

7. Муштакова В.М., Роговин В.В. Клофибрат и даларгин увеличивают люминолзависимую хемилуминесценцию крови мышей // Бюл. exper. биол. и мед. - 2007. - №9. - С. 291-292.

8. Панькова Т.Д., Тимошин С.С. Доказательства реализации стимулирующего эффекта даларгина на процесс клеточного деления через опиатные рецепторы // Бюл. exper. биол. и мед. - 1990. - №7. - С. 96-98.

9. Сиротин Б.З., Жмеренецкий К.В. Микроциркуляция: влияние лекарственных препаратов. - Хабаровск, 2010. - 128 с.

10. Таджибова Л.Т., Астаева М.Д., Исмаилова Ж.Г. и др. Влияние даларгина на свободнорадикальные процессы в крови крыс при умеренной гипотермии // Бюл. exper. биол. и мед. - 2010. - №9. - С. 271-274.

11. Тимошин С.С., Жданова Т.Ф. Изучение сравнительного влияния различных лигандов опиоидных рецепторов на процессы клеточного деления эпителия языка белых крыс // Бюл. exper. биол. и мед. - 1987. - №9. - С. 354-355.

12. Флейшман М.Ю., Животова Е.Ю., Лебедев О.А. и др. Анализ механизмов влияния аргининсодержащего аналога дерморфина на процессы пролиферации в сли-

зистой оболочке желудка белых крыс // Бюл. exper. биол. и мед. - 2007. - №9. - С. 282-285.

13. Bal-Price A., Gartolon J., Brown G.C. Nitric oxide stimulates PC 12 cell proliferation via cGMP and inhibits at higher concentrations mainly via energy depletion // Nitric Oxide. - 2006. - Vol. 14, №3. - P. 238-246.

14. Cataldi A. Cell responses to oxidative stressors // Curr. Pharm. Des. - 2010. - Vol. 16, №12. - P. 1387-1395.

15. Costa A.D. Garlid K.D. West I.C. et al. Protein kinase G transmits the cardio-protective signal from cytosol to mitochondria // Circ. Res. - 2005. - Vol. 19, №4. - P. 329-336.

16. Xia Z., Luo T., Liu H.M. et al. L-arginine enhances nitrate stress and exacerbates tumor necrosis factor- $\alpha$  toxicity to human endothelial cells in culture: prevention by propofol // J. Cardiovasc. Pharmacol. - 2010. - Vol. 55, №4. - P. 358-367.

*Координаты для связи с авторами:* Животова Елена Юрьевна — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, e-mail: elena-jivotova@yandex.ru; Лебедев Ольга Антоновна — доктор мед. наук, вед. науч. сотр. НИИ ОМиД, e-mail: leoaf@mail.ru; Тимошин Сергей Сергеевич — зав. ЦНИЛ ДВГМУ, тел.: 8(4212) 32-99-64, e-mail: timoshinss@yandex.ru.



УДК 616 - 001.21 : 616.017.1

А.В. Любин, А.В. Солпов, К.Г. Шаповалов

## АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТАРНО-ТРОМБОЦИТАРНАЯ АДГЕЗИЯ ПРИ ЭЛЕКТРОТРАВМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Читинская государственная медицинская академия,  
672090, ул. Горького, 39а, тел.: 8(3022) 32-00-85, e-mail: macadem@mail.chita.ru, г. Чита

Электрический ток, входя в тело человека, движется в направлении от одного полюса к другому, распространяясь веерообразно, главным образом, по тканям, оказывающим наименьшее сопротивление. Ткани человеческого организма обладают различным сопротивлением к электрическому току (по степени возрастания): нерв - кровеносный сосуд - мышца - кожа - сухожилие - подкожная жировая клетчатка — кость [13, 15]. Иначе говоря, электрический ток, преодолев сопротивление кожи и подкожной жировой клетчатки, проходит через более глуболежащие ткани параллельными пучками вдоль потоков тканевой жидкости, кровеносных и лимфатических сосудов, оболочек нервных стволов [8, 11-13]. Это обуславливает высокую степень уязвимости кровеносных сосудов при электрической травме [9, 12]. Сообразно с этим проявляются нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, свертывания крови и фибринолиза, веду-

щие к ДВС-синдрому, нарушениям микроциркуляции, эндотелиальной дисфункции.

