УДК 616.155.2:612.014.469

КОРРЕКЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ЭНДОТОКСИКОЗЕ

Власов А.П., Анаскин С.Г., Шевалаев Г.А., Зеленцов П.В., Суворова Л.А., Сатыбалдин О.А.

ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева», Саранск, e-mail: vap.61@yandex.ru

Изучено влияние антиоксидантов (на примере этоксидола) и антагонистов кальция (на примере верапамила) на агрегационную активность тромбоцитов при перитоните. Экспериментальными исследованиями показано, что одним из звеньев в патогенезе острого перитонита является расстройство клеточного гемостаза. Это происходит на фоне активизации процессов перекисного окисления липидов, угнетения активности ключевых ферментов антиоксидантной системы. Между изменениями показателей клеточного гемостаза, активности перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы имеется прямая сильная зависимость (r = 0,73–0,92). В работе установлен факт положительного воздействия комбинации этоксидола и верапамила на функциональное состояние тромбоцитов при экспериментальном перитоните, что связано со снижением выраженности процессов перекисного окисления липидов, повышением активности антиоксидантных ферментов и, вероятно, влиянием на Ca^{2+}-каналы. С целью коррекции расстройств клеточного компонента гемостаза при перитоните показано применение комбинированной терапии, включающей антиоксиданты и антогонисты кальция.

Ключевые слова: эндогенная интоксикация, тромбоциты, этоксидол, верапамил

CORRECTION OF THROMBOCYTES FUNCTIONAL CONDITIONS AT ENDOGENIC INTOXICATION

Vlasov A.P., Anaskin S.G., Shevalayev G.A., Zelentsov P.V., Suvorova L.A., Satybaldin O.A.

Mordvinian State University, Saransk, e-mail: vap.61@yandex.ru

The effect of antioxidants (for example etoksidolum) and calcium antagonists (for example, verapamilum) on platelet aggregation in peritonitis. Experimental research has shown that one of the elements in the pathogenesis of acute peritonitis is a disorder of cellular hemostasis. This is against a background of enhanced lipid peroxidation, inhibition of key enzymes of the antioxidant system. Between the changes of cellular hemostasis, the activity of lipid peroxidation and antioxidant system in a direct strong relationship (r = 0,73–0,92). The paper established that the positive effects of the combination etoksidolum and verapamilum on the functional state of platelets in experimental peritonitis, which is associated with a significant reduction in lipid peroxidation, increased the activity of antioxidant enzymes, and probably influenced by Ca^{2+}-channels. To correct the cellular component of hemostasis disorders in peritonitis shows the use of combination therapy, including antioxidants and calcium antagonists.

Keywords: endogenic intoxication, thrombocytes, etoxidolum, verapamilum

Тромбогеморрагические осложнения по праву относят к одним из самых грозных спутников различных заболеваний. В патогенезе их большую роль отводят тромбоцитарному компоненту гемостаза. Известно, что функция тромбоцитов при различных заболеваниях существенно изменяется [6]. Нарушения тромбоцитарного звена гемостаза во многом опосредованы изменениями в химическом составе крови. Важная роль в активации системы гемостаза отводится перекисному окислению липидов (ПОЛ) [1, 2]. Образующиеся при ПОЛ продукты являются мощными окислителями, более активными, чем кислород. Они представляют угрозу клеточной целостности и играют важную роль в клеточном повреждении. С другой стороны, пероксидация липидов приводит к нарушению процессов нормального функционирования «калий-натриевого насоса» и поступлению в клетки кальция, что способствует повышению «коагуляционного» потенциала самой клетки, активации фосфолипаз, повышению проницаемости клеточных мембран [7]. При повреждении клеточных мембран обнажаются слои фосфолипидов, которые являются матрицей для запуска каскада ферментативных реакций процесса свертывания [4, 5]. Следовательно, одни из возможных фармакологических путей коррекции клеточной активности могут реализовываться через управление процессами перекисного окисления липидов и содержанием внутриклеточного кальция [3]. Это явилось основанием для изучения влияния антиоксидантов (на примере этоксидола) и антагонистов кальция (на примере верапамила) на агрегационную активность тромбоцитов. Перитонит взят в качестве модельного заболевания потому, что при этой патологии возникает выраженная эндогенная интоксикация.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач были проведены хронические опыты на 20 взрослых беспородных половозрелых собаках обоего пола массой от 8,7 до 15,2 кг, разделенных на следующие группы. В первой серии опытов (10 животных) исследовали в динамике агрегационную активность тромбоцитов и перекисное окисление липидов плазмы крови при перито-

