

УДК 616.381-002-089-008.8

© Э.А.Петросян, В.И.Сергиенко, А.А.Боташев, О.А.Терещенко, Ю.В.Помещик, М.А.Хасаева

Оценка агрегационного состояния крови при лечении желчного перитонита натрия гипохлоритом

Э.А.ПЕТРОСЯН, В.И.СЕРГИЕНКО, А.А.БОТАШЕВ, О.А.ТЕРЕЩЕНКО, Ю.В.ПОМЕЩИК, М.А.ХАСАЕВА

The assesement of blood aggregation in the treatment of choleperitonitis with sodium hypochlorite

E.A.PETROSYAN, V.I.SERGIENKO, A.A.BOTASHEV, O.A.TERESHENKO, Yu.V.POMESHIK, M.A.KHASAEVA

Кубанский государственный медицинский университет

Научно-исследовательский институт физико-химической медицины, г. Москва

Институт молекулярных наук им. А.И.Виртанена, Университет Восточной Финляндии

У животных с желчным перитонитом на фоне повышения гематокрита и снижения деформируемости эритроцитов отмечается рост стимулирующего эффекта эритроцитов на агрегацию и секрецию тромбоцитов, и наоборот. При лечении животных в группе сравнения максимальное снижение МДА происходило на 7-е сутки, в то время как в опытной группе – на 3-е сутки. Исследование противотромботических свойств крови в суспензии тромбоцитов с тромбином у животных группы сравнения и опытной группы на 1, 3 и 7-е сутки, относительно образцов суспензии тромбоцитов интактных животных без тромбина, показало более высокую степень угнетения агрегации крови у животных опытной группы. Такой механизм говорит о том, что окислительное действие натрия-гипох (НГХ) не сводится просто к инактивации тромбинового рецептора и к прекращению действия тромбина. Не исключено, что, с одной стороны, эффект подавления агрегации тромбоцитов и, с другой, эффект угнетения циклооксигеназы НГХ обусловлены различными типами модификации плазматической мембраны тромбоцитов.

Ключевые слова: агрегация, кровь, желчный перитонит

Animals with choleperitonitis have a growth of erythrocytes stimulatory effect on platelets aggregation and secretion and vice versa, accompanied by the increase of hematocrit and the decrease of erythrocytes deformability. In the treatment of animals in the control group the maximum decrease of MDA occurred at day 7, while in the experimental group – at day 3. The study of blood antiaggregatory properties in the suspension of platelets with thrombin on animals of control group and experimental group at days 1, 3 and 7 with respect to the samples of the platelet suspension in intact animals without thrombin shows the higher degree of blood aggregation inhibition on animals of experimental group. Such a mechanism suggests that the oxidative effect of sodium hypochlorite is not simply inactivate of thrombin receptor and loss of the thrombin effect. It is possible that, on the one hand, the suppression of platelets aggregation and, on the other hand, the effect of cyclooxygenase inhibition by sodium hypochlorite are caused by different types of modification of the platelets plasmatic membrane.

Key words: aggregation, blood, bile peritonitis

Проблема желчного перитонита актуальна на фоне роста количества больных, страдающих желчно-каменной болезнью [1]. Ежегодно в мире выполняется до 2,5 млн. лапароскопических операций на желчном пузыре и желчевыводящих путях. При этом осложнения отмечены в 1,5 раза чаще, чем при открытой холецистэктомии [2], а желчный перитонит отмечается до 0,5% случаев [6], из которых в 12,2% он заканчивается летально [1]. Несвоевременно проведенная релапаротомия является причиной гибели от 50 до 100% больных желчным перитонитом [5].

Известно, что в условиях кровотока существует тесное взаимовлияние между мембранами тромбоцитов и эритроцитов [7]. Не исключено, что при эндотоксикозе происходит микрогемолиз эритроцитов с освобождением индуктора агрегации тромбоцитов – АДФ [13]. Помимо способности самих тромбоцитов

к агрегации, степень их внутрисосудистой агрегации будет определяться также влиянием эритроцитов и наоборот [14].

