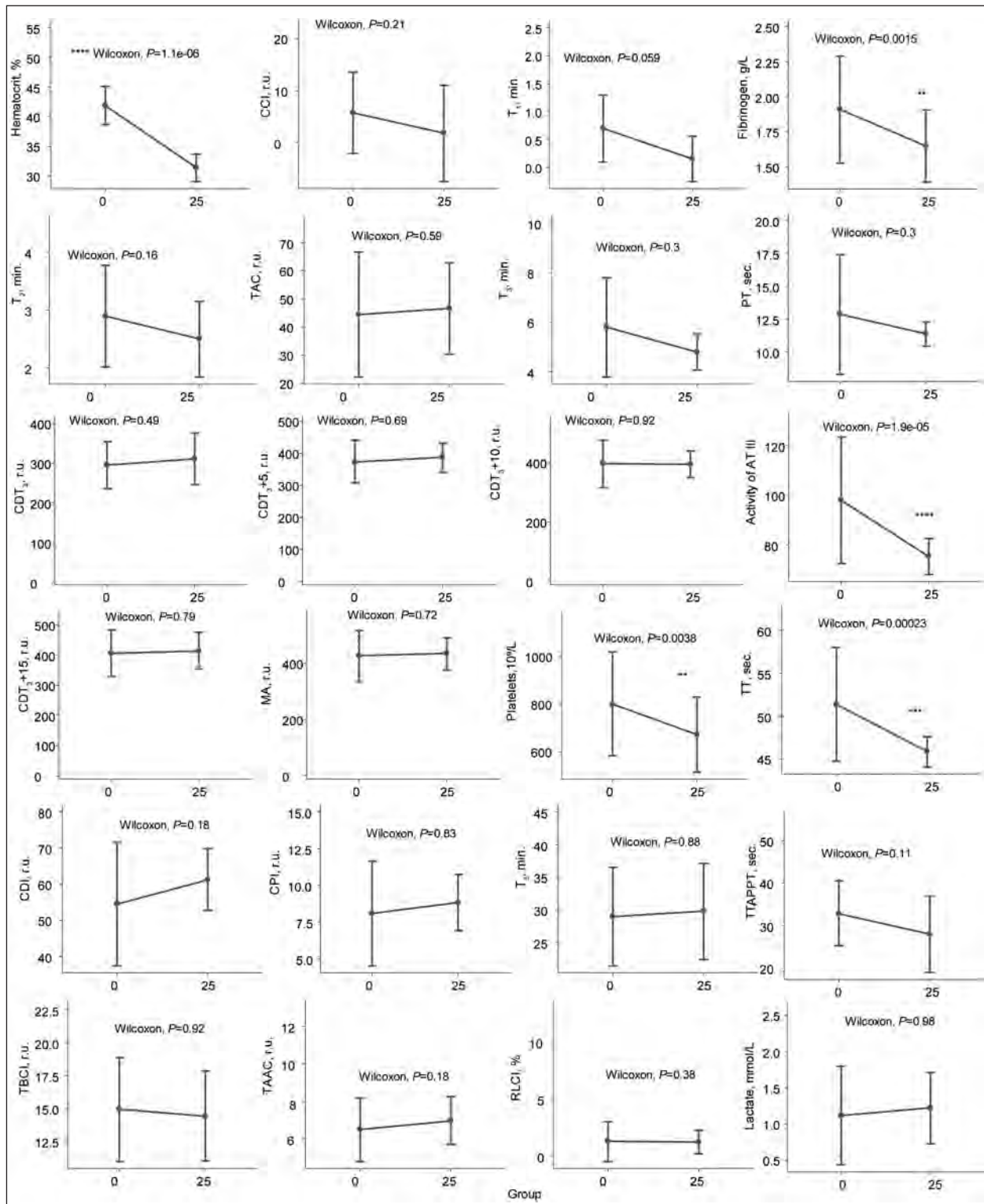


Рис. 7. Сравнение группы разведения 25% (III) *in vivo* с контрольной группой (IV).
 Fig. 7. Comparison of the 25-percent dilution group (3) *in vivo* with the control group (4).

