

В.П. Польовий
С.Ю. Каратєєва

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці

ХАРАКТЕРИСТИКА ОСОБЛИВОСТЕЙ ЗМІН ТКАНИННОГО ФІБРИНОЛІЗУ В СТАРИХ ЩУРІВ ІЗ ПОРАНЕННЯМ СЕЛЕЗІНКИ

Ключові слова: селезінка, поранення, кровотеча, фібриноліз, вік.

Резюме. Встановлено, що після поранення селезінки в статевозрілих щурів сумарна фібринолітична активність селезінкової тканини швидко зростає і залишається підвищеною впродовж всього одностодінного експериментального періоду внаслідок збільшення як неферментативного фібринолізу, так і за рахунок інтенсифікації ензиматичного лізису фібрину. У старих щурів у відповідь на поранення селезінки відбувається швидко і тривале підвищення сумарної фібринолітичної активності в селезінковій тканині, що також відбувається за рахунок підвищення як ферментативного, так і неферментативного фібринолізу. У перші 30 хв. після поранення селезінки в структурі загального тканинного фібринолізу в селезінковій тканині статевозрілих щурів переважає частка неферментативної фібринолітичної активності, що надалі змінюється підвищенням частки ферментативного лізису фібрину. Подібні, але виражені у значно більшій мірі, зміни структури тканинного фібринолізу відбуваються у відповідь на поранення селезінки в старих тварин.

Вступ

Всесвітня організація охорони здоров'я наголошує, що впродовж наступного десятиріччя кількість осіб старших вікових груп буде суттєво зростати [12]. Це вказує на необхідність вдосконалення медичної допомоги населенню похилого і старечого віку, адже відомо, що з віком відбуваються суттєві зміни в діяльності всіх органів і систем організму, що старіє. Зокрема, вікові зсуви в системі регуляції агрегатного стану крові здатні суттєво погіршувати перебіг репаративної регенерації при різноманітній патології, особливо при травмах, коли навантаження на діяльність функціональних систем значно зростає [4]. Провідного значення вікові зміни гемостазу набувають при абдомінальній травмі, коли внутрішня кровотеча спричиняє потужний стресовий вплив на всі життєво важливі системи організму людини похилого або старечого віку [1, 13, 14]. Нерідко в таких випадках порушується спряженість процесів згортання крові і фібринолізу, як плазмового, так і локального тканинного лізису фібрину. Вікові особливості змін останнього при пораненні внутрішніх органів вивчені недостатньо.

Мета дослідження

Дослідити в експерименті особливості динаміки змін локального фібринолізу в тканині селезінки після її стандартизованого поранення в старих щурів.

Матеріали і методи

У роботі використано 75 статевозрілих і 75 старих самців білих щурів із масою тіла 0,14-0,16 кг (статевозрілі тварини віком 4-6 міс.) та 0,49-0,55 кг (старі тварини віком 20-22 міс.).

Усі операційні втручання проводилися відповідно до основних вимог Ванкуверських конференцій (1979, 1994) про біомедичні експерименти щодо гуманного відношення до лабораторних тварин, в асептичних умовах, під уретановим наркозом (1000 мг на 1 кг маси тіла). Після середньої лапаротомії вдовж білої лінії живота моделювали стандартизованого поранення селезінки в статевозрілих і старих щурів проводили за допомогою очного хірургічного пінцета, робочі кінці якого заводили на краї селезінки на 2 мм і стискували (рис.).

У всіх випадках після поранення селезінки на розріз черевної порожнини накладали 5 швів, що запобігало тепловим втратам.

Дослідження змін параметрів тканинного фібринолізу виконувалося серійно (по 15 тварин в серії) - через 15, 30, 45 і 60 хв. після поранення селезінки. Після евтаназії тварин шляхом забору крові з черевної аорти наважки селезінки одразу заморожували в рідкому азоті. Перед дослідженням тканинного фібринолізу наважки селезінки розморожували, гомогенізували в 2,0 мл охолодженого боратного буферу (рН 9.0) і надалі використовували в біохімічному аналізі.