Особый интерес представляет изучение феномена лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) (Ю.А. Витковский и соавт., 1999-2005). Этот показатель является интегральным и одновременно отражает изменения в системах гемостаза и иммунитета. Известно, что тромбоциты содержат ряд биологически активных веществ, в том числе цитокины, серотонин, АДФ и прочие [2, 4, 7, 10]. Предыдущими работами, проведенными на кафедре нормальной физиологии, изучены механизмы лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии в условиях нормы и патологии [2-5]. Установлена взаимосвязь между ЛТА и другими параметрами иммунитета. Особую актуальность данное научное направление имеет в области электротравмы, поскольку данная патология всегда протекает с нарушениями в реологии крови и с патологическими

сдвигами гемостаза. Однако подобных исследований функции лимфоцитарно-пластиночного взаимодействия при электротравме не проводилось. Таким образом, изучение феномена лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии и показателей агрегационной активности тромбоцитов позволит более глубоко раскрыть особенности патогенеза электротравмы.

*Цель работы* — изучить агрегационную способность тромбоцитов и интенсивность лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у крыс с электротравмой в условиях эксперимента.

### Материалы и методы

Экспериментальное исследование проводилось на 20 нелинейных крысах обоего пола массой 230-250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Все исследования выполнены в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации (2000 г.) и одобрены Локальным этическим комитетом ГОУ ВПО ЧГМА. Контролем в каждом из экспериментов служили 20 интактных крыс. При помощи смоделированного устройства иммобилизованные животные, находящиеся под эфирным наркозом, подвергались дозированной несмертельной электротравме с напряжением поражающего тока 220 В и частотой 50 Гц в течение 2 с. Через 5 мин после срединной лапаротомии производился забор крови из брюшной аорты в объеме 4-5 мл с помощью системы взятия венозной крови S-Monovette® («Sarstedt», Германия).

Исследование агрегационной способности тромбоцитов проводилось по следующей методике. Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали из крови, взятой с использованием в качестве антикоагулянта 3,8% раствора цитрата натрия в соотношении кровь: антикоагулянт — 9:1. Кровь центрифугировали при 1500 g в течение 7 мин при комнатной температуре. Из пробирки осторожно отбирали 2,5 мл супернатанта (верхнего слоя). Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали повторным центрифугированием остатков крови при 3000 g в течение 15 мин. Агрегацию тромбоцитов исследовали турбидиметрическим методом по G. Born (1962) с помощью лазерного анализатора агрегации «Viola» (НПФ «Биола», Москва). В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали раствор АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл, выпускаемый ООО «Технология-стандарт» (Барнаул). Оценивали степень и скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов по данным кривой среднего размера агрегатов и кривой светопропускания. Определение показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии проводили по методу, предложенному Ю.А. Витковским и соавт. (1999). Свежую гепаринизированную кровь экспериментальных животных наслаивали на градиент урографин-фиколл (плотность 1,077) и выделяли лимфоциты. Собирали интерфазное кольцо, содержащиеся клетки и кровяные пластинки однократно промывали фосфатно-солевым буфером (рН=7,4) и центрифугировали при 1000 об./мин в течение 3-4 мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок микроскопировали в камере Горяева. Подсчитывали число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов на 100 клеток. Степень агрегации определяли как число кровяных пластинок, адгезированных на поверхности одного лимфоцита. Полученные данные обработаны с помощью пакета программ Biostat и Microsoft

### Резюме

У крыс в условиях эксперимента после нанесения электротравмы была изучена агрегационная способность тромбоцитов и показатель лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. Установлено, что при электротравме у экспериментальных животных повышался показатель лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, наблюдалась вторичная гипоагрегация тромбоцитов. Таким образом, воздействие электрического тока вызывало изменения в системе микроциркуляторного гемостаза и функции эндотелия у подопытных животных.

*Ключевые слова:* электротравма, агрегация тромбоцитов, лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия.

A.V. Lyubin, A.V. Solpov, K.G. Shapovalov

### AGGREGATION OF THROMBOCYTES AND LYMPHOCYTE-PLATELET ADHESION AT THE ELECTROTRAUMA IN AN EXPERIMENT

Chita State medical academy, Chita

### Summary

Under experimental conditions the aggregative ability of thrombocytes and an indicator of lymphocyte-platelet adhesion of rats after electrotrauma were studied. It was confirmed that the indicator of lymphocyte-platelet adhesion of the animals under experiment after electrotrauma increased, the repeated hypo aggregation of thrombocytes was observed. Thus, the electric current influence caused changes in the system of microcirculatory homeostasis and function of endothelium of tested animals.

*Key words:* electrotrauma, aggregation of thrombocytes, lymphocyte-platelet adhesion.