Одним из путей влияния на состояние внутрисосудистой агрегации является возможность ингибировать агрегационную активность тромбоцитов, независимо от природы стимула и механизма внутриклеточной передачи сигнала. В последние годы, в хирургии показана эффективность применения ковалентных антиагрегантов (ингибиторов тромбоцитов) для предупреждения внутрисосудистого тромбообразования, за счёт подавления функции тромбоцитов путем химической модификации клеточных молекулярных мишеней. Не менее эффективным средством подавления агрегации тромбоцитов является натрия гипохлорит (НГХ) – естественный продукт активированных нейтрофильных гранулоцитов [9]. Общеиз-

вестно, что ионы гипохлорита способны реагировать с аминокруппами и сульфидрильными группами [8], которые содержатся в большом количестве в плазматической мембране тромбоцитов.

Исходя из вышеизложенного, изучение влияния НГХ на тромбоцитарно-эритроцитарные взаимоотношения при желчном перитоните интересны в нескольких аспектах: а) клетки крови оказывают влияние друг на друга путем секреции в окружающую среду стимулирующих или ингибирующих соединений, одним из которых является гипохлорит-анион, образующийся в нейтрофильных гранулоцитах; б) влияние НГХ на тромбоцитарно-эритроцитарные взаимоотношения при лечении желчного перитонита не изучено.

Цель исследования – оценить влияние натрия гипохлорита на агрегационное состояние крови при лечении желчного перитонита.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 50 беспородных собаках-самцах, весом $14,7 \pm 1,2$ кг. В 1-ю, интактную, группу, для определения лабораторных показателей нормы, включены 50 собак, из которых 5 выводили из опыта для забора биоптатов; во 2-ю, контрольную, группу входили оставшиеся 45 животных, у которых создавали модель 24-часового желчного перитонита [10]. После создания модели перитонита из опыта выводили ещё 5 собак для забора биоптатов. Оставшиеся 40 животных с желчным перитонитом были разделены на группы: 3-ю (сравнения) и 4-ю (опытную) по 20 животных, соответственно.

Методика лечения перитонита проводилась по следующей схеме: выполняли лапаротомию и интраоперационную санацию брюшной полости антисептиком. Далее в брюшную полость заливали до 250,0 мл 0,04% раствора НГХ в качестве антимикробного средства и ушивали края раны. После санации животным группы сравнения и опытной группы проводили однократно кишечный диализ с использованием двухпросветного назоинтестинального зонда. Животным группы сравнения кишечный диализ выполняли с применением сбалансированного по химусу солевого корректирующего раствора [11], в то время, как животным опытной группы, кишечный диализ проводили с использованием 0,06% раствора НГХ. Лечебный эффект в обоих случаях достигался за счет активной аспирации и дезинтоксикации содержимого начального отдела тонкой кишки. Одновременно, животным группы сравнения проводилась внутривенная инфузия 0,9% раствора хлорида натрия в качестве средства дезинтоксикации, а животным опытной группы – внутривенная инфузия 0,04% раствора НГХ в качестве средства окислительной детоксикации. Манипуляцию повторяли через 12 часов после санации брюшной полости. Объем вводимых растворов составлял $\frac{1}{10}$ ОЦК животных.

Исследовали венозную кровь, которую смешивали с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали центрифугированием крови при 200 g в течение 10 мин. Бедную тромбоцитарную плазму (БТП) получали центрифугированием крови при 2000 g в течение 15 мин. Концентрацию тромбоцитов в ОТП доводили до 5×10^8 клеток в 1 мл разбавлением БТП. Изолированные тромбоциты получали из ОТП [12]. Количество тромбоцитов подсчитывали в камере Горяева.

Агрегацию тромбоцитов изучали методом светопропускания с применением анализатора агрегации тромбоцитов AP-2110 («Солар», Беларусь), путем сравнения их агрегации и секреции до и после добавления в ОТП плазму эритроцитов с величиной гематокрита равной 45-55%. При исследовании агрегации тромбоцитов в кювету вносили 250 мкл фосфатно-солевого буфера (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM CaCl_2) pH 7,35 и 250 мкл ОТП (концентрация клеток $2,5 \times 10^8$ клеток в 1 мл). Смесь инкубировали при 37° и перемешивании в течение 3 мин (в отсутствие и в присутствии ингибиторов), а затем добавляли индуктор агрегации (20 мкМ ADP («Reanal», Венгрия). Процесс агрегации тромбоцитов регистрировали по изменению светопропускания клеточной суспензии. Затем проводили повторное исследование агрегации, но уже после добавления в ОТП эритроцитарной массы с величиной гематокрита равной 10-45%. Поскольку ADP в использованной концентрации не вызывал агрегации эритроцитов, влияние последних на агрегацию тромбоцитов определялось прежде всего упругомеханическими свойствами. Изучение этих свойств у тромбоцитарных агрегантов под влиянием эритроцитов проводилось путем сравнения их воздействия на агрегацию тромбоцитов до и после искусственного снижения деформируемости эритроцитов (ДЭ) за счет уменьшения уровня АТФ в эритроцитах [3]. Чтобы оценить влияние эритроцитарных агрегантов на агрегацию тромбоцитов, в качестве агреганта использовали алциановый голубой ($0,1 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$), действующий на оба типа клеток [12]. Влияние эритроцитов на процесс высвобождения содержимого гранул тромбоцитов исследовали аналогичным образом. Секреторную способность тромбоцитов изучали по степени выброса из клетки АТФ люциферин-люциферазным методом [14]. При этом кривые секреции в присутствии эритроцитов корректировали по эффекту внутреннего фильтра с постоянным проведением калибровок стандартным раствором АТФ (10^{-6}M).

