

ным контрольного УЗИ на 40-60%. 14 больных успешно прооперированы (радикальная расширенная гистерэктомия по Я.В. Бохману), 6 больных готовятся к операции.

Анализ осложнений показал, что в основном осложнения были связаны с проведенной химиотерапией. У 5 больных тошнота и рвота, у 3 лейкопения 2-й степени, у 2 больных – анемия 2-й степени, которые купировались консервативной терапией. Осложнений, связанных с эмболизацией, нами не отмечено.

Выводы

В настоящее время большинством исследователей доказана целесообразность широкого практического применения регионарной химио-

инфузии в лечении больных раком шейки матки. Непосредственные результаты применения методики показали ее эффективность у 70% больных. В связи с этим вопрос о ее применении следует рассматривать как один из эффективных методов комбинированного и комплексного лечения больных раком шейки матки. Артериальная эмболизация является малотравматичным и эффективным способом остановки кровотечения из опухоли шейки матки, а также создает дополнительную ишемизацию опухоли, что повышает эффективность непосредственных результатов лечения.

Считаем, что вышеописанную методику лечения больных раком шейки матки необходимо шире использовать в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Винокуров В.Л., Таразов П.Г., Суворова Ю.В. и др. Рентгеноэндоваскулярная окклюзия внутренних подвздошных артерий и регионарная химиотерапия у больных раком матки: Методические рекомендации МЗ РФ № 97/93, 1997.
2. Давыдов М.И., Гранов А.М., Таразов П.Г., Гранов Д.А. и др. Интервенционная радиология в онкологии (пути развития и технологии). – СПб.: Фолиант, 2007.
3. Сабекия И. М., Столярова И.В., Винокуров В.Л. Роль рентгеноэндоваскулярных вмешательств в комбинированном лечении больных местнораспространенным раком шейки матки // Вопр. онкол. - 2004. - Т. 50, № 5. - С. 590-594.
4. Суворова Ю. В., Таразов П. Г., Жаринов Г. М., Некласова Н. Ю. Артериальная эмболизация при хроническом кровотечении у больных раком матки // Вопр. онкол. - 1996. - Т. 42, № 4. - С. 59-62.
5. Chaney A. W., Eifel P. J., Logsdon M. D. et al. Mature results of a pilot study of pelvic radiotherapy with concurrent continuous infusion intra-arterial 5-FU for stage IIIB-IVA squamous cell carcinoma of the cervix // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. - 1999. - Vol. 45, N 1. - P. 113-118.
6. Nagai N., Oshita T., Murakami Y. et al. Radiotherapy combined with transcatheter arterial infusion of cisplatin versus oral fluoropyrimidine anticancer agent for locally advanced carcinoma of the uterine cervix: A prospective follow-up study // Oncol. Rep. - 2001. - Vol. 8, N 1. - P. 119-125.

УДК 616.33/.342-002.44-005.1-018.73
© Э.Ф. Баринов, О.Н. Сулаева, 2009

Э.Ф. Баринов, О.Н. Сулаева АГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ КРОВОТЕЧЕНИИ ИЗ ЯЗВ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ЗОНЫ

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, г. Донецк, Украина

В тестах *in vitro* проведена оценка функциональной активности тромбоцитов и механизмов ее регуляции при кровотечении из язв гастродуоденальной зоны у 69 больных. На основании анализа кривой доза-ответ рассчитывали EC50 для системных, тканевых и аутокринных регуляторов гемостаза. Показано, что развитие кровотечения сопровождается изменением адренореактивности и чувствительности тромбоцитов к АДФ, тромбину и коллагену, что может быть связано с изменением Ca²⁺-гомеостаза. Факторами риска развития повторного кровотечения являются высокая адренореактивность и выраженная чувствительность к тромбину и коллагену. Среди факторов риска развития поздних рецидивов кровотечений следует отметить низкую адренореактивность на момент госпитализации пациентов и альтернативный характер реакции на тромбин.

Ключевые слова: язвенное кровотечение, гемостаз, тромбоциты.