Note. CCI, r. u. — the contact coagulation intensity; T₁, min — the contact coagulation time; TAC, r. u. — the thrombin activity constant; T₅, min — the time of forming the fibrin-platelet structure; TBCI, r. u. — the total blood clotting intensity; RLCI, % — the retraction and lysis of clot intensity; TAAC, r. u. — the total anticoagulant activity coefficient; APTT — activated partial thromboplastin time; PT — prothrombin time thrombin time; TT — thrombin time.

Примечание. T₁, min — время контактной коагуляции; CCI — интенсивность контактной коагуляции; TAC — константа тромбиновой активности; T₅, min — время формирования фибрин-тромбоцитарной структуры; TBCI — интенсивность тотального свертывания крови; RLCI — интенсивность ретракции и лизиса сгустка; TAAC — коэффициент суммарной противосвертывающей активности; APTT — активированное частичное тромбопластиновое время; PT — протромбиновое время; TT — тромбиновое время.

границ [17, 18] и клинически незначимы. Таким образом, использование малообъемной инфузии при моделировании того или иного патологического состояния у экспериментальных животных (крыс) до 16 мл раствора С/Г в соотношении 2:1 и достижения показателя гематокрита в пределах 30% можно считать возможным, безопасным и не влияющим критически на параметры свертывания и противосвертывания способом.

Как и в исследовании *in vitro*, *in vivo* при разведении на 25% выявили сильную и среднюю по силе значимые отрицательные корреляции между ПСТ₃ ($\rho = -0,74$; $p = 0,015$), ПСТ₃+5 ($\rho = -0,8$; $p = 0,006$), ПСТ₃+10 ($\rho = -0,74$; $p = 0,015$), ПСТ₃+15 ($\rho = -0,63$; $p = 0,049$), МА ($\rho = -0,63$; $p = 0,049$) и временем контактной коагуляции (Т₁), а также отрицательную корреляцию интенсивности контактной коагуляции и ПСТ₃ ($\rho = -0,59$; $p = 0,012$), ПСТ₃+5 ($\rho = -0,66$; $p = 0,012$), ПСТ₃+10 ($\rho = -0,57$; $p = 0,012$). Значимой корреляции между концентрацией фибриногена, количеством тромбоцитов с плотностью тромба в точках ПСТ₃, ПСТ₃+5, ПСТ₃+10, ПСТ₃+15 и МА не выявили. Таким образом, на плотность сгустка *in vivo* при разведении на 25%, в первую очередь, влияет активность тромбоцитов, а не их количество и концентрация фибриногена.

В качестве диагностического критерия дилуционной коагулопатии используют удлинение ПВ и АЧТВ в 1,5 раза от нормы [23]. В нашем исследовании ПВ и АЧТВ имели тенденцию к уменьшению, а ТВ статистически значимо укорачивалось при разведении *in vivo* на 25%. Уменьшение ТВ связывают с ускорением образования фибрин-мономера из фибриногена под действием тромбина и уменьшением активности антикоагулянтной системы [24], один из важнейших компонентов которой (АТ III) значимо снижался. По данным НПТЭГ, при разведении на 25% отмечалась тенденция к усилению полимеризации фибрин-мономеров (ИПС) и протеолитического этапа свертывания (ИКД) *in vivo*, а также значимое усиление этих этапов *in vitro* (ИПС, Т₃). Диспропорция про- и антикоагулянтов при незначительном разведении крови на 25%, приводящая к превалированию первых, может быть полезной для ранней остановки кровотечения при малообъемной инфузии, что согласуется с результатами более ранних работ [25].

Уменьшение плотности тромба на 5-й, 10-й, 15-й минуте после достижения точки желирования и максимальной плотности тромба (МА или MCF) по данным ротационной тромбоэластометрии (РОТЭМ) и тромбоэластографии (ТЭГ), используется как диагностический маркер коагулопатии [26]. Гемодилуционная коагулопатия выявляется достоверно РОТЭМ

with ROTEM and TEG, with the advantage of using native blood for sampling, while in ROTEM and TEG the blood samples require additional activation.