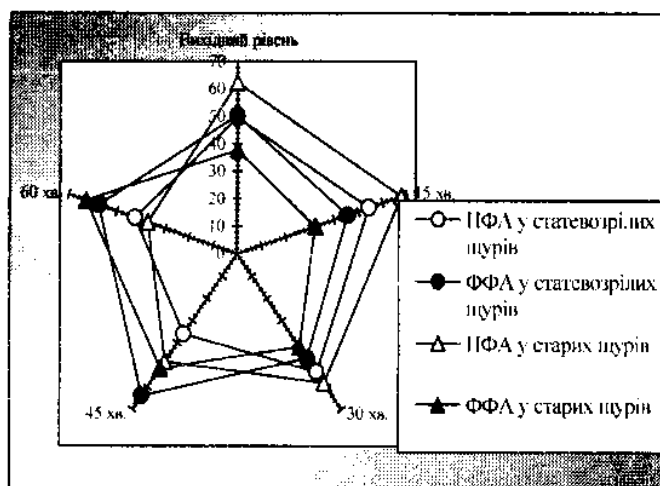


Рис. Порівняльна характеристика динаміки змін структури фібринолізу в тканині селезінки статевозрілих і старих щурів із пораненням селезінки (% від сумарної фібринолітичної активності)

Примітка. НФА - неферментативна фібринолітична активність; ФФА - ферментативна фібринолітична активність

Сумарну (СФА), неферментативну (НФА) і ферментативну (ФФА) фібринолітичну активність селезінкової тканини визначали за допомогою азофібрину - реактив фірми "Simko Ltd." (Україна). Принцип методу: при інкубації азофібрину зі стандартною кількістю плазміногену в присутності активаторів та інгібіторів фібринолізу, що містяться в селезінковій тканині, утворюється плазмін, активність якого оцінюється за ступенем забарвлення розчину в лужному середовищі в присутності - амінокапронової кислоти (неферментативний фібриноліз) або без неї (сумарна фібринолітична активність). Різниця між ними відповідала інтенсивності ферментативного фібринолізу.

Визначення фібринолітичної активності селезінкової тканини проводили за методикою [11]. Гомогенати селезінкової тканини (0,5 мл) змішували з 0,5 мл боратного буфера (рН 9,0). По 0,5 мл суміші вносили в 2 ряди пробірок із марками "СФА" (сумарна фібринолітична активність) і "НФА" (неферментативна фібринолітична активність). Пробірки "СФА" містили 1 мг азофібрину, 1 мг плазміногену ("Simko Ltd", Україна) і 1 мл боратного буфера (рН 9,0). У пробірки "НФА", крім того, додавали 5 мг - амінокапронової кислоти, для пригнічення активності плазміну. У дублікати пробірок "РП" (розчин порівняння) замість гомогенату селезінкової тканини додавали 0,5 мл боратного буфера. Усі пробірки одночасно інкубували у водяному термостаті "ТПС-8" за температури 37°C впродовж 15 хв. За цей період відбувається розпад азофібрину і звільнення азобарвника в інкубаційний розчин пропорційно фібринолітичній активності селезінкової тканини. Після інкубації всі пробірки одночасно охолоджували до 5°C з метою припинення лізису азофібрину.

У кожному пробірку додавали по 20 мкл 5 М розчину NaOH для створення лужного середовища. Потім вміст пробірок фільтрували через прошарок вати, що утримувався в шприцах. На спектрофотометрі "СФ-46" (Росія) при довжині хвилі 440 нм вимірювали оптичну щільність проб. Отримані екстинції перераховували в мкг азофібрину на 1 г селезінкової тканини за 1 год. інкубації за формулою:

$$\text{СФА (НФА)} = (E_{1\%} \times 4 \times 1000 \times k) : n \text{ (мг)} = \text{мкг азофібрину/1 г селезінкової тканини за 1 год.}$$

де n - маса наважки органу, k - коефіцієнт перерахунку.

Статистичну обробку отриманих даних проводили методом варіаційного аналізу на РС IBM 586 з визначенням критерію Стьюдента за допомогою програми "BioStat" [3].

Обговорення результатів дослідження

Результати дослідження динаміки змін фібринолітичної активності в тканині селезінки статевозрілих і старих щурів з селезінковою кровотечею наведені в таблиці. У статевозрілих щурів у відповідь на поранення селезінки її тканинна сумарна фібринолітична активність швидко і суттєво зростала: через 15 хв. - на 35,5%, через 30 хв. - на 82,3%, через 45 хв. - на 71,3%, через 60 хв. - на 68,5%. Подібна реакція спостерігалася й у старих щурів, у котрих СФА селезінкової тканини через 15 хв. після поранення селезінки перевищувала контроль в 1,7 раза, через 30 хв. - у 3,2 раза через 45 хв. - у 4,3 раза, через 60 хв. - у 4,2 раза. Порівняльний аналіз не виявив достовірної різниці вихідного рівня в статевозрілих і старих щурів. Проте після поранення селезінки СФА її тканини в старих щурів починаючи з 30-ї хв. значно перевищувала таку в статевозрілих

Таблиця

Динаміка змін тканинного фібринолізу в шурів із пораненням селезінки ($\bar{x} \pm Sx$)