E.F. Barinov, O.N. Sulayeva PLATELET AGGREGATION IN BLEEDING CAUSED BY GASTRO-DUODENAL ULCERS

The platelet functional activity and mechanisms of its regulation have been evaluated in 69 patients with gastro-duodenal ulcer bleeding using the *in vitro* tests. According to the character of the dose-response curve, EC50 of systemic, tissue and autocrine regulators of hemostasis was calculated. It has been shown that ulcer bleeding is accompanied by changes in adrenoactivity and platelets sensitivity to ADP, thrombin and collagen. This can be associated with an alteration of Ca²⁺-homeostasis. Factors associated with early rebleeding include hyperadrenoactivity and high sensitivity of platelets to thrombin and collagen. Late rebleeding risk factors are low adrenoactivity at the time of hospitalization and alternative respond to thrombin.

Key words: ulcer bleeding, hemostasis, platelets.

Острое кровотечение из язвенных дефектов гастродуоденальной зоны (ГДЗ) является одним из наиболее грозных осложнений язвенной болезни желудка, следствием которого могут быть развитие геморрагического шока и летальный исход [5]. Развитие язвенного кровотечения в просвет органов ЖКТ является не только следствием повреждения стенки ГДЗ, но и определяет ряд системных изменений, обусловленных включением экстренной реакции на кровопотерю и направленных на поддержание жизнедеятельности организма [2]. Данный ответ напрямую связан с активацией симпатoadреналовой системы (САС). Основополагающим эффектом данной реакции является вазоконстрикция в зоне кровотечения, определяющая сосудистый компонент системы гемостаза [2]. Помимо этого катехоламины оказывают мощное метаболическое воздействие и могут детерминировать усиление ишемического повреждения зоны дефекта [5]. Это сопровождается активацией тканевых модуляторов состояния тромбоцитов (экспрессия молекул клеточной адгезии, коллаген) и системы коагуляции (тканевой фактор, запускающий внутренний путь коагуляции крови) [3]. В конечном итоге эффективность гемостаза определяется комплексным взаимодействием тканевых факторов, элементами сосудистой стенки, тромбоцитов и системы коагуляции крови. Многофакторность регуляции каждого из компонентов гемостаза затрудняет трактовку причинно-следственных отношений в развитии и рецидивировании язвенных кровотечений. Особого внимания при этом заслуживают тромбоциты как интегрирующий элемент между состоянием сосудистой стенки и системой коагуляции крови. Экспрессия широкого спектра рецепторов к системным, локальным регуляторам и аутокринным факторам позволяет рассматривать данные форменные элементы крови в качестве универсального объекта оценки системы гемостаза в целом и ее отдельных звеньев в частности. Однако до настоящего времени сведений о функциональной активности и механизмах регуляции тромбоцитов при язвенном кровотечении крайне мало, что и определило цель данной работы.

Материал и методы

В работе проведена оценка тромбоцитов 69 больных с кровотечениями из язв ГДЗ. Для выделения тромбоцитов кровь собирали в пластиковые пробирки, содержащие кислый цитратдекстрозный антикоагулянт в соотношении его с кровью 1:6. Центрифугирование крови проводили 15 мин при 200 g для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). Затем проводили дальнейшее центрифугирование в течение 10 мин при 2000 g, в результате чего получали плазму, обедненную тромбоцитами. Ее использовали для поддержания стандартного количества клеток на уровне 200 тыс./мкл. Отмытые тромбоциты суспендировали в буферном растворе, который содержал (мкМ): NaCl (138), KCl (3), MgCl₂ (1), глюкоза (10), HEPES (10), NaH₂PO₄ (0,37), pH 7,4 [1, 3]. В качестве индукторов агрегации тромбоцитов (АТ) ис-

пользовали: 1) адреналин, позволяющий оценить системные эффекты активации САС, а, по сути, адренореактивность организма при кровотечении; 2) АДФ, являющийся фактором аутокринной стимуляции АТ; 3) тромбин, стимулирующие эффекты которого могут отражать взаимосвязь между состоянием тромбоцитов и коагуляционной системой плазмы крови; 4) коллаген – тканевой фактор, усиливающий АТ и отражающий выраженность локальной деструкции ткани при язвенном кровотечении.

