

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.151.5-02:616.89-008.441.13-036.12-06

СОСТОЯНИЕ СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ АЛКОГОЛИЗМОМ

О.Ф. Сибирева^{1,2}, В.Ю. Серебров^{1,2}, Н.В. Канская¹, Т.В. Жаворонок¹, И.А. Позднякова¹, Е.А. Степанова¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет"

E-mail: sivruk68@mail.ru

VASCULAR-PLATELET HEMOSTASIS IN PATIENTS WITH CHRONIC ALCOHOLISM

O.F. Sibireva^{1,2}, V.Yu. Serebrov^{1,2}, N.V. Kanskaya¹, T.V. Zhavoronok¹, I.A. Pozdnyakova¹, Ye.A. Stepanova¹

¹Siberian State Medical University, Tomsk

²National Research Tomsk Polytechnic University

Изучается роль приобретенных форм нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза при хроническом алкоголизме (ХА) для прогностической оценки течения заболевания, осложненного алкогольной нефропатией, и для разработки новых подходов к лечению данной патологии на фоне алкогольного поражения почек.

Ключевые слова: алкоголизм, сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, плазменные антикоагулянты, тромбофилия, алкогольная нефропатия.

The role of acquired forms of vascular-platelet hemostasis disorders in the presence of chronic alcoholism was studied for prediction of progression and complications of the disease, and also for elaboration of new approaches to the therapy of this pathology associated with alcoholic kidney damage.

Key words: alcoholism, vascular-platelet hemostasis, plasma anticoagulants, thrombophilia, alcoholic nephropathy.

Изучение роли генетически обусловленных и приобретенных форм патологии гемостаза в патогенезе хронических заболеваний почек различного генеза, в том числе при формировании алкогольной нефропатии в условиях ХА, является весьма актуальным. Углубление имеющихся представлений о патофизиологии почек и системы гемостаза при алкоголизме важно не только с академических позиций, но и перспективно для точного прогнозирования исходов хронической болезни, выявления групп риска по развитию быстро прогрессирующих форм заболевания, разработки новых подходов к лечению этой патологии.

Цель исследования: оценить роль различных форм тромбофилии в развитии хронической болезни почек

токсического генеза на фоне ХА. В связи с этим обращается внимание на особенности клинико-лабораторных проявлений, отражающих основные механизмы развития и выраженность тромбофилии, на роль предтромботических состояний, ассоциированных с нарушениями сосудисто-тромбоцитарного гемостаза при алкогольной нефропатии, а также на значение тромбофилии, обусловленной гиперпродукцией или аномалиями плазменных факторов свертывания крови, дефицитом физиологических антикоагулянтов и нарушениями фибринолиза в процессах снижения массы функционирующих нефронов у больных ХА. Проводилась прогностическая оценка маркеров предтромботических состояний и тромбофилии при токсической нефропатии у лиц с ХА.

Материал и методы

Обследовано 92 пациента с ХА длительностью 8,50 (6,00; 12,50) лет, их средний возраст составил 32,50 (26,00; 40,50) года. У всех пациентов наркологом установлена вторая стадия ХА (согласно классификации И.Н. Пятницкой, 1994). Доза потребления алкоголя в среднем составляла $34,0 \pm 6,1$ мл этанола на 1 кг массы тела в неделю. В обследуемую группу не включались больные ХА, не давшие информированного согласия на участие, в возрасте более 60 лет, с сопутствующей патологией, а также перенесшие психоз с клиническими проявлениями абстинентного синдрома: значительный тремор рук, языка или век, анорексия, нарушение ритма сердца, повышение артериального давления, одышка, тревога, бессонница и др. У 43 (46,74%) больных ХА патология почек не выявлялась (группа 1), у 49 (53,26%) пациентов имелись признаки алкогольной нефропатии (группа 2), из них с микроальбуминурией было 12 (24,49%) больных, с протеинурией 37 (75,51%) больных. Микрогематурия, микроальбуминурия, протеинурия, стойкость мочевого синдрома (3 мес. и более) и его связь с употреблением алкоголя, а также результаты проведенного нами расширенного обследования в клинике позволили диагностировать одну из наиболее часто встречающихся «почечных» форм алкогольной болезни – хронический алкогольный гломерулонефрит. Группу сравнения составили 50 здоровых доноров.