Conclusion

Thus, the 25-percent blood dilution with 2:1 SG solution should be considered as a relatively safe for the hemostatic system *in vivo* dilution that minimally affects the *in vitro* parameters in the experiment.

и ТЭГ по снижению плотности тромба в точке на 10-й минуте и МА при разведении на 33–40% изотоничными кристаллоидными растворами [9, 27–29] и при 20–35% разведении препаратами желатина [30]. В этих точках отмечена сильная корреляция между плотностью тромба и концентрацией фибриногена. При этом значимого изменения других параметров ТЭГ: R-времени, K-времени, α -угла или аналогичных параметров РОТЭМ, отражающих протеолитический и отчасти полимеризационный этап свертывания, не регистрируют [27, 29]. Значимые изменения этих параметров фиксируют только при 40% разведении препаратами желатина [30]. В нашем исследовании с помощью НПТЭГ уже при разведении на 25–37,5% смешанным кристаллоид/коллоидным раствором (2:1) *in vitro* выявили снижение плотности в точке желирования ПСТ₃ и ПСТ₃+5, усиление полимеризации сгустка (ИПС), снижение интенсивности протеолитического этапа свертывания (ИКД) и снижение активности антикоагулянтной системы (КСПА). Кроме того, с помощью НПТЭГ определили перовостепенный вклад активности тромбоцитов в уплотнение тромба и менее значимый вклад количества тромбоцитов при разведении на 25%. Последующее снижение плотности тромба связано не только со снижением активности тромбоцитов, но и с уменьшением их количества и снижением концентрации фибриногена. Таким образом, можно констатировать, что метод НПТЭГ отличается высокой чувствительностью и информативностью при сравнении с РОТЭМ и ТЭГ, учитывая тот факт, что при выполнении НПТЭГ используется нативная кровь, а для РОТЭМ и ТЭГ — кровь, активированная тем или иным агентом.

Заклучение

Суммируя, можно прийти к заключению, что наиболее «безопасным» для системы гемостаза *in vivo* и минимально влияющим на параметры *in vitro* в эксперименте следует признать гемодилуцию раствором С/Г в соотношении 2:1 на 25%.

Литература

1. Martini W.Z. Coagulation complications following trauma. *Mil. Med. Res.* 2016; 3: 35. DOI: 10.1186/s40779-016-0105-2

2. Баранич А.И., Сычев А.А., Савин И.А., Полунин А.А., Оширов А.В., Потапов А.А. Нарушения системы гемостаза у пациентов в остром периоде изолированной черепно-мозговой травмы (обзор). *Общая реаниматология.* 2018; 14 (5): 85-95. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-5-85-95

3. Spahn D. R., Bouillon B., Cerny V., Duranteau J., Filipescu D., Hunt B. J., Komadina R., Maegele M., Nardi G., Riddez L., Samama C-M., Vincent J-L., Rossaint R. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition. *Critical Care.* 2019; 23: 98. DOI: org/10.1186/s13054-019-2347-3.

4. Mullier F., Lessire S., De Schoutheete J-C., Chatelain B., Deneys V., Mathieux V., Hachimi Idrissi S., Dogne J-M., Watelet J-B., Gourdin M., Dincq A-S. Facing coagulation disorders after acute trauma. *B-ENT.* 2016; 26 (1): 67-85.

5. Баранич А.И., Сычев А.А., Савин И.А., Полунин А.А., Оширов А.В., Потапов А.А. Коагулопатия, ассоциированная с острым периодом черепно-мозговой травмы. *Общая реаниматология.* 2020; 16 (1): 27-34. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-1-27-34

6. Кугаевская Е.В., Гуреева Т.А., Тимошенко О.С., Соловьёва Н.И. Система активатора плазминогена урокиназного типа в норме и при жизнеугрожающих процессах (обзор). *Общая реаниматология.* 2018; 14 (6): 61-79. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-6-61-79