Для анализа агрегации тромбоцитов (АТ) при язвенном кровотечении использовали каждый индуктор в концентрации, вызывающей 50% АТ (ЕС50). Для ее определения в суспензию тромбоцитов вводили индуктор агрегации в возрастающих концентрациях. Инкубацию продолжали в течение 8 минут при 37°C и перемешивании со скоростью 1000 об/мин. Оценивали дозозависимое направление сдвига и величину изменения АТ, используя построенную кривую доза-ответ [3]. Каждая экспериментальная точка на графиках являлась средним значением для трех независимых измерений. Среднеквадратичная ошибка измерений не превышала 10% от полученной величины. На основании проведенных исследований определяли ЕС50. Об изменении АТ судили путем измерения оптической плотности светового потока, проходящего через суспензию тромбоцитов, на спектрофотометре СФ-46 [1].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ и электронных таблиц Excel и MedStat с использованием дисперсионного анализа. В случае распределения признака, отличного от нормального, применяли непараметрические методы статистики. При сравнении нескольких групп вычисляли критерий Крускала-Уолиса, межгрупповые сравнения проводили с учетом критерия Дана. Достоверными считали различия при $p < 0,05$ [4]. Работа одобрена этическим комитетом университета.

Результаты и обсуждение

Анализ агрегации тромбоцитов в контрольной группе позволил установить ЕС50 для разных регуляторов гемостаза. Данная величина для адреналина составила $2,59 \pm 0,53$ мкМ, для АДФ – $4,23 \pm$ мкМ, тромбина – 0,22 Ед/мл, коллагена – 0,95 мг/мл. При поступлении в стационар у больных с язвенным кровотечением обнаружены выраженные изменения всех звеньев регуляции функционального состояния тромбоцитов. В первую очередь это касалось изменения адренореактивности. Анализ кривой доза-ответ показал наличие выраженного сдвига влево. Пик АТ был зарегистрирован при концентрации адреналина, соответствующей 40-70% контрольной ЕС50. Согласно величине ЕС50 адреналина обследованный контингент больных был распределен на две подгруппы: А – со снижением ЕС50 на $35,2 \pm 4,1\%$ ($p = 0,03$) по сравнению с контролем ($n = 29$) и Б – 40 пациентов с разницей по отношению к контролю $68,6 \pm 6,35\%$ ($p = 0,01$). По сути, данные изменения отражают повышение адренореактивности организма и вы-

раженность активации САС. Сопоставление полученных данных с исходом патологического процесса позволило установить ряд интересных фактов. В подгруппе А в 17,24 % случаев развивались повторные кровотечения, причем чаще в течение 2-3 суток после лечебного гемостаза. В отличие от этого в подгруппе Б частота рецидивов кровотечений составляла 27,5%, и повторные кровотечения развивались преимущественно в течение 1 суток после гемостаза. При трактовке этих данных важно помнить, что помимо позитивных эффектов в виде гипергликемии, стимуляции метаболизма, спазма сосудов и усиления свертывания крови катехоламины оказывают и негативное влияние, включая микроциркуляторные нарушения в ГДЗ, оксидативный стресс, изменение метаболизма арахидоновой кислоты, стимуляцию продукции провоспалительных цитокинов, активацию системы комплемента и активности гранулоцитов [1, 5]. С этих позиций изучение вопросов адренореактивности не только позволяет трактовать состояние сосудистого тонуса и уровень внутриклеточного Ca^{2+} , но и прогнозировать выраженность синдрома ишемия-реперфузия в зоне язвенного кровотечения. В случае ограничения активности САС можно предполагать превалирование других гуморальных регуляторов, в частности, вазопрессина или ангиотензина II, участвующих в реакции организма на кровопотерю [3].

Данные анализа АТ при добавлении в суспензию АДФ подтвердили факт проагрегантного состояния тромбоцитов. При инкубации с АДФ отмечен сдвиг кривой доза-ответ влево с пиком АТ при концентрации АДФ $1,48 \pm 0,2$ мкМ. Дальнейшее повышение концентрации индуктора не вызывало усиления АТ, что, по мнению авторов [3], может отражать выраженную массивную дегрануляцию тромбоцитов при связи лиганда с рецептором и истощение их секреторной активности в последующем. Ряд авторов связывают такие изменения с особенностями чувствительности и нарушением десенситизации рецепторов в экстремальных условиях, ассоциированных с формированием гомо- и гетеродимеров, а также крупных функциональных доменов с перекрестной активацией альтернативными лигандами. Учитывая сопряженность пуриновых рецепторов, связывающих АДФ с Ca^{2+} -каналами и Ca^{2+} -гомеостазом, анализ данного функционального блока позволяет говорить о нарушении роли пуриновых рецепторов в поддержании внутриклеточного гомеостаза и уровня цитозольного Ca^{2+} [3].