Періоди спостереження	Статевозрілі шури n=15			Старі шури n=15		
	СФА, мкг азофібрину/1 г тканини за 1 год.	НФА, мкг азофібрину/1 г тканини за 1 год.	ФФА, мкг азофібрину/1 г тканини за 1 год.	СФА, мкг азофібрину/1 г тканини за 1 год.	НФА, мкг азофібрину/1 г тканини за 1 год.	ФФА, мкг азофібрину/1 г тканини за 1 год.
Контроль (вихідні показники)	8,25±0,54	4,09±0,32	4,16±0,34	7,64±0,55 p₁>0,05	4,77±0,47 p₁>0,05	2,87±0,37 p₁<0,05
Через 15 хв. після поранення	11,18±0,90 p<0,02	6,08±0,52 p<0,01	5,10±0,51 p>0,05	13,28±0,73 p<0,001 p₁>0,05	8,99±0,58 p<0,001 p₁<0,001	4,30±0,51 p<0,05 p₁>0,05
Через 30 хв. після поранення	15,04±0,87 p<0,001	8,00±0,63 p<0,001	7,04±0,60 p<0,001	24,13±1,01 p<0,001 p₁<0,001	14,04±0,97 p<0,001 p₁<0,001	10,08±0,61 p<0,001 p₁<0,02
Через 45 хв. після поранення	14,13±0,76 p<0,001	5,09±0,54 p>0,05	9,04±0,67 p<0,001	32,95±1,39 p<0,001 p₁<0,001	15,97±1,08 p<0,001 p₁<0,001	16,98±1,02 p<0,001 p₁<0,001
Через 60 хв. після поранення	13,90±0,93 p<0,001	5,91±0,63 p<0,05	7,99±0,60 p<0,001	31,79±1,13 p<0,001 p₁<0,001	11,80±0,78 p<0,001 p₁<0,001	20,01±0,97 p<0,001 p₁<0,001

Примітка. СФА - сумарна фібринолітична активність; НФА - неферментативна фібринолітична активність; ФФА - ферментативна фібринолітична активність; р - ступінь достовірності різних показників відносно вихідного рівня; р₁ - ступінь достовірності різних показників у статевозрілих і старих шурів у відповідні періоди спостереження; n - число спостережень

тварин: в 1,6 раза - через 30 хв., в 2,3 раза - через 45 і 60 хв.

Неферментативний фібриноліз у селезінковій тканині статевозрілих щурів через 15 хв. після поранення селезінки збільшувався на 48,7%, через 30 хв. - 95,6%, через 60 хв. - на 44,5% (через 45 хв. НФА була недостовірно вищою за контроль). У старих щурів НФА тканини селезінки в 1,9 раза перевищувала контрольний рівень вже на 15 хв. досліджу, а через 30, 45 і 60 хв. була більшою за контроль відповідно у 2,9, 3,3 і 2,5 раза. Вихідні показники НФА у старих і статевозрілих тварин практично відповідали один одному. Однак через 15 хв. після травмування селезінки в старих щурів інтенсивність неспецифічного лізису в селезінковій тканині перевищувала таку в статевозрілих щурів на 47,9%, через 30 хв. - на 75,5%, через 45 хв. - у 3,3 раза, через 60 хв. - у 2,0 раза.

У статевозрілих щурів через 15 хв. після поранення селезінки ФФА селезінкової тканини достовірних змін не зазнавала. Проте надалі спостерігалась активація тканинного ферментативного фібринолізу: через 30 хв. ФФА перевищувала вихідний рівень на 69,2%, через 45 хв. - у 2,2 раза, через 60 хв. - на 92,1%. Водночас у старих тварин у відповідь на поранення селезінки відбувалось прогресивне підвищення інтенсивності ензиматичного лізису фібрину: у відповідні періоди спостереження ФФА була більшою за контроль в 1,5, 3,5, 5,9 і 7,0 разів. Варто зазначити, що вихідний рівень ФФА у тканині селезінки виявився в старих щурів на 31,0% меншим, ніж у статевозрілих тварин. Через 15 хв. після поранення селезінки достовірної міжгрупової різниці ФФА не спостерігалось, однак через 30, 45 і 60 хв. ферментативний фібриноліз у селезінковій тканині старих щурів був вищим відповідно на 43,2, 87,8 і 150,0%.

У структурі сумарної фібринолітичної активності тканини селезінки статевозрілих щурів частки НФА і ФФА виявлялись практично рівними. У динаміці селезінкової кровотоці до 30 хв. включно переважала частка неферментативного фібринолізу, а на 45-у і 60-у хв. суттєво збільшувалася частка ензиматичного лізису фібрину (рис.). У старих щурів у структурі СФА селезінкової тканини визначально переважала частка неферментативного фібринолізу, що тривало включно до 30 хв. досліджу після чого відносна інтенсивність ензиматичного лізису фібрину, як й у статевозрілих щурів, суттєво збільшувалась. Отже, основна різниця в динаміці змін структури тканинного фібринолізу в селезінці у статевозрілих і старих щурів полягала в тому, що в останніх впродовж перших 30 хв. після поранення селезінки

значно переважала частка низькоефективного неферментативного лізису фібрину.