7. Hampton D. A., Fabricant L. J., Differding J., Diggs B., Underwood S., De La Cruz D., Holcomb J. B., Brasel K. J., Cohen M. J., Fox E. E., Alarcon L. H., Rahbar M. H., Phelan H. A., Bulger E. M., Muskat P., Myers J. G., del Junco D. J., Wade C. E., Cotton B.A., Schreiber M. A. Prehospital intravenous fluid is associated with increased survival in trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013; 75 (1): 9-15. DOI: 10.1097/TA.0b013e318290cd52

8. Boyd C.J., Claus M.A., Rasis A.L., Hosgood G., Sharp C.R., Smart L. Hypocoagulability and platelet dysfunction are exacerbated by synthetic colloids in a canine hemorrhagic shock model. *Front Vet Sci.* 2018; 5: 279-290. DOI: 10.3389/fvets.2018.0027

9. Sevcikova S., Vymazal T., Durila M. Effect of balanced crystalloid, gelatin and hydroxyethyl starch on coagulation detected by rotational thromboelastometry in vitro. *Clin Lab.* 2017; 63 (10): 1691-1700. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2017.170505

10. Kozek-Langenecker S.A. Fluids and coagulation. *Curr Opin Crit Care.* 2015; 21 (4): 285-291. DOI: 10.1097/mcc.0000000000000219

11. Wu R., Peng L-G., Zhao H-M. Diverse coagulopathies in a rabbit model with different abdominal injuries. *World J. Emerg. Med.* 2017; 8 (2): 141-147. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2017.02.011

12. Dyer M., Haldeman S., Gutierrez A., Kohut L., Gupta A.S., Neal M.D. Uncontrolled hemorrhagic shock modeled via liver laceration in mice with real time hemodynamic monitoring. *J Vis Exp.* 2017; 123: 55554. DOI: 10.3791/55554

13. Wang H., Cao H., Zhang X., Ge L., Bie L. The effect of hypertonic saline and mannitol on coagulation in moderate traumatic brain injury patients. *Am J Emerg Med.* 2017; 35 (10): 1404-1407. DOI: 10.1016/j.ajem.2017.04.020

14. Ponschab M., Schöchl H., Keibl C., Fischer H., Redl H., Schlimp C.J. Preferential effects of low volume versus high volume replacement with crystalloid fluid in a hemorrhagic shock model in pigs. *BMC Anesthesiol.* 2015; 15: 133. DOI: 10.1186/s12871-015-0114-9

15. Соловьёв М.А., Тютрин И.И., Удут В.В., Клименкова В.Ф. Опыт диагностики и мониторинга критических нарушений гемостаза. *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях.* 2013; (4): 55-60. DOI: 10.25016/2541-7487-2013-0-4-55-60

16. Удут В.В., Тютрин И.И., Котловская Л.Ю., Соловьёв М.А., Жуков Е.Л.,>Lastovetskiy A.G., Borodulina E.G., Kotlovskiy M.Yu. Технология низкочастотной пьезотромбоэластографии в оценке гемостатического потенциала. *Вестник новых медицинских технологий.* 2016; 4 DOI: 10.12737/22220

17. Кинзерский А.А., Долгих В.Т., Коржук М.С. Методика получения референтных значений низкочастотной пьезотромбоэластографии у крыс-самцов линии Wistar. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск).* 2016; 142 (3): 25-28.

18. Кинзерский А.А., Долгих В.В., Коржук М.С. Нормальные значения низкочастотной пьезотромбоэластографии крыс-самцов Wistar, полученные под ксилазин+тилетамин-золазепам анестезией при заборе крови из сонной артерии. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2016620346 // Бюл. № 4. Опубликовано 20.04.2016.

19. Кинзерский А.А., Петрова Ю.А., Коржук М.С., Долгих В.Т. Нормальные значения общего, биохимического анализа крови и коагулограммы крыс-самцов линии Wistar. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2017620486/02.05.17. Бюл. №5.