Excel 2003. При сравнении показателей исследуемых групп использовались методы непараметрической статистики, в связи с ненормальным распределением значений в вариационных рядах. Числовые данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала с указанием точного значения статистической значимости (p). При сравнении двух независимых выборочных совокупностей по одному признаку использовался критерий Манна-Уитни.

### Результаты и обсуждение

У всех экспериментальных животных отсутствовала спонтанная агрегация тромбоцитов. При исследовании АДФ индуцированной агрегации тромбоцитов, по данным кривой среднего размера агрегатов у животных с электротравмой, по сравнению с контрольной группой, наблюдается снижение максимального значения агрегации тромбоцитов в 1,7 раза (p=0,002), а также уменьшение наклона кривой агрегации в 2,5 раза (p<0,001) (табл. 1).

Подобные изменения выявлялись по результатам кривой светопропускания. Так, в контрольной группе показатель максимального значения агрегации более чем в 3 раза выше, по сравнению с опытной группой (p=0,003), а скорость агрегации в 2,5 раза быстрее (p=0,001) (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении АДФ-индуцированной агрегационной функции

**Изменение агрегационной функции тромбоцитов крыс  
(критерий Манна-Уитни;  
Ме (25-й процентиль; 75-й процентиль)**

Изменение агрегационной функции	Показатель	
	Макс. знач.	Макс. накл.
<i>Кривая среднего размера агрегатов</i> АДФ 2,5 мкг/мл - лабораторные животные без электротравмы (контроль) (n=15)	11,85 (9,67; 12,28)	30,3 (24,8; 35,88)
- лабораторные животные с электротравмой (n=15)	7,05 (4,16; 9,43) p=0,002	12,1 (5,93; 22,10) p<0,001
<i>Кривая светопропускания</i> АДФ 2,5 мкг/мл - лабораторные животные без электротравмы (контроль) (n=15)	26,45 (17,43; 34,80)	35,05 (29,98)
- лабораторные животные с электротравмой (n=15)	8,35 (3,81; 12,04) p=0,003	13,75 (7,55; 19,23) p=0,001

*Примечание.* P — достоверность различий по отношению к контролю.

тромбоцитов у крыс с электротравмой. По всей видимости, проходящий электроток приводил к выбросу биологически активных веществ (фактор фон Виллебранда, провоспалительные цитокины), что вызывало агрегацию тромбоцитов на микроциркуляторном уровне в момент электротравмы. Вероятно, произошли и вторичные изменения, связанные с развивающейся эндотелиальной дисфункцией и раздражением сосудистой стенки провоспалительными цитокинами, в результате чего активизировались все звенья системы гемостаза. Вторичной гипоагрегации, обусловленной потреблением кровяных пластинок, предшествует их первичная гиперагрегация, вызванная АДФ, адреналином, тромбином, фактором активации тромбоцитов, торможением образования простагландин эндотелиальными клетками. Полученные результаты согласуются с изменением агрегационной функции тромбоцитов при холодовой травме, при остром отравлении уксусной кислотой [1, 6].

Установлено, что у экспериментальных животных после удара электротоком кровяные пластинки проявляли высокую адгезивную активность в отношении лимфоцитов. Так, у подопытных крыс после нанесения электротравмы выявлялось лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов в 1,6 раза больше, чем у животных без удара электричеством (p=0,004) (табл. 2).

Аналогичная динамика обнаружена для показателя степени агрегации. Так, после воздействия электричества данный показатель увеличивался на 17% по сравнению с интактными животными (p=0,015) (табл. 2).

Значительное повышение ЛТА при электротравме можно объяснить тем, что при остром повреждении тканей и сосудистой стенки нарушается целостность эндотелия и, как следствие, снижается экспрессия большинства молекул адгезии, в результате в зоне альтерации страдает кооперация и миграция клеток [3, 4]. В связи с этим повышение способности клеток и пластинок образовывать агрегаты является целесообразным. Ранее показано, что благодаря тромбоцитам лимфоциты способны контактировать с субэндотелиальным матриксом посредством интегринов [2, 7]. Адгезивная способность тромбоцитов

**Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у крыс  
при экспериментальной электротравме.  
(критерий Манна-Уитни;  
Ме (25-й процентиль; 75-й процентиль)**

Показатели	Лабораторные животные без электротравмы (n=20)	Лабораторные животные с электротравмой (n=20)
ЛТА, %	15,35 (12,93; 19,68)	24,05 (17,38; 26,28) p=0,004
Степень адгезии	2,15 (1,73; 2,38)	2,6 (2,15; 2,70) p=0,015

*Примечание.* P — достоверность показателей относительно контрольной группы.