ните. Во второй серии (10 животных) аналогичные исследования проводили на фоне комбинированного применения этоксидола и верапамила. Моделирование перитонита производилось следующим образом. Под тиопентал-натриевым наркозом (0,04 г/кг массы) животным в брюшную полость шприцем вводили 20% каловую взвесь из расчета 0,5 мл/кг массы животного. Через сутки под наркозом выполняли лапаротомию, лаваж брюшной полости, забор венозной крови. В контрольные сроки (1, 3, 5, 7-е сутки) повторно осуществляли забор венозной крови. В послеоперационном периоде животным второй группы ежедневно выполнялись внутривенные введения 10% раствора этоксидола из расчета 10 мг/кг массы тела и раствора верапамила из расчета 1,5 мг/кг массы тела.

Степень эндогенной интоксикации оценивали по уровню токсических продуктов гидрофильной и гидрофобной природы. Агрегационную активность тромбоцитов регистрировали оптическим методом с помощью двулучевого агрегометра THROMLITE 1006. Степень липопероксидации определяли по количеству начальных (диеновых конъюгатов) и вторичных (триеновых конъюгатов, ТБК-реагирующих) продуктов. Антиоксидантную активность плазмы крови определяли по активности супероксиддисмутазы и каталазы.

Содержание диеновых и триеновых конъюгатов оценивали спектрофотометрическим методом (Ганстон Ф.Д., 1986). Уровень малонового диальдегида определяли спектрофотометрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Sigma) (Егоров Д.Ю., Козлов А.В., 1988). Активность супероксиддисмутазы определяли по способности фермента тормозить аэробное восстановление нитросинего тетразолия до формазана (Гуревич В.С. и др., 1990; Досон Р. и др., 1991). Оценивали активность каталазы (Королюк М.А., 1988).

Исследования выполнялись в соответствии с этическими требованиями к работе с экспериментальными животными («Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.), Федеральный закон «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г., приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики»), одобрены локальным этическим комитетом.

Статистическую обработку полученных данных производили общепринятыми методами статистики с определением достоверности различий между данными в опытной и контрольной группах на основе расчета критерия Стьюдента, корреляционную связь оценивали по критерию r. Выявленные закономерности и связи изучаемых параметров между группами и признаками были значимыми при вероятности безошибочного прогноза $p = 95\%$ и более.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами установлено, что при моделируемом перитоните, а он оказывался разлитым серозно-фибринозным, у животных возникала выраженная эндогенная интоксикация, нарушения агрегационной активности тромбоцитов, активизация свободно-радикальных процессов и угнетение активности основных антиоксидантных ферментов. Причем эти нарушения ряда показателей гомеостаза в группах были сопоставимы между собой. Это позволяло нам считать, с одной стороны, что модель перитонита выбрана адекватно и что «стартовые» условия проведения экспериментальных исследований были одинаковыми – с другой.

Основными параметрами, характеризующими кинетику агрегации, являются: время задержки – интервал времени до начала агрегации после добавления индуктора; лаг-период – отрезок, отсекаемый на оси времени касательной, проведенной к кривой агрегации в точке перегиба; степень агрегации – максимальное относительное изменение светопропускания в результате агрегации; начальная и максимальная скорости, представляющие тангенс угла наклона указанной касательной; время и характер агрегации. В наших исследованиях по изучению кинетики агрегации тромбоцитов у животных формально начальная и максимальная скорости агрегации равны и поэтому в дальнейшем будут обозначаться как максимальная скорость агрегации; также близкие значения имеют лаг-период и время задержки, значения которых в дальнейшем не обсуждаются.

