

**АКТИВАЦИЯ ПЕРВИЧНОГО ГЕМОСТАЗА У НОВОРОЖДЕННЫХ
ТЕЛЯТ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ПИЩЕВАРЕНИЯ**

Медведев И.Н., Белова Т.А.

Курский институт социального образования (филиал) РГСУ

8 (4712) 56-24-60

E-mail: kiso@046.ru

Исследование дисфункций первичного гемостаза у новорожденных телят, имеющих функциональные нарушения пищеварения, имеет важное научное и практическое значение вследствие того, что именно усиление тромбоцитарной активности играет главную роль в активации гемостаза в целом, увеличении вязкости и ухудшении микроциркуляции крови с ростом риска внутрисосудистого тромбообразования. При этом, недостаточно изучены нарушения агрегации тромбоцитов, антиагрегационная активность стенки сосудов и интрасосудистая активность кровяных пластинок у новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения. Не выявлены нарушения у новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения липидного состава их мембран, уровня пероксидации и антиоксидантной защиты тромбоцитов и активности обмена в них арахидоновой кислоты. В доступной литературе имеются отрывочные сведения о том, что функциональные нарушения пищеварения сопровождается у новорожденных телят нарастанием содержания в плазме средних молекул (СМ) [7], способных пагубно влиять на многие функции организма. Не оценен уровень СМ в тромбоцитах, до которого нарастает их содержание у новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения, способствуя во многом развитию тромбоцитарных дисфункций.

Цель работы – выяснить особенности нарушения первичного гемостаза у новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения.

Материалы и методы.

В исследование включено 153 новорожденных теленка с функциональными нарушениями пищеварения сроком 1-3 дня от здоровых коров 1-2 отела. Кормление животных и содержание велось в стандартных условиях телятника. Группа контроля представлена 267 здоровыми новорожденными телятами. Взятие крови у животных

проводилось в утренние часы. Определялись следующие показатели. Содержание средних молекул (СМ) в плазме и отмытых и ресуспендированных тромбоцитах оценивали по [2]. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) плазмы выявляли по содержанию ТБК-активных продуктов набором фирмы ООО „Агат-Мед”, ацилгидроперекисей (АГП) [3], а активность внутритромбоцитарного ПОЛ по содержанию базального уровня малонового диальдегида (МДА) в реакции восстановления тиобарбитуровой кислотой [14], в модификации [9] и АГП [3]. Внутритромбоцитарную антиоксидантную систему тромбоцитов оценивали по активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) по [10].

В отмытых и ресуспендированных тромбоцитах определяли содержание холестерина энзиматическим колориметрическим методом набором фирмы „Витал Диагностикум” и фосфолипидов по фосфору [8]. Оценивали активность и время образования эндогенного тромбопластина [12]. Косвенную оценку уровня обмена арахидоновой кислоты в тромбоцитах и ферментов ее превращения - циклооксигеназы и тромбоксансинтетазы проводили с помощью 3 проб переноса по методу Ермолаевой Т.А. и соавт. (1992) с регистрацией агрегации тромбоцитов (АТ) на фотоэлектроколориметре [6]. Подсчитывалось количество тромбоцитов в капиллярной крови в камере Горяева. Агрегационная способность тромбоцитов исследовалась визуальным микрометодом [4] по Шитиковой А.С. (1999) с индукторами АДФ ($0,5 \times 10^{-4}$ М.), коллагеном (разведение 1:2 основной суспензии), тромбином (0,125 ед/мл.), ристомицином (0,8 мг/мл.) (НПО „Ренам”), адреналином (5×10^{-6} М., завод Гедеон Рихтер А.О.). С целью моделирования реальных условий кровотока применены сочетания индукторов АДФ+адреналин, АДФ+коллаген и адреналин+коллаген в тех же концентрациях. Морфологически внутрисосудистая активность тромбоцитов (ВАТ) оценивалась с использованием фазовоконтрастного микроскопа [11] по Шитиковой А.С. и соавт. (1997). Состояние антиагрегационной активности стенки сосуда со всеми использованными индукторами оценивалось по Балуда В.П. и соавт. (1983) на фоне временной венозной окклюзии с расчетом индекса антиагрегационной активности сосудистой стенки (ИААСС). Обработка полученных результатов проведена с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования.

У новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения выявлено повышение активности ПОЛ плазмы. При этом, концентрация ТБК-активных продуктов в плазме была на уровне $5,10 \pm 0,02$ мкмоль/л., в контроле – $3,92 \pm 0,06$ мкмоль/л. Содержание МДА в тромбоцитах было также повышено ($1,54 \pm 0,004$ нмоль/ 10^9 тр.) против контроля ($0,89 \pm 0,02$ нмоль/ 10^9 тр.), указывая на активацию в них свободно-радикального окисления (СРО) за счет ослабления внутритромбоцитарной антиокислительной активности. Количество АГП в плазме больных телят достигало $3,50 \pm 0,01$ Д₂₃₃ /1 мл. (в контроле $1,92 \pm 0,02$ Д₂₃₃ /1 мл.) В кровяных пластинках больных АГП ($3,49 \pm 0,01$ Д₂₃₃ / 10^9 тр.) также достоверно превышали контрольные значения ($2,87 \pm 0,04$ Д₂₃₃ / 10^9 тр.).

Усиление СРО в тромбоцитах у больных телят стало возможным вследствие выраженной депрессии антиокислительных ферментов кровяных пластинок – СОД – $1250,0 \pm 4,36$ МЕ/ 10^9 тр. (у здоровых телят $1780,0 \pm 2,06$ МЕ/ 10^9 тр.) и каталазы – $5690,0 \pm 21,0$ МЕ/ 10^9 тр. (в группе сравнения $10500,0 \pm 11,05$ МЕ/ 10^9 тр.). Содержание СМ в плазме при 280нм составляло $0,49 \pm 0,01$ усл.ед., при 254нм. – $0,32 \pm 0,02$ усл.ед., против контроля $0,32 \pm 0,002$ усл.ед. и $0,24 \pm 0,03$ усл.ед., соответственно. В тромбоцитах телят с функциональными нарушениями пищеварения СМ составили при 280нм – $0,061 \pm 0,02$ усл.ед./ 10^9 тр., при 254нм. – $0,069 \pm 0,03$ усл.ед./ 10^9 тр. (в контроле $0,050 \pm 0,04$ усл.ед./ 10^9 тр. и $0,055 \pm 0,0403$ усл.ед./ 10^9 тр., соответственно).

При исследовании липидного состава мембран тромбоцитов у телят с функциональными нарушениями пищеварения найдено уменьшение содержания ОФЛ до $0,38 \pm 0,001$ мкмоль/ 10^9 тр. и рост уровня ОХС до $0,82 \pm 0,001$ мкмоль/ 10^9 тр. У здоровых животных аналогичные показатели находились на уровне $0,49 \pm 0,002$ мкмоль/ 10^9 тр. и $0,73 \pm 0,001$ мкмоль/ 10^9 тр., соответственно. У животных с функциональными нарушениями пищеварения выявлено усиление тромбопластинообразования. При этом время генерации активного тромбопластина у них было $2,95 \pm 0,01$ мин. при активности – $9,6 \pm 0,02$ с. В группе контроля тромбопластин образовался за $2,40 \pm 0,01$ мин., а активность его составляла $14,0 \pm 0,05$ с.

У новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения в тромбоцитах зарегистрировано усиление обмена арахидоновой кислоты с ростом тромбоксанообразования. По результатам простой пробы переноса выявлено повышение уровня тромбоксана в кровяных пластинках телят до – $74,3 \pm 0,03\%$ (в контроле – $39,2 \pm 0,02\%$). При этом данный рост стал возможен вследствие активации

циклооксигеназы, установленной по восстановлению АТ в коллаген-аспириновой пробе – $96,8 \pm 0,05\%$ и тромбоксансинтетазы по восстановлению АТ в коллаген-имидазольной пробе – $54,6 \pm 0,02\%$. У новорожденных телят, имеющих отклонение в состоянии здоровья, данные показатели равнялись $78,4 \pm 0,19\%$ и $30,3 \pm 0,01\%$, соответственно.

Содержание тромбоцитов в крови телят, имеющих функциональные нарушения пищеварения, было в пределах нормы. При этом, у них зарегистрировано ускорение АТ, особенно под влиянием коллагена – $25,3 \pm 0,20$ с. (в контроле – $30,0 \pm 0,12$ с.). Более замедленной АТ у телят была под действием АДФ ($33,0 \pm 0,12$ с.) и ристомицина ($26,2 \pm 0,13$ с.) при уровне в контроле – $39,0 \pm 0,28$ с. и $41,0 \pm 0,26$ с., соответственно. Тромбиновая и адреналиновая АТ у новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения также развивались быстрее, чем в контроле и находились на уровне $42,4 \pm 0,11$ с. и $75,6 \pm 0,16$ с., соответственно ($P < 0,01$). Время развития АТ при сочетанном использовании индукторов было еще более ускоренным, чем при изолированном их применении, превышая уровень контроля - АДФ+адреналин – $20,0 \pm 0,12$ с., АДФ+коллаген – $18,0 \pm 0,09$ с., адреналин+коллаген – $20,3 \pm 0,07$ с.