и лимфоцитов зависит от функциональных свойств этих форменных элементов. Усиление агрегационных свойств кровяных пластинок сопровождается увеличением числа лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов [3]. По нашему мнению, увеличение числа лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов при одновременном снижении АДФ-индуцированной агрегации является признаком именно вторичной гипоагрегации тромбоцитов, обусловленной их первичной гиперфункцией в сосудистом русле. Поэтому исследование показателей ЛТА и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза позволяет объективно оценить состояние микроциркуляции. Резкое повышение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии после полученной электротравмы является важным адаптационным механизмом, обеспечивающим реализацию клеточных защитных реакций у подопытных животных. По всей видимости, электроток, поражая сосудистый эндотелий, приводит к увеличению концентрации провоспалительных цитокинов, снижению секреции NO и экспрессии тканевого фактора. Проходящее электричество индуцирует воспалительную реакцию и гибель клеток сосудистой стенки и окружающих тканей. В результате активируются механизмы саногенеза, иммунной защиты, гемостаза для ограничения зоны альтерации и элиминации продуктов некроза.

## Выводы

Выявлено, что у экспериментальных животных при нанесении электротравмы снижается интенсивность агрегации в 3 раза, по сравнению с контрольной группой, а скорость агрегации замедляется в 2,5 раза.

2. Установлено, что у лабораторных крыс происходило усиление лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии в 1,7 раза.

3. Выявлено, что прохождение электрического тока вызывало у лабораторных животных межклеточные и клеточные изменения.

## Л и т е р а т у р а

1. Руцкина Е.А. и др. Агрегация тромбоцитов и активность фактора фон Виллебранда у больных с острым отравлением уксусной кислотой // Забайкальский мед. вестник. - 2007. - №1. - С. 4-8.

2. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Взаимодействие лейкоцитов и тромбоцитов с эндотелием и ДВС-синдром // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2006. - №1. - С. 15-28.

3. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Итоги 10-летнего исследования механизмов лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии // Забайкальский мед. вестник. - 2008. - №3. - С. 30-35.
  4. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии // Мед. иммунология. - 2006. - №8. - С. 745-752.
  5. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Феномен лимфоцитарно-тромбоцитарного розеткообразования // Иммунология. - 1999. - №4. - С. 35-37.
  6. Шаповалов К.Г. и др. Изменения агрегационных свойств тромбоцитов у больных с местной холодовой травмой // Дальневост. мед. журнал. - 2007. - №4. - С. 32-34.
  7. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и при патологии. - Чита, 2010. - С. 545-554.
  8. Томилин В.В. и др. Руководство по судебной медицине. - М.: Медицина, 2001. - С. 117-122.
  9. Дамулин И.В. и др. Спинальная амиотрофия вследствие электротравмы // Неврологический журнал. - 2006. - №1. - С. 36-40.
  10. Струкова С.М. Роль тромбоцитов и сериновых протеиназ в сопряжении свертывания крови и воспаления // Биохимия. - 2004. - Т. 69, №10. - С. 1314-1331.
  11. Черешнев В.А., Юшков Б.Г. Патофизиология. - М.: Вече, 2001. - С. 140-143.
  12. Danielson J., Capelli M., Lee R.C. Electrical Injury of the Upper Extremity // Hand Clinics. - 2000. - Vol. 16. - P. 225-234.
  13. Koumbourlis A.C. Electrical injuries // Crit Care Med. - 2002. - Vol. 30, Suppl 11. - P. 424-30.
  14. Lee R.C., Dougherty W. Electrical injury: Mechanisms, manifestations, and therapy // IEEE Trans Dielectrics and Electrical Insulation. - 2003. - Vol. 10. - P. 810-819.
  15. Spies C., Trohman R.G. Narrative review: Electrocutation and life-threatening electrical injuries // Ann Intern Med. - 2006. - Vol. 145. - P. 531-537.
- Координаты для связи с авторами:** *Любин Антон Викторович* — аспирант кафедры анестезиологии и реаниматологии ЧГМА, тел.: +7-914-496-29-29, e-mail: paginacia@mail.ru; *Солпов Алексей Владимирович* — канд. мед. наук, доцент кафедры нормальной физиологии с курсом клинической физиологии ЧГМА, рук. лаборатории физиологии и патологии иммунитета и гемостаза НИИ медицинской экологии, тел.: +7-924-375-25-45; *Шаповалов Константин Геннадьевич* — доктор мед. наук, зав. кафедрой анестезиологии и реаниматологии ЧГМА, тел.: +7-914-501-04-78, e-mail: Shkg26@mail.ru.