При использовании тромбина, связывающегося с рецепторами, активируемыми протеиназами (PAR-1 и PAR-2), инициирующими включение альтернативных внутриклеточных сигнальных путей, было установлено закономерное изменение ответа тромбоцитов. При этом EC_{50} тромбина варьировала у разных пациентов достаточно широко и отличалась от контрольного показателя в 1,3-3 раза. Кроме того, имело место изменение характера кривой доза-ответ: низкие концентрации тромбина ($0,07$ - $0,14$ Ед/мл) вызывали выраженную

активацию АТ, дальнейшее прибавление не меняло АТ, тогда как при высокой концентрации лиганда отмечалось снижение АТ. Приведенные факты могут отражать не только изменение количества и чувствительности рецепторов к тромбину, но и изменение баланса между изоформами PAR-1 и PAR-2. Известно, что активация PAR-1 через повышение внутриклеточного Ca^{2+} за счет освобождения его из внутриклеточных депо и продукции тромбоксана A_2 , стимулирует на поверхности экспрессию рецепторов клеточной адгезии (в частности Р-селектинов), вызывает выраженную дегрануляцию и агрегацию тромбоцитов [6]. Стимуляция PAR-2 также повышает АТ, но у здоровых людей этот эффект выражен в меньшей степени, чем при активации PAR-1. Однако связывание тромбина с PAR-2 сопровождается рядом альтернативных биологических эффектов, в частности, повышением продукции ПГ E_2 и освобождением оксида азота [7]. Интересно, что помимо тромбина лигандами PAR-2 являются трипсин и триптаза тучных клеток, что предполагает возможность альтернативной регуляции активности сигнального пути, запускаемого при активации данного типа рецепторов [6]. Важно, что активация как PAR-1, так и PAR-2 сопровождается стимуляцией моноцитов-макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов, а значит, определяет выраженность острого воспалительного ответа организма на повреждение органов ГДЗ [5, 7]. Кроме того, в условиях хронического воспалительного процесса возможно изменение структурных характеристик тромбоцитов - изменение количества, структуры и активности элементов цитоскелета и мембран. Эти факты важны в трактовке результатов сопоставления тромбининдуцированной АТ с клинико-лабораторными параметрами и исходом язвенного кровотечения. Как выяснилось, у пациентов с выраженным снижением EC_{50} тромбина (в 2,5-3 раза ниже контроля; $p=18$) в 38,89% случаев встречаются ранние рецидивы кровотечений, что может быть связано с тромбозом сосудов и ишемией в зоне повреждения после гемостаза. В отличие от этого слабое снижение EC_{50} на $35,2 \pm 3,54\%$ ($p=0,02$) по отношению к контролю, зарегистрированное у 21 пациента в 52,38% случаев, сопровождалось развитием позднего кровотечения. Характерно, что около 75% данных больных относились к группе с низкой адренореактивностью организма на фоне кровотечения. У оставшихся 30 больных отмечено повышение чувствительности к тромбину на $86 \pm 12,6\%$ ($p=0,005$) по отношению к контролю, что снижало вероятность развития повторного кровотечения.

Проверка роли тканевых факторов в гемостазе при язвенном кровотечении выявила закономерное повышение чувствительности тромбоцитов к коллагену. EC_{50} к данному индуктору АТ при язвенном кровотечении была в 2-5 раз ниже контроля и варьировала в пределах от 0,02 до 0,045 мкМ. Причем данный показатель характеризовался отличным от нормального закона распределением. Клинико-биохимические сопоставления позволили

интерпретировать гетерогенность полученных результатов. Максимальный риск кровотечения (41,4%) был обнаружен у пациентов с резким снижением ЕС50 коллагена. При этом повышение чувствительности к эффектам коллагена может отражать как индивидуальные особенности экспрессии рецепторов гликокаликса тромбоцитов, так и выраженную деструкцию тканей в зоне язвенного дефекта [5]. Отчасти данный феномен может быть обусловлен выраженной эндотелиальной дисфункцией, учитывая, что нарушение структурно-функционального состояния эндотелия сопровождается обнажением базальной мембраны сосудов, повышением адгезии и последующей активацией тромбоцитов [3]. Парадоксально, но при этом в 2-х случаях рецидива кровотечений ЕС50 коллагена находилась в пределах 0,035-0,04 мкМ.