Материалом являлась периферическая кровь, взятая утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл. Методы исследования подразделяли на функциональные, биохимические и гемостазиологические. Функции почек оценивали по показателям суточной протеинурии, удельного веса и относительной плотности мочи, скорости клубочковой фильтрации, канальцевой реабсорбции, данным экскреторной урографии и динамической нефросцинтиграфии на гамма-камере OPEN DIACAM («Siemens», Германия) с введением ^{131}I -йод-тиопурата, внутривенной гемодинамики (клинический маркер внутригломерулярной гипертензии) с помощью определения почечного функционального резерва по J.P. Bosch (1983), а также по показателям общего белка, альбумина, мочевины, креатинина, гомоцистеина, С-реактивного белка, активности трансаминаз и щелочной фосфатазы сыворотки крови.

Систему гемостаза оценивали, учитывая показатели протромбина по Квику, тромбинового и каолинового времени, уровня тромбоцитов, агрегации тромбоцитов с адреналином и ристомидином, скорости и времени агрегации тромбоцитов, эндотелина-1, антипротромбина III, протеина С, фактора Виллебранда, растворимых фибриномономерных комплексов, активности факторов свертывания V, VII, VIII. Статистический анализ полученных данных проводили при помощи пакетов программ STATISTICA 6.0 и БИОСТАТИСТИКА 4.03. Непрерывные переменные на нормальность распределения проверяли с помощью кривой Гаусса и критерия Шапиро–Уилка. В связи с асимметричностью распределения данные представляли в виде Me (LQ;UQ): медианы и процентилей (25-го и 75-го). Гипотезу равенства дисперсий проверяли, используя тест Левена, проводили корреляционный анализ, статистическую значимость различий между переменными оценивали с помощью критериев Манна–Уитни и Вилкоксона.

Спектр показателей сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у больных ХА представлен в таблице. Количество тромбоцитов в периферической крови у больных ХА как без алкогольной нефропатии (группа 1), так и с алкогольным поражением почек (группа 2) было соизмеримым ($p>0,05$) со значениями аналогичных показателей у здоровых доноров. Однако активность фактора Виллебранда (главного кофактора адгезии тромбоцитов к субэндотелию) и степень агрегации тромбоцитов с ристомидином у больных ХА с сопутствующей нефропатией были статистически значимо ($p<0,05$) выше аналогичных показателей у здоровых доноров, тогда как в группе больных ХА без патологии почек алкогольного генеза значимых различий с контрольными значениями не выявлено ($p>0,05$), имеется лишь тенденция к увеличению активности данного фактора. Помимо роста адгезии тромбоцитов к эндотелию в группе больных ХА с алкогольной нефропатией дополнительно выявлено усиление степени агрегации тромбоцитов с адреналином на 40,37% в сравнении с контролем ($p<0,05$), а в группе пациентов с ХА без почечной патологии этот показатель вырос лишь на 32,09% ($p<0,05$) при отсутствии межгрупповых различий. Вероятно, активация агрегации тромбоцитов связана с приемом алкоголя, который вызывает стимуляцию

Таблица

Показатели сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у здоровых доноров и у больных ХА с алкогольной нефропатией и без патологии почек, Me (LQ; UQ)

Показатели	Здоровые доноры, n=50	ХА без нефропатии (группа 1), n=43	ХА с нефропатией (группа 2), n=49
Количество тромбоцитов ($\times 10^9/\text{л}$)	304,50 (260,00; 353,50)	306,50 (264,50; 313,50)	294,00 (269,50; 354,50)
Фактор Виллебранда (%)	103,80 (92,00; 115,50)	107,70 (94,30; 118,60)	119,70 (96,00; 128,00) $p<0,05$
Эндотелин-1 (фмоль/мл)	0,25 (0,18; 0,31)	0,65 (0,44; 0,75) $p<0,001$	1,33 (0,72; 1,44) $p<0,001$; $p_1<0,001$
Степень агрегации тромбоцитов с ристомидином (%)	97,50 (89,00; 112,00)	102,40 (99,80; 119,40)	109,50 (88,00; 121,00) $p<0,05$
Степень агрегации тромбоцитов с адреналином (%)	96,60 (70,80; 105,90)	127,60 (117,50; 164,60) $p<0,05$	135,60 (97,40; 166,80) $p<0,05$
Скорость агрегации тромбоцитов (%/мин)	12,40 (7,20; 16,20)	11,40 (7,20; 13,60)	13,10 (10,60; 14,10) $p_1<0,05$
Время агрегации тромбоцитов (мин)	8,60 (8,10; 9,30)	7,90 (6,60; 8,40)	7,30 (6,50; 8,30) $p<0,05$

Примечание: статистическая значимость различий показателя с аналогичным: p – в группе здоровых доноров, p_1 – в группе больных ХА без алкогольной нефропатии.