20. Липатов В.А., Северинов В.А., Крюков В.А., Саакян А.Р. Этические и правовые аспекты проведения экспериментальных биомедицинских исследований in vivo часть II. *Российский медико-биологический вестник им. И.П. Павлова.* 2019; 27 (2): 245-257. DOI: 10.23888/PAVLOVJ2019272245-257

21. Кинзерский А.А., Долгих В.В., Коржук М.С. Временные и структурные показатели динамики тромбообразования низкочастотной пьезотромбоэластографии у крыс-самцов Wistar линии. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2016620346 // Бюл. №4. Опубликовано 20.04.2016.

References

1. Martini W.Z. Coagulation complications following trauma. *Mil. Med. Res.* 2016; 3: 35. DOI: 10.1186/s40779-016-0105-2

2. Baraich A.I., Sychev A.A., Savin I.A., Polunin A.A., Oshirov A.V., Potapov A.A. Hemostasis disturbances in patients in the acute period of isolated traumatic brain injury (review). *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2018; 14 (5): 85-95. [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-5-85-95

3. Spahn D. R., Bouillon B., Cerny V., Duranteau J., Filipescu D., Hunt B. J., Komadina R., Maegele M., Nardi G., Riddez L., Samama C-M., Vincent J-L., Rossaint R. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition. *Critical Care.* 2019; 23: 98. DOI: org/10.1186/s13054-019-2347-3.

4. Mullier F., Lessire S., De Schoutheete J-C., Chatelain B., Deneys V., Mathieux V., Hachimi Idrissi S., Dogne J-M., Watelet J-B., Gourdin M., Dincq A-S. Facing coagulation disorders after acute trauma. *B-ENT.* 2016; 26 (1): 67-85.

5. Baraich A.I., Sychev A.A., Savin I.A., Polunin A.A., Oshirov A.V., Potapov A.A. Coagulopathy in the acute phase of traumatic brain injury. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2020; 16 (1): 27-34. [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-1-27-34

6. Kugaevskaya E.V., Gureeva T.A., Timoshenko O.S., Solovyeva N.I. Urukinaze-type plasminogenactivator system in norm and life-threatening processes (review). *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2018; 14 (6): 61-79 [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-6-61-79

7. Hampton D. A., Fabricant L. J., Differding J., Diggs B., Underwood S., De La Cruz D., Holcomb J. B., Brasel K. J., Cohen M. J., Fox E. E., Alarcon L. H., Rahbar M. H., Phelan H. A., Bulger E. M., Muskat P., Myers J. G., del Junco D. J., Wade C. E., Cotton B.A., Schreiber M. A. Prehospital intravenous fluid is associated with increased survival in trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013; 75 (1): 9-15. DOI: 10.1097/TA.0b013e318290cd52

8. Boyd C.J., Claus M.A., Rasis A.L., Hosgood G., Sharp C.R., Smart L. Hypocoagulability and platelet dysfunction are exacerbated by synthetic colloids in a canine hemorrhagic shock model. *Front Vet Sci.* 2018; 5: 279-290. DOI: 10.3389/fvets.2018.0027

9. Sevcikova S., Vymazal T., Durila M. Effect of balanced crystalloid, gelatin and hydroxyethyl starch on coagulation detected by rotational thromboelastometry in vitro. *Clin Lab.* 2017; 63 (10): 1691-1700. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2017.170505

10. Kozek-Langenecker S.A. Fluids and coagulation. *Curr Opin Crit Care.* 2015; 21 (4): 285-291. DOI: 10.1097/mcc.0000000000000219

11. Wu R., Peng L-G., Zhao H-M. Diverse coagulopathies in a rabbit model with different abdominal injuries. *World J. Emerg. Med.* 2017; 8 (2): 141-147. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2017.02.011

12. Dyer M., Haldeman S., Gutierrez A., Kohut L., Gupta A.S., Neal M.D. Uncontrolled hemorrhagic shock modeled via liver laceration in mice with real time hemodynamic monitoring. *J Vis Exp.* 2017; 123: 55554. DOI: 10.3791/55554

13. Wang H., Cao H., Zhang X., Ge L., Bie L. The effect of hypertonic saline and mannitol on coagulation in moderate traumatic brain injury patients. *Am J Emerg Med.* 2017; 35 (10): 1404-1407. DOI: 10.1016/j.ajem.2017.04.020