Для определения деформируемости (жесткости мембран) суспензию эритроцитов в физиологическом растворе с объемной долей гематокрита 15% пропускали через амидный фильтр, диаметр пор 5 мкм. Рассчитывали индекс фильтрации, как отношение времени прохождения через фильтр 1,0 мл суспензии эритроцитов ко времени фильтрации 1,0 мл физиоло-

гического раствора. При этом оба типа исследований проводили в трех вариантах. В 1-ом варианте исследовали агрегацию и деформируемость эритроцитов ресуспендированных в фосфатно-солевом буфере (рН 7,35), во 2-ом – агрегацию и ДЭ исследовали в БТП, в 3-ем – исследовали агрегацию и ДЭ также в БТП, но полученной из ОТП после индукции в ней агрегации и секреции тромбоцитов под действием ADP. Разница между 1-ой и 2-ой пробами характеризует влияние на исследуемые параметры функционального состояния эритроцитов плазменных белков, а между 2-ой и 3-ей – влияние веществ, высвобождаемых тромбоцитами при их активации.

Для исследования циклооксигеназного перекисного окисления арахидоновой кислоты в суспензию тромбоцитов с концентрацией клеток равной $2,5 \times 10^8$ клеток в 1 мл добавляли CaCl_2 (0,5мМ) и тромбин в конечной концентрации 0,04 ед. активности на 1,0 мл. Показателем была концентрация малонового диальдегида (МДА), образующегося при 37 С за 20 мин. Его определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [4]. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре (СФ-2000). Исследования проводились до и после создания модели желчного перитонита на 1, 3 и 7-е сутки. Эксперименты проведены с соблюдением требований XI Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации [1964], Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [1985] и Правилами лабораторной практики в РФ [приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.].

Материалы исследований обработаны с помощью пакета прикладных программ «Microsoft Exel» и «Statistica 6,0» для Windows «StatSoft.Inc». Данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего $M \pm m$, а при непараметрическом характере распределения величин с применением критериев Манна-Уитни и Вилкоксона. Различия считались достоверными при двустороннем уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что влияние эритроцитов на агрегацию и секрецию тромбоцитов зависит от величины гематокрита. Так, эритроциты интактных животных, у которых величина гематокрита составляла $39,5 \pm 1,2\%$, способствовали повышению агрегационной активности тромбоцитов на $51,9 \pm 4,6\%$, в то время, как у животных контрольной группы с 24-часовым желчным перитонитом на фоне повышения гематокрита до $52,4 \pm 1,3\%$ и снижения деформируемости эритроцитов на 20-30%, происходило повышение агрегационной активности тромбоцитов до $115,1 \pm 5,0\%$ относительно интактных животных ($p < 0,01$). По-видимому, это воздействие эритроцитов будет еще большим в случае развития внутрисосудистой агрегации, которое полу-

чило подтверждение, когда в качестве агреганта алцианового голубого в присутствии эритроцитов агрегация тромбоцитов повысилась на $87,2 \pm 6,3\%$ ($p < 0,01$). Не менее значительным, чем воздействие эритроцитов на тромбоциты, было и обратное влияние. При индукции агрегации и секреции тромбоцитов в ОТП, агрегация эритроцитов достоверно увеличилась по сравнению с таковой в присутствии БТП без агрегации на $10,2 \pm 8,9\%$ ($p < 0,05$), а деформируемость эритроцитов достоверно понизилась на $15,0 \pm 1,6\%$ ($p < 0,05$).