У телят с функциональными нарушениями пищеварения на фоне венозной окклюзии выявлено замедление АТ, наиболее выраженное с адреналином - ИААСС $1,30 \pm 0,06$ с. (в контроле – $1,65 \pm 0,02$ с.). Несколько меньший ИААСС зарегистрирован с H_2O_2 ($1,27 \pm 0,07$), ристомицина ($1,28 \pm 0,06$) и АДФ ($1,22 \pm 0,05$). При этом, ИААСС с тромбином и коллагеном находились в состоянии еще большей депрессии - $1,18 \pm 0,12$ и $1,17 \pm 0,11$, соответственно. Индексы антиагрегационной активности сосудистой стенки при использовании комбинаций индукторов были достоверно ниже контрольных: с АДФ+адреналином $1,25 \pm 0,03$ с., АДФ+коллагеном – $1,24 \pm 0,01$ с., адреналином+коллагеном – $1,16 \pm 0,07$ с.

Внутрисосудистая активность тромбоцитов новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения была повышена. Содержание в крови неактивных форм кровяных пластинок - дискоцитов у телят с функциональными нарушениями пищеварения составили $62,0 \pm 0,20\%$ (в контроле – $82,0 \pm 0,16\%$). Это сопровождалось ростом в кровотоке количества диско-эхиноцитов ($18,0 \pm 0,40\%$), сфероцитов ($12,0 \pm 0,03\%$), сферо-эхиноцитов ($6,0 \pm 0,02\%$) и биполярных форм тромбоцитов ($2,0 \pm 0,01\%$) также достоверно превышая контрольные значения. Сумма

активных форм тромбоцитов телят с функциональными нарушениями пищеварения была равна $38,0 \pm 0,30\%$, при уровне в контроле – $18,0 \pm 0,20\%$. Малых и больших агрегатов в крови регистрировалось $15,2 \pm 0,06$ и $4,7 \pm 0,03$ на 100 свободных тромбоцитов (в контроле – $3,6 \pm 0,04$ и $0,12 \pm 0,01$ на 100 свободных тромбоцитов) при вовлеченности тромбоцитов в агрегаты у животных с функциональными нарушениями пищеварения $14,6 \pm 0,02\%$, против $5,0 \pm 0,20\%$ в контроле.

Обсуждение.

Функциональные нарушения пищеварения нередко сопровождаются развитием тромбоцитопатии, приводящей к активации процесса свертывания крови. Течение функциональных нарушений пищеварения обуславливает сдвиги в соотношении ХС/ФЛ в мембранах тромбоцитов, что в совокупности с нарушениями пищеварения и всасывания обуславливает рост в кровотоке, а в последующем и в тромбоцитах уровня СМ, ведущих к ослаблению антиоксидантной защиты кровяных пластинок и повышению концентрации в них продуктов ПОЛ. При этом у телят происходит повышение активности тромбоцитов и тромбопластинообразования. Рост тромбогенного потенциала плазмы крови при функциональных нарушениях пищеварения обуславливается в первую очередь активацией тромбоцитарных функций, а не с повышением уровней различных факторов свертывания, в т.ч. фибриногена. Усиление фибринообразования, без сомнения имеющая место при функциональных нарушениях пищеварения, происходит в первую очередь на поверхности активированных тромбоцитов, нося всегда вторичный характер по отношению к их адгезии и агрегации.

Возникающие при функциональных нарушениях пищеварения изменения состава мембран тромбоцитов, увеличение концентрации в них СМ и рост внутритромбоцитарного ПОЛ приводит к повышению ВАТ, увеличивая содержание активных форм кровяных пластинок в кровотоке. Активная ВАТ обуславливает усиление агрегационной активности тромбоцитов под влиянием различных индукторов. Наиболее вероятными механизмами данного усиления можно считать активизацию метаболизма арахидоновой кислоты с повышением в них тромбоксанообразования, выявленное в пробах переноса и нарастание содержания в плазме участвующего в процессе агрегации фактора Виллебранда, косвенно оцененной по ускорению АТ с ристомицином.