14. Ponschab M., Schöchl H., Keibl C., Fischer H., Redl H., Schlimp C.J. Preferential effects of low volume versus high volume replacement with crystalloid fluid in a hemorrhagic shock model in pigs. *BMC Anesthesiol.* 2015; 15: 133. DOI: 10.1186/s12871-015-0114-9

15. Solovyev M.A., Tyutrin I.I., Udu V.V., Klimenkova V.F. Experience in the diagnosis and monitoring of critical hemostasis disorders. *Med. i sots. psikholog. probl. bezopasnosti v chrezv. situatsiyakh.* 2013; 4: 55-60. [In Russ.] DOI: 10.25016/2541-7487-2013-0-4-55-60

16. Udu V.V., Tyutrin I.I., Kotlovskaya L.Yu., Solovyev M.A., Zhukov E.L., Lastovetskiy A.G., Borodulina E.V., Kotlovskiy M.Yu. Technology of low-frequency piezothromboelastography in the assessment of hemostatic potential. *Vestnik novikh meditsinskih tekhnologiy.* 2016; 4 [In Russ.] DOI: 10.12737/22220

17. Kinzersky A.A., Dolgikh V.T., Korzhuk M.S. Method for obtaining reference values of low-frequency piezothromboelastography in male rats of the Wistar line. *Sibirsky meditsinsky zhurnal (Irkutsk).* 2016; 142 (3): 25-28 [In Russ.].

18. Kinzersky A.A., Dolgikh V.T., Korzhuk M.S. Normal values of low-frequency piezothromboelastography of male Wistar rats obtained under xylazine + tiletamine-zolazepam anesthesia during blood sampling from the carotid artery. Certificate of state registration of the database No.2016620346. Bull. 2016. 4 [In Russ.].

19. Kinzersky A.A., Petrova Yu.A., Korzhuk M.S., Dolgikh V.T. Normal values of the general, biochemical analysis of blood and coagulogram of male rats of the Wistar line. Certificate of state registration of the database No. 2017620486. Bull. 2017; 5 [In Russ.].

20. Lipatov V.A., Severinov D.A., Kryukov A.A., Saakyan A.R. Ethical and legal aspects of experimental biomedical research in vivo. Part II. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik im. I.P. Pavlova.* 2019; 27 (2): 245-257. DOI: 10.23888/PAVLOVJ2019272245-257 [In Russ.]

21. Kinzersky A.A., Dolgikh V.T., Korzhuk M.S. Temporal and structural indicators of thrombogenesis dynamics of low-frequency piezothromboelastography of male Wistar rats obtained under xylazine + tiletamine-zolazepam anesthesia during blood sampling from the carotid