Нами установлено, что через сутки после оперативного вмешательства в изученных параметрах функционального состояния тромбоцитов наблюдались следующие изменения. Скорость АДФ-индуцированной агрегации возрастала на 345,3%, степень – на 85,2% ($p < 0{,}001$), время укорачивалось на 36,5% относительно нормы. По истечении трех суток после операции имевшие место изменения параметров функционального состояния тромбоцитов сохранялись. Через 5 суток кинетические показатели тромбоцитов под действием АДФ несколько улучшались, но нормальных значений не достигали. В срок 7 суток после операции агрегационная активность тромбоцитов под действием АДФ по всем регистрированным параметрам была сопоставима с исходным уровнем.

Анализ полученных результатов исследований агрегационной активности тромбоцитов при перитоните показал, что при моделируемой патологии агрегационная активность кровяных пластинок повышалась. Особенно выраженные изменения в изученных параметрах функционального состояния тромбоцитов отмечались до операции и через сутки после оперативного лечения. Через 5–7 суток агрегационная способность тромбоцитов достигала исходного уровня.

Известно, что агрегационная активность тромбоцитов, как указано выше, во многом зависит от перекисного окисления липидов. Поэтому нами исследованы

свободно-радикальные реакции и состояние антиоксидантного потенциала плазмы крови. Оказалось, что через сутки после санации брюшной полости содержание диеновых и триеновых конъюгатов в плазме крови увеличивалось соответственно на 180,3 и 154,2% ($p < 0,05$), а уровень ТБК-реагирующих продуктов возрастал на 224,1% ($p < 0,05$). На третьи и пятые сутки после операции содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови несколько снижалось, но тем не менее по отношению к показателям нормы уровень их был увеличенным. Через 7 суток после операции при такой модели перитонита процессы перекисного окисления липидов соответствовали таковым здоровых животных (рис. 1).

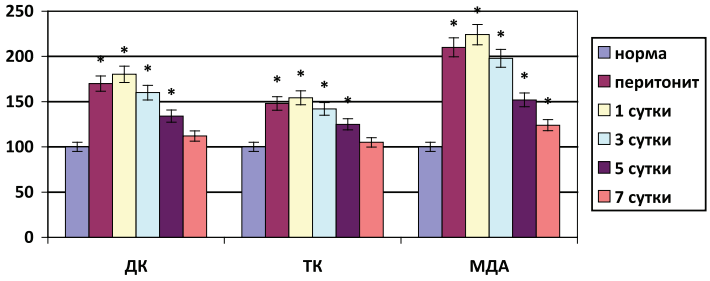

Рис. 1. Содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови при остром перитоните (– достоверность отличий относительно нормы при p < 0,05; ДК – диеновые конъюгаты, ТК – триеновые конъюгаты, МДА – малоновый диальдегид)*

Нами установлено, что при остром экспериментальном перитоните повышение интенсивности процессов перекисного окисления липидов сопровождалось снижением активности антиоксидантных ферментов. Через сутки после санации брюшной полости активность супероксиддисмутазы и каталазы снижалась соответственно на 63,6 и 51,4% ($p < 0,05$), через 3 суток – на 35,5% ($p < 0,05$) и 33,1% ($p < 0,05$) соответственно. В следующий контрольный срок 5 суток после операции активность супероксиддисмутазы и каталазы в плазме крови сохранялась пониженной. К концу наблюдаемого периода активность антиоксидантных ферментов восстанавливалась.

Таким образом, при моделируемой патологии изменение показателей функционального состояния кровяных пластинок во многом сопоставимо с состоянием процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной ферментной защиты на уровне плазмы крови. Установлено, что по мере уменьшения воспалительных явлений брюшины и эндогенной интоксикации происходит нормализация агрегационной активности тромбоцитов, стихание процессов ПОЛ и восстановление активности антиоксидантных энзимов.