Выводы

Проведенные исследования показали, что при язвенном кровотечении имеет место измене-

ние чувствительности тромбоцитов к системным, тканевым, аутокринным факторам при усилении сопряженности с системой коагуляции крови. Общей закономерностью явилось проагрегантное состояние тромбоцитов. Однако при этом отмечена вариабельность их чувствительности к адреналину, АДФ, тромбину и коллагену, отражающая индивидуальные особенности реакции организма на кровопотерю и деструктивный процесс в ГДЗ. Факторами риска раннего рецидива кровотечения является высокая адренореактивность. Среди факторов риска развития поздних рецидивов кровотечений следует отметить низкую адренореактивность и альтернативный характер реакции на тромбин. Дальнейшее изучение функционального состояния тромбоцитов позволит расшифровать механизмы развития и рецидивирования язвенных кровотечений, разработать стратегию индивидуализированной коррекции дизрегуляторных нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баринев Э. Ф. Использование теста агрегации тромбоцитов in vitro для оценки адренореактивности организма // Лабораторная диагностика. – 1999. – №4. – С. 39-42.
2. Баркаган З.С., Момот А.П. Основы диагностики нарушений гемостаза. – М.: «Ньюдиамед-АО», 1999. – 224 с.
3. Духанин А. С, Губарева Ф. Р. Фармакологическая регуляция активности тромбоцитов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – №4. – С. 66-71.
4. Платонов А.Е. Статистический анализ в биологии и медицине. – М.: Изд-во РАМН, 2000. – С. 5-50.
5. Basson M.D. Gut mucosal healing: is the science relevant? Am. J. Pathol. 2002; 161: 1101-1105.
6. Hirano K. The role of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology Art. Thromb. Vase. Biol. 2007; 27: 812-823.
7. Micfarlane S.R., Seatter M.J., Kanke T. Proteinase activated receptors. Pharmacol. Rev. 2001; 53: 245-282.

УДК 616-092:612.73

© Р.А. Газизов, Р.М. Галлямов, Р.М. Хасанов, 2009

Р.А. Газизов, Р.М. Галлямов, Р.М. Хасанов РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ГЛАДКИХ МЫШЦ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ Казанский государственный медицинский университет, г. Казань

Исследовали реактивность гладкомышечных клеток легочной ткани человека при различных видах патологии легких. Показано усиление реактивности гладкомышечных клеток воздухоносных путей человека при воздействии карбахолином, т.е. отмечается влияние холинергического компонента у больных с патологией легких, тогда как бронхомоторный тонус здоровых людей обуславливался преобладанием гистаминового компонента. Следствием удаления эпителия мелких бронхов явились повышение реактивности гладких мышц к сокращающим агентам (гистамин, 5-гидрокситриптамин) и электрическая стимуляция дыхательных путей.

Ключевые слова: гиперреактивность бронхиальных путей, гладкомышечные клетки воздухоносных путей, гистамин, карбахолин.

R.A.Gazizov, R.M. Gallyamov, R.M. Khasanov THE REGULATION OF AIRWAYS SMOOTH MUSCLE CELLS ACTIVITY WITHIN NORM AND PATHOLOGY

Reactivity of smooth muscle cells of the human lungs under different pathological conditions has been studied. It has been shown that the human airways smooth muscle cells reactivity is increased under the influence of carbacholine. The cholinergic component is noted among patients with different lung pathologies. Bronchomotor tone of healthy people can be explained by the prevalence of histamine component. Withdrawal of bronchial epithelium cells results in the increase in smooth muscle cells reactivity affected by constricting agents (histamine, 5-hydroxytryptamine) and electric stimulations.

Key words: hyperreactivity of the bronchial tract, airways smooth muscle cells, histamine, carbacholine.