- стотной пьезотромбоэластографии крыс-самцов wistar, полученные под ксилазин+тилетамин/золазепам анестезией при заборе крови из сонной артерии № 201662071 // Бюл. № 6. Опубликовано 01.06.2016.
22. *Мастыцкий С.Э., Шитиков В.К.* Статистический анализ и визуализация данных с помощью R. Хайдельберг — Лондон — Тольятти. 2014: 401
 23. *Haas T., Mauch J., Weiss M., Schmugge M.* Management of dilutional coagulopathy during pediatric major surgery. *Transfus Med Hemother.* 2012; 39 (2): 114–119. DOI: 10.1159/000337245
 24. *Долгов В.В., Свириц П.В.* Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М. — Тверь: ООО издательство «Триада»; 2005: 227. ISBN 5-94789-114-X
 25. *Ruttman T.G., Lemmens H.J.M., Malott K.A., Brock-Utne J.G.* The haemodilution enhanced onset of coagulation as measured by the thrombelastogram is transient. *Eur J Anaesthesiol.* 2006; 23 (7): 574-579. DOI: 10.1017/S0265021506000238
 26. *Veigas P.V., Callum J., Rizoli S., Nascimento B., Luz L.T.* A systematic review on the rotational thrombelastometry (ROTEM®) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* 2016; 24 (1): 114. DOI: 10.1186/s13049-016-0308-2
 27. *Morris B.R., Laforcade A, Lee J., Palmisano J., Meola D., Rozanski E.* Effects of in vitro hemodilution with crystalloids, colloids, and plasma on canine whole blood coagulation as determined by kaolin-activated thromboelastography. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2016; 26 (1): 58-63. DOI: 10.1111/vec.12345
 28. *Schäfer N., Driessen A., Bauerfeind U., Fröhlich M., Ofir J., Stürmer E. K., Maegle M.* In vitro effects of different sources of fibrinogen supplementation on clot initiation and stability in a model of dilutional coagulopathy. *Transfus Med.* 2016; 26 (5): 373–380. DOI.org/10.1111/tme.12333
 29. *Sevcikova S., Durila M., Vymazal T.* Rotational thromboelastometry assessment of ballanced crystalloid, hydroxyethyl starch and gelatin effects on coagulation: a randomized trial. *Rev Bras Anesthesiol.* 2019; 69 (4): 383–389. DOI: 10.1016/j.bjan.2019.03.009
 30. *Kam P., Varanasi S., Yang K.X.* The effects of haemodilution with succinylated gelatin solution on coagulation in vitro as assessed by thromboelastometry and impedance (multiple electrode) aggregometry. *Anaesth Intensive Care.* 2018; 46 (3): 272–277. DOI: 10.1177/0310057X1804600304
 - artery. Certificate of state registration of the database No. 201662071. *Bull.* 2016; 6 [In Russ.]
 22. *Mastitsky S.E., Shitikov V.K.* Statistical analysis and visualization of data using R. Khaydelberg-London-Toliyatti. 2014: 401 [In Russ.]
 23. *Haas T., Mauch J., Weiss M., Schmugge M.* Management of dilutional coagulopathy during pediatric major surgery. *Transfus Med Hemother.* 2012; 39 (2): 114–119. DOI: 10.1159/000337245
 24. *Dolgov V.V., Svirin P.V.* Laboratory diagnostics of hemostatic disorders. M.- Tver: Triad Publishing Company LLC; 2005: 227 [In Russ.]. ISBN 5-94789-114-X
 25. *Ruttman T.G., Lemmens H.J.M., Malott K.A., Brock-Utne J.G.* The haemodilution enhanced onset of coagulation as measured by the thrombelastogram is transient. *Eur J Anaesthesiol.* 2006; 23 (7): 574-579. DOI: 10.1017/S0265021506000238
 26. *Veigas P.V., Callum J., Rizoli S., Nascimento B., Luz L.T.* A systematic review on the rotational thrombelastometry (ROTEM®) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* 2016; 24 (1): 114. DOI: 10.1186/s13049-016-0308-2
 27. *Morris B.R., Laforcade A, Lee J., Palmisano J., Meola D., Rozanski E.* Effects of in vitro hemodilution with crystalloids, colloids, and plasma on canine whole blood coagulation as determined by kaolin-activated thromboelastography. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2016; 26 (1): 58-63. DOI: 10.1111/vec.12345
 28. *Schäfer N., Driessen A., Bauerfeind U., Fröhlich M., Ofir J., Stürmer E. K., Maegle M.* In vitro effects of different sources of fibrinogen supplementation on clot initiation and stability in a model of dilutional coagulopathy. *Transfus Med.* 2016; 26 (5): 373-380. DOI.org/10.1111/tme.12333
 29. *Sevcikova S., Durila M., Vymazal T.* Rotational thromboelastometry assessment of ballanced crystalloid, hydroxyethyl starch and gelatin effects on coagulation: a randomized trial. *Rev Bras Anesthesiol.* 2019; 69 (4): 383-389. DOI: 10.1016/j.bjan.2019.03.009
 30. *Kam P., Varanasi S., Yang K.X.* The effects of haemodilution with succinylated gelatin solution on coagulation in vitro as assessed by thromboelastometry and impedance (multiple electrode) aggregometry. *Anaesth Intensive Care.* 2018; 46 (3): 272-277. DOI: 10.1177/0310057X1804600304

Поступила 17.06.20
Онлайн 20.07.2021

Received 17.06.20
Online first 20.07.2021