В опытной группе нами апробировано комбинированное влияние этоксидола и верапамила на тромбоцитарный гемостаз и перекисное окисление липидов. Через сутки после оперативного вмешательства под влиянием препаратов происходили следующие изменения в изученных параметрах функционального состояния кровяных пластинок. Скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов по сравнению с контрольными данными (за контрольные приняты данные первой серии опытов) уменьшалась на 24,5% ($p < 0,05$), степень – на 20,9% ($p < 0,05$), время удлинялось на 23,4% ($p < 0,05$) (рис. 2).

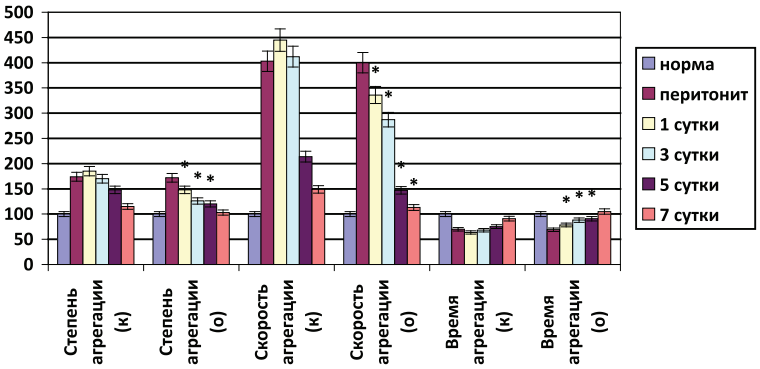

*Рис. 2. Агрегационная активность тромбоцитов при остром перитоните на фоне применения этоксидола и верапамила (к – контрольная группа, о – опытная группа; * – достоверность отличий относительно контроля при p < 0,05)*

Дальнейшее применение препаратов приводило к еще более выраженному уменьшению агрегационной активности тромбоцитов. Через 3 суток после операции исследованные параметры агрегационной активности тромбоцитов приближались к норме, а различия с контрольными данными были существенными. Так, скорость агрегации была ниже контрольной на 30,4% ($p < 0,05$), степень – на 25,4% ($p < 0,05$), а время агрегации – удлинялось на 29,3% ($p < 0,05$). Через 5 суток после оперативного вмешательства под влиянием этоксидола и верапамила основные кинетические показатели этих форменных элементов были приближены к нормальному уровню.

Исследования показали, что после введения одной дозы этоксидола и верапамила содержание диеновых и триеновых коньюгатов в плазме крови было меньше контрольных данных соответственно на 7,3% ($p > 0,05$) и 40,2% ($p < 0,05$). Уровень малонового диальдегида в плазме крови по отношению к контролю уменьшался на 24,2% ($p < 0,01$). Через 3 суток после операции содержание диеновых и триеновых коньюгатов в плазме крови под влиянием этоксидола и верапамила снижалось еще больше. По отношению к контрольным показателям оно соответственно составило 50,1% ($p < 0,05$) и 32,2% ($p < 0,05$). Уровень ТБК-активных продуктов в плазме крови снижался на 30,5% ($p < 0,05$). В срок 5–7 суток уровень начальных и конечных продуктов ПОЛ приближался к норме.

Было выявлено, что на первые сутки после санации брюшной полости активность супероксиддисмутазы и каталазы под влиянием апробированных лекарственных средств по сравнению с контролем повышалась соответственно на 132,4 и 65,1% ($p < 0,05$). Через 3 суток после операции активность исследованных ферментов антиоксидантной защиты плазмы крови по отношению к контролю повышалась соответственно на 34,1% ($p < 0,05$) и 30,5% ($p < 0,05$). В срок 5 суток после операции активность супероксиддисмутазы и каталазы плазмы крови по сравнению с контролем повышалась соответственно на 36,4 ($p < 0,05$) и 2,6% ($p > 0,05$), достоверно от нормы не отличаясь.