симпатоадреналовой системы [1]. Кроме того, у больных ХА в состоянии абстиненции прекращение алкоголизации нарушает установившийся гомеостаз алкоголя и уменьшает устойчивость организма к действию иных стресс-реализующих факторов среды, приводя, в конечном итоге, к формированию неспецифической адаптивной реакции [2–4, 6, 7]. Известно, что неспецифическая адаптация также сопровождается выбросом адреналина, а рост содержания данного стресс-гормона в крови влечет за собой активацию внутрисосудистой агрегации тромбоцитов [1, 7, 8].

Параллельно с усилением степени агрегации тромбоцитов у больных ХА выявлено изменение скоростных показателей агрегации кровяных пластинок. Так, пациентам с ХА и сопутствующей алкогольной нефропатией требовалось меньше времени для агрегации тромбоцитов в сравнении с таковым в группе контроля ($p < 0,05$), а скорость агрегации при этом была значительно выше аналогичного показателя в группе 1 ($p < 0,05$), не имеющих повреждений печени алкогольного генеза.

Экспериментальным путем установлено, что при введении адреналина кроликам в кровоток поступают фрагменты плазматических мембран эндотелиоцитов и тромбоцитов, называемые микровезикулами. Предполагается, что микровезикулы способны к синтезу тромбосана A_2 , активации тромбоцитов, взаимодействию с фибриногеном и образованию агрегатов с кровяными пластинками [5, 6].

В нашем исследовании показано, что среди показателей сосудисто-тромбоцитарного гемостаза при ХА наиболее существенным образом изменялся уровень эндотелина-1. Во всех группах больных ХА он был существенно выше ($p < 0,001$) контрольных значений у здоровых доноров, причем формирование алкогольной нефропатии способствовало дальнейшему росту концентрации эндотелина-1 до величин, превосходящих таковые у пациентов без алкогольного повреждения клеток печени ($p < 0,001$).

Нами выявлены прямые корреляционные взаимосвязи между уровнем эндотелина-1 и степенью адреналин-индуцированной агрегации, а также активностью фактора Виллебранда ($r_s = 0,46$, $p < 0,05$ и $r_s = 0,51$, $p < 0,01$ соответственно). Следовательно, подтверждается существенная роль дисфункции эндотелия в механизмах гиперагрегации тромбоцитов у больных ХА [5, 9]. Известно, что эндотелин-1 увеличивает поступление ионов кальция в кровяные пластинки, усиливая их агрегацию, участвует в процессах пертурбации эндотелия [5].

Таким образом, у больных алкоголизмом при нормальном количестве тромбоцитов в периферической крови имеет место усиление их агрегации, наиболее выраженное при ХА со сформировавшейся нефропатией алкогольного генеза на фоне увеличения в крови концентрации эндотелина-1 и активности фактора Виллебранда. Существенное повышение уровня эндотелина-1 при росте активности главного кофактора адгезии тромбоцитов к эндотелию может быть прогностически неблагоприятным признаком и выступать одним из маркеров запуска механизмов гиперагрегации тромбоцитов, предтромботических состояний и тромбофилии при токсической алкогольной нефропатии у лиц с ХА.

Литература

1. Афтанас И.А., Брак И.В., Гишинская О.М. и др. Гипоактивация подкрепляющей мотивационной системы у больных с впервые выявленной артериальной гипертензией I–II степени // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157(4). – С. 424–431.
2. Гриненко А.Я., Афанасьев В.В., Бабаханян Р.В. и др. Хроническая алкогольная интоксикация. – СПб.: Изд-во Р. Асланова "Юридический центр Пресс", 2007. – 539 с.
3. Дадька И.В. Система гемостаза и сосудистая реактивность у больных хроническим алкоголизмом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Барнаул, 2007. – 22 с.
4. Доркина Е.Г. Влияние лечебного применения сухого экстракта из *Vicia Truncatula* на НАДФН-GSH-зависимую систему печени крыс при хронической алкоголизации // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73(4). – С. 35–37.
5. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. – Казань: Фэн, 2000. – 367 с.
6. Петров В.В. Паракоагуляционная активность крови при травматических носовых кровотечениях // Фундаментальные исследования. – 2005. – Т. 7. – С. 93–94.
7. Семиглазова Т.А. Система регуляции агрегатного состояния крови при дисфункции эндотелия у пациентов с ишемической болезнью сердца: стенокардией напряжения ФК1-П, НК0-1: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2011. – 22 с.
8. Суджаева О.А., Суджаева С.Г., Казаева Н.А. и др. Взаимосвязь воспаления и нарушения в системе гемостаза у больных с острым инфекционным эндокардитом // Лечебное дело. – 2010. – № 4. – С. 17–27.
9. Favaloro E.J. Von Willebrand Factor assay proficiency testing continued // Am. J. Clinical Pathology. – 2011. – Vol. 136(4). – P. 657–659.