Травмування внутрішніх органів нерідко супроводжується синдромом системної запальної реакції - складним симптомокомплексом клінічних проявів хвороби, який характеризується порушенням мікроциркуляції і гемодинаміки, водно-сольового обміну, кислотно-лужного гомеостазу, структурними та ультраструктурними змінами в клітинах органів і тканин [2,7]. Основу метаболічних порушень складають швидко прогресуюча гіпоксія, мікроциркуляторні розлади, активація процесів перекисного окислення ліпідів на тлі зниження активності ферментів антиоксидантної системи [10], що не дозволяє реалізувати адаптаційно-компенсаторну перебудову гомеостатичних реакцій [6,9]. Важлива роль у механізмах синдрому системної запальної реакції належить протеолітичним ферментам. Протеази обумовлюють токсичну дію на центральну нервову систему, призводять до констрикції вільних судин, судин черевної порожнини, ішемії і некрозу тканин [5]. При надходженні в кровотік протеолітичні ферменти активують калікреїн-кінінову та згортальну системи, системи комплементу і фібринолізу, викликають розвиток дисемінованої інтраваскулярної гемокоагуляції, колапсу і шоку [8]. Результати нашого дослідження свідчать, що поранення селезінки в старих тварин характеризується різким підвищенням інтенсивності локального тканинного лізису фібрину, що слід враховувати в клініці, оскільки інтенсифікація фібринолізу здатна суттєво погіршити перебіг післяопераційного періоду не тільки внаслідок подовження внутрішньої кровотоці, але й через системні ефекти надмірного утворення плазміну [14].

Висновки

1. Після поранення селезінки у статевозрілих щурів сумарна фібринолітична активність селезінкової тканини швидко зростає і залишається підвищеною впродовж всього одногодинного експериментального періоду внаслідок збільшення як неферментативного фібринолізу, так і за рахунок інтенсифікації ензиматичного лізису фібрину.

2. У старих щурів у відповідь на поранення селезінки відбувається швидке і тривале підвищення сумарної фібринолітичної активності в селезінковій тканині, що також відбувається за рахунок підвищення як ферментативного, так і неферментативного фібринолізу.

3. У перші 30 хв. після поранення селезінки в структурі загального тканинного фібринолізу в

селезінковій тканині статевозрілих щурів переважає частка неферментативної фібринолітичної активності, що надалі змінюється підвищенням частки ферментативного лізису фібрину. Подібні, але виражені в значно більшій мірі, зміни структури тканинного фібринолізу відбуваються у відповідь на поранення селезінки в старих тварин.

Перспективи подальших досліджень

Вищезазначені дослідження обумовлюють проведення ідентичних клінічних досліджень, що має значення в адекватному веденні хворих із ушкодженням селезінки в післяопераційному періоді.

Література. 1. Абакумов М.М., Лебедев Н.В., Маларчук В.И. Объективная оценка тяжести травмы у пострадавших с сочетанными повреждениями // Вестник хирургии. - 2001. - Т.160, № 6. - С.42-45. 2. Аришчин В.Н., Катько В.А., Дмитриев В.В. и др. Эндогенная интоксикация у детей с гнойно-воспалительными заболеваниями // Мал. юбилейной конф., посвящ. 100-летию со дня рождения основоположника отечественной школы детских хирургов С.Д.Терновского. - Москва, 1996. - С.7-8. 3. Глазу С. Медико-биологическая статистика. - М.: Практика, 1999. - 459 с. 4. Гребенюк Ю.А., Ютовец Ю.Г. Результаты лечения пострадавших пожилого и старческого возраста с множественными и сочетанными повреждениями длинных костей конечностей // Ортопедия, травматология и протезирование. - 2001. - №3. - С.77-78. 5. Даниличев В.Ф., Максимов И.Б. Травмы и заболевания глаз. Применение ферментов и пептидных биорегуляторов. - Минск: Павука і тэхніка, 1994. - 223с. 6. Демидов В.М., Дмитриев Б.И., Торбинский А.М. и др. Цейрогуморальные нарушения у больных с острой абдоминальной патологией, осложнившейся перитонитом // Клин. хирургия. - 1996. - №2-3. - С.22. 7. Дорохин К.М., Спас В.В. Патогизиологические аспекты синдрома эндогенной интоксикации // Анестезиол. и реаниматол. - 1994. - №1. - С.56-60. 8. Калинин В.