Заключение

Таким образом, анализируя результаты экспериментальных исследований, предоставляется возможным выделить следующие основные положения. Во-первых, исследования достаточно убедительно показали, что одним из звеньев в патогенезе острого перитонита является расстройство клеточного гемостаза. Это происходит на фоне активизации процессов перекисного окисления липидов, угнетения активности ключевых ферментов антиоксидантной системы. При корреляционном анализе показателей указанных компонентов гомеостаза при перитоните нами определена корреляционная зависимость ($r = 0,73–0,92$). Во-вторых, установлен факт положительного воздействия комбинации этоксидола и верапамила на функциональное состояние тромбоцитов при экспериментальном перитоните, что связано со снижением выраженности процессов перекисного окисления липидов, повышением активности антиоксидантных ферментов и, вероятно, влиянием на Ca^{2+}-каналы. Таким образом, с целью коррекции расстройств клеточного компонента гемостаза при эндогенной интоксикации перитонеального происхождения вполне уместно применение комбинированной терапии, включающей антиоксиданты и антагонисты кальция. В пользу этого свидетельствует еще и тот факт, что при данной патологии возникают достаточно выраженные нарушения липидного и ионного обмена.

Список литературы

1. Аксенова С.В. Влияние аэроионов кислорода на некоторые показатели системы гемостаза в норме и патологии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саранск, 1996. – 16 с.

2. Власов А.П., Трофимов В.А., Крылов В.Г. Системный липидный дистресс-синдром в хирургии. – М.: Наука, 2009. – 224 с.

3. Ельчева О.В. Фармакологическая коррекция тромбоцитраной дисфункции при экспериментальном перитоните: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саранск, 1997. – 16 с.

4. Мачабели М.С., Кузник Б.И., Скипетров В.П. Тромбогеморрагический синдром. – Тбилиси: Сабчота Сакартвело, 1989. – 148 с.

5. Скипетров В.П., Власов А.П., Голышенков С.П. Коагуляционно-литическая система тканей и тромбогеморрагический синдром в хирургии. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2011. – 192 с.

6. Трофимов В.А., Аширов Р.З., Власов А.П., Мельников В.М. Сравнительное исследование кинетики агрегации тромбоцитов при остром панкреатите // Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы: тезисы докладов I Российского Конгресса по патофизиологии. – М., 1996. – С. 99.

7. Jain S.K., Shohet S.B. Calcium patentiates the peroxidation of erytrocyte membrane lipids // Biochim. Biophys. Acta. – 1981. – № 1. – P. 46–54.

References

1. Aksenova S.V. Vlijanie ajeroionov kisloroda na nekotorye pokazateli sistemy gemostaza v norme i patologii // Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. Saransk, 1996. 16 p.

2. Vlasov A.P., Trofimov V.A., Krylov V.G. Sistemnyj lipidnyj distress-sindrom v hirurgii. M.: Nauka, 2009. 224 p.

3. El'cheva O.V. Farmakologicheskaja korrekcija trombocitranoj disfunkcii pri jeksperimental'nom peritonite // Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. Saransk, 1997. 16 p.

4. Machabeli M.S., Kuznik B.I., Skipetrov V.P. Trombogemorragicheskij sindrom. Tbilisi: Sabchota Sakartvelo, 1989. 148 p.

5. Skipetrov V.P., Vlasov A.P., Golyshenkov S.P. Koagul-jacionno-liticheskaja sistema tkanej i trombogemorragicheskij sindrom v hirurgii. Saransk: Izd-vo Mordov. un-ta, 2011. 192 p.

6. Trofimov V.A., Ashirov R.Z., Vlasov A.P., Mel'nikov V.M. Sravnitel'noe issledovanie kinetiki agregacii trombocitov pri ostrom pankreatite // Tezisy dokladov I Rossijskogo Kongressa po patofiziologii «Patofiziologija organov i sistem. Tipovye pa¬tologicheskie processy». M.,1996. pp. 99.

7. Jain S.K., Shohet S.B. Calcium patentiates the peroxidation of erytrocyte membrane lipids // Biochim. Biophys. Acta. 1981. no. 1. pp. 46–54.

Рецензенты:

Смолькина А.В., д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии медицинского факультета им. Т.З. Биктимирова ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск;

Рубцов О.Ю., д.м.н., профессор кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», г. Саранск.

Работа поступила в редакцию 21.01.2013.