У всех животных с функциональными нарушениями пищеварения отмечено достоверное снижение ИАСС по сравнению со здоровыми телятами, что связано с

ослаблением выработки в стенках сосудов антиагрегантов и в первую очередь простаглицлина.

Течение функциональных нарушений пищеварения, нося сложный характер, сопровождаются не только тромбоцитопатией, но и развитием вазопатии с ослаблением антиагрегационной активности стенки сосудов, приводя к повышению интрасосудистой АТ. Высокая агрегационная активности тромбоцитов под влиянием различных индукторов указывает на повышенную активность тромбоцитов *in vivo*. В этих условиях развивается депрессия обмена арахидоновой кислоты в стенке сосуда, где основным ее метаболитом является вазодилататор и антиагрегант – простаглицлин, являющимся главным физиологическим антагонистом тромбосана.

Сочетанное воздействие нескольких индукторов на процесс АТ без венозной окклюзии и на ее фоне у новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения показало взаимопотенцирующее действие агонистов на тромбоциты с низкой чувствительностью последних к дезагрегирующим сигналам сосудистой стенки в реальных условиях кровотока. Оценка АТ на фоне временной венозной окклюзии и без нее под влиянием различных комбинаций индукторов приближает нас к пониманию реально протекающих в кровотоке процессов у новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения диспепсией и свидетельствует о высоком риске у них тромбообразования.

Дисфункции первичного гемостаза у телят с функциональными нарушениями пищеварения нуждаются в эффективной коррекции, направленной на разрыв „порочных кругов”, наблюдающихся при функциональных нарушениях пищеварения.

Заключение.

У новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения выявлено усиление агрегационной функций тромбоцитов *in vitro* и *in vivo*. В основе выявленных нарушений лежат дисбаланс в липидном спектре мембран тромбоцитов, нарастание уровня в них средних молекул, активация перекисного окисления липидов плазмы и тромбоцитов, усиление генерации в стенке сосудов фактора Виллебранда на фоне депрессии простаглицлиногенерации и интенсификация тромбосанообразования в кровяных пластинках. Активизация тромбопластинообразования является ведущей причиной усиления свертывания крови у новорожденных телят с функциональными нарушениями пищеварения. На основе проведенных исследований можно говорить, что

коррекция нарушений тромбоцитарного звена гемостаза должна включать в себя патогенетически обусловленный комплекс, способный нивелировать функциональные нарушения пищеварения и оптимизировать реологию крови одновременно.

Список литературы.

1. Балуда В.П., Лукьянова Т.И., Балуда М.В. Метод определения антиагрегационной активности стенки сосудов человека. // Лабораторное дело.-1983.-№6.-с.17-20.
2. Габриэлян Н.И., Липатова В.И. и др. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях. Методические рекомендации. М.1985.
3. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. // Лабор. дело. 1983.-№3.-с. 33-36.
4. Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний. Под ред. Н.Н. Петрищева, Л.П. Папаян. СПб.: 1999.-117с.
5. Ермолаева Т.А., Головина О.Г., Морозова Т.В. и др. Программа клинико-лабораторного исследования больных тромбоцитопатиями. СПб.:1992.-25 с.
6. Захария Е.А., Кипах М.В. Упрощенный способ определения агрегации и дезагрегации тромбоцитов. // Лабор. дело 1989.-№1.-с. 36-38.
7. Киселева Р.Е., Борченко Р.В., Кузьмичева Л.В. Эндогенная интоксикация у телят при диарее. // Ветеринария.-2005.-№12.-с.39-41.
8. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск „Беларусь”-1982.
9. Кубатиев А.А., Андреев С.В. Перекиси липидов и тромбоз. // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. 1979.-№5.-с. 414-417.
10. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. // Лабор. дело.-1991. №10.-с. 9-13.
11. Шитикова А.С., Тарковская Л.Р., Каргин В.Д. Метод определения внутрисосудистой активации тромбоцитов и его значение в клинической практике. // Клинич. и лабор. диагностика. 1997.-№2.-с. 23-35.
12. Biggs R., Douglas A.S., Macfarlane R.G. The formation of the thromboplastin in human blood // J. Physiol. 1953.-Vol.119, №1.-p.89-104.

13. Fridwald W.T., Levy R.J., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low-density-lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. // Clinical Chem. 1972.-Vol.18.-p. 499-502.
14. Schmith J.B., Ingberman C.M., Silver M.J. Malondialdehyde formation as an indicator of prostaglandin, production by human platelet // J.Lab. Clin. Med. 1976.-Vol.88.-№1.-p.167-172.