Исходя из вышеизложенного, функциональное состояние тромбоцитов и эритроцитов при экспериментальном желчном перитоните определяется не только внутренней динамикой организации этих клеток, но и характером их взаимодействия. При этом особенно важно подчеркнуть, что эти взаимодействия могут взаимно индуцироваться. Так, изменения деформируемости эритроцитов способствуют внутрисосудистой агрегации тромбоцитов, которая в свою очередь приведет к дополнительному понижению деформируемости эритроцитов и т. д. На этот процесс оказывают влияние и изменения физико-химических свойств плазмы. Так, у животных контрольной группы с желчным перитонитом плазменные факторы достоверно понижают деформируемость эритроцитов и повышают проагрегантные свойства в отношении тромбоцитов и эритроцитов больше, чем у интактных животных ($p < 0,05$). Отсюда внутрисосудистая агрегация и секреция тромбоцитов зависит не только от способности тромбоцитов к агрегации и наличия в кровотоке агрегантов, но и от степени деформируемости эритроцитов.

Таким образом, полученные результаты указывают, что помимо отдельной оценки параметров функционального состояния тромбоцитов и эритроцитов при желчном перитоните необходимо проводить анализ процессов их взаимодействий, так как очевидно, что внутрисосудистая агрегация тромбоцитов провоцируется именно изменениями свойств эритроцитов.

В группе сравнения максимальное угнетение агрегационной активности тромбоцитов, индуцируемое ADP в составе ОТП, происходит на 3-е сутки с величиной гематокрита равной $39,6 \pm 0,87\%$, снижение деформируемости эритроцитов на $45 \pm 1,1\%$. Одновременно наблюдался достоверный рост стимулирующего эффекта эритроцитов до $144,5 \pm 5,4\%$ относительно животных контрольной группы с 24-часовым желчным перитонитом ($p < 0,001$). В опытной группе животных на 1-е сутки наблюдалось максимальное угнетение агрегационной активности тромбоцитов, индуцируемое ADP в составе ОТП, с величиной гематокрита $38,3 \pm 1,05\%$, снижение деформируемости эритроцитов на $39 \pm 1,7\%$ и рост стимулирующего эффекта эритроцитов до $178,5 \pm 4,8\%$ относительно животных контрольной группы ($p < 0,001$).

Аналогичная картина наблюдалась, как в группе сравнения, так и в опытной группе, в отношении секреции из тромбоцитов АТФ в присутствии эритроцитов. При этом эффект эритроцитов не зависел от используемого индуктора агрегации.

У животных контрольной группы в образцах суспензии тромбоцитов с тромбином происходило достоверное повышение содержания МДА до 460 ± 30 отн. ед. относительно интактных животных, величина которого принималась за 100 отн. ед. ($p < 0,001$). При лечении животных в группе сравнения максимальное снижение содержания МДА происходило на 7-е сутки до 226 ± 10 отн. ед. ($p < 0,01$) относительно образцов суспензии тромбоцитов контрольных животных, в то время как у животных опытной группы – на 3-и сутки до 135 ± 7 отн. ед. ($p < 0,001$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что максимальное угнетение циклооксигеназного перекисного окисления арахидоновой кислоты в группе сравнения происходит в более поздние сроки, чем в опытной. По-видимому, применение натрия гипохлорита способствует модификации мембранных структур тромбоцитов, обеспечивающих функционирование механизмов внутриклеточной трансдукции сигнала, участвующего в реакции активации циклооксигеназы.

Сравнительное исследование противосвертывающих свойств крови в образцах суспензии тромбоцитов с тромбином у животных группы сравнения и опытной группы на 1, 3 и 7-е сутки, относительно образцов суспензии тромбоцитов интактных животных без тромбина (величина принималась за 0%), показало достоверное угнетение степени агрегации тромбоцитов у животных опытной группы, соответственно на 50%, 30% и 20% против 26%, 11% и 5% в группе сравнения ($p < 0,001-0,05$), что может быть обусловлено, в первую очередь, образованием хлораминовых производных.

Заключение

Полученные данные показали, что в опытной группе животных происходит максимальное угнетение натрия гипохлоритом агрегации тромбоцитов, индуцируемое тромбином. Такой механизм указывает на то, что окислительное действие натрия гипохлорита не сводится просто к инактивации тромбиновых рецепторов и прекращению действия тромбина. Не исключено, что с одной стороны, имеет место эффект подавления агрегации тромбоцитов, а с другой стороны, эффект угнетения циклооксигеназного перекисного окисления арахидоновой кислоты, который обусловлен различными типами модификации плазматической мембраны тромбоцитов.