Поступила 09.02.2016

Сведения об авторах

Сибирева Ольга Филипповна, докт. мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, заведующая клинико-диагностической лабораторией ОГАУЗ ТОКБ. Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. E-mail: sivruk68@mail.ru.

Серебров Владимир Юрьевич, докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, профессор кафедры биотехнологии и органической химии ИФВТ ФБГОУ ВПО НИТПУ.

Адреса: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2; 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.

E-mail: serebrov@ssmu.ru.

Канская Наталья Викторовна, докт. мед. наук, профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

Жаворонок Татьяна Васильевна, докт. мед. наук, доцент, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диаг-

ности ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: tavaza@ngs.ru.

Позднякова Ирина Анатольевна, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: irapozd1963@yandex.ru.

Степанова Екатерина Алексеевна, заведующая лабораторией оптической спектроскопии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: carpicon@mail.ru.

УДК 615.281.9

ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ В ОТНОШЕНИИ ПЕРИОДИЧЕСКИХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

А.Г. Мирошниченко, В.М. Брюханов, В.Ю. Перфильев

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Алтайский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Барнаул

E-mail: pharmacologist@ya.ru

SPECIAL ASPECTS OF STUDYING THE PHARMACOLOGICAL MODULATION OF ACTIVITY OF ANTIBACTERIAL AGENTS IN PERIODIC CULTURES OF MICROORGANISMS

A.G. Miroshnichenko, V.M. Bryukhanov, V.Yu. Perfiliev

Altai State Medical University, Barnaul

Цель: выявление особенностей изучения фармакологической модуляции активности антибактериальных средств (АБС) в отношении периодических культур микроорганизмов. Материал и методы. Исследование проведено на контрольном штамме *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Изучали динамику развития указанного штамма в минеральной питательной среде М9 в течение 24 ч в присутствии сублетальных концентраций АБС (гентамицин, цефтазидим, ципрофлоксацин), составляющих 50% от минимальной подавляющей концентрации (МПК). В качестве модулятора использовался антиоксидант метилэтилпиридинол в концентрациях 0,25–4 мМ. Результаты. Установлено, что в присутствии сублетальных концентраций гентамицина или ципрофлоксацина развития штамма подчиняется классической кривой развития периодической культуры. Метилэтилпиридинол снижает действие гентамицина и цефтазида, но усиливает антибактериальный эффект ципрофлоксацина. В смесях, содержащих гентамицин, через 24 ч после начала инкубации происходит реверсивная смена оптической плотности бактериальной суспензии. Динамика развития бактерий в смесях, содержащих цефтазидим, не описывается классической кривой роста и имеет интермиттирующий характер. Заключение. Для оценки влияния фармакологического вещества на активность АБС в отношении периодической культуры микроорганизма необходимо динамическое наблюдение за развитием инкубационных смесей. Детекция результатов по конечной точке может приводить к их ошибочной интерпретации.

Ключевые слова: лекарственное взаимодействие, периодическая культура, антибактериальная активность, *Klebsiella pneumoniae*.

Aim: The aim of the study was to identify special aspects of investigating the pharmacological modulation of the activity of antibacterial agents in periodic cultures of microorganisms. Materials and Methods. The study was conducted by using the control strain of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. We studied the growth dynamics of the strain in the M9 mineral medium for 24 hours in the presence of sublethal concentrations of antibacterial agents (gentamicin, ceftazidime, ciprofloxacin), constituting 50% of the minimum inhibitory concentration. Antioxidant methylethylpyridinol in concentrations of 0.25–4 mM was used as a modulator. Results. The study showed that, in the presence of sublethal concentrations of gentamicin or ciprofloxacin, the strain development complied with the classic growth curve for periodic culture. Methylethylpyridinol reduced the effects of gentamicin and ceftazidime, but enhanced the antibacterial effect of ciprofloxacin. In the mixtures containing gentamicin, a reversible change in the optical density of the bacterial suspension was observed 24 hours after beginning the incubation. The growth dynamics of bacteria in the mixtures containing ceftazidime was not described by classic growth curve and was intermittent. Conclusion. To assess the effects of pharmacological substances on the activity of antibacterial agents in periodic cultures of microorganisms, dynamic monitoring of the incubation mixtures is necessary. Acquisition of the results only at endpoint can lead to erroneous data interpretation.

Key words: drug interactions, periodic culture, antibacterial activity, *Klebsiella pneumoniae*.