Список литературы

1. *Багненко С.Ф., Мосягин В.Б., Карпова Е.А.* Желчный перитонит как осложнение лапароскопической холецистэктомии. Эндоскопическая хирургия. 2000; 2: 6-7.
2. *Бойко В.В., Федак Б.С., Песоцкий О.Н. и соавт.* Опыт применения мини-лапаротомий при хирургических вмешательствах на органах гепатобилиарной системы. Медицина неотложных состояний. 2007; 4: <http://urgent.mif-ua.com/archive/issue-501/article-523/>.
3. *Габриелян Э.С., Акопов С.Э.* Клетки крови и кровообращение. Ереван. 1985; 236.
4. *Горюнов А.В., Роцупкин Д.И.* Перекисное окисление липидов в тромбоцитах, индуцированное УФ-излучением. Биол. мембраны. 1989; 5: 551-554.
5. *Козлов А.В., Таразов П.Г., Гранов Д.А. и соавт.* Методы интервенционной радиологии у больных раком печени и желчных протоков, осложненным механической желтухой. Анналы хирургической гепатологии. 2004; 1: 10-19.
6. *Меджидов Р.Т., Алиев М.А., Хамидов М.А. и соавт.* Сложные и нерешенные вопросы лапароскопической холецистэктомии. Тез. юбил. пленума правления РОЭХ. Сочи, 2005; <http://www.laparoscopy.ru/article/51104-sochi.html>.
7. *Молчанова Т.П.* Основы молекулярной организации белков мембраны эритроцитов и их дефекты, приводящие к гемолитическим анемиям. Гематология и трансфузиология. 1987; 4: 32-41.
8. *Мурина М.А., Сергиенко В.И., Роцупкин Д.И.* Прямое и косвенное противосвертывающее действие гипохлорита натрия на обогащенную тромбоцитами плазму крови. Бюл. exper. биол. 1989; 12: 702-704.
9. *Мурина М.А., Трунилина Н.Н., Роцупкин Д.И. и соавт.* Ингибирование агрегации тромбоцитов при действии гипохлорита натрия. Влияние компонентов плазмы крови. Бюл. exper. биол. и мед. 1995; 5: 488-490.
10. *Петросян Э.А., Сергиенко В.И., Каде А.Х. и соавт.* Способ моделирования желчного перитонита. Патент №2175784 РФ, МКИ6 А61 В 17/00. Оpubл. 10.11.2001; БИ №31.
11. *Попова Т.С., Тамазашвили Т.Ш., Шестопалов А.Е.* Парентеральное и энтеральное питание в хирургии. М. 1996; 221.
12. *Тунян К.С., Акопов С.Э., Мартиросян Г.Р., Бакунц Г.О.* Реологические свойства у больных с нарушениями мозгового кровообращения. Клиническая медицина. 1982; 10: 35-39.
13. *Eldor A., Durst R., Hy-Am E. et al.* A chronic hypercoagulable state in patients with beta-thalassemia major is already present in childhood. Br. J. Haematol. 1999; 107: 739-746.
14. *Palinski W., Torsellini A.* Thrombos. Haernostas. 1983; 49: 84-86.

Поступила 17.08.2011 г.

Информация об авторах

1. Петросян Эдуард Арутюнович – д.м.н., проф., зав. кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии Кубанского государственного медицинского университета; e-mail: superego_ksmu@mail.ru
2. Сергиенко Валерий Иванович – д.м.н., проф., академик РАМН, директор научно-исследовательского института физико-химической медицины, г. Москва. e-mail: vll@pochta.ru
3. Терещенко Олег Анатольевич – к.м.н., зав. отд детской хирургии Детской краевой клинической больницы, г. Краснодар; e-mail: superego_ksmu@mail.ru
4. Боташев Алибек Амырбиевич – к.м.н., хирург Кироводской центральной городской больницы.
5. Помещик Юрий Владимирович, к.м.н., научный сотрудник Отдела нейробиологии, Институт молекулярных наук им. А.И.Виртанена, Университет Восточной Финляндии; e-mail: yuriy.pomeshchik@mail.ru
6. Хасаева Марина Александровна, асс. кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Кубанского государственного медицинского университета; e-mail: superego_ksmu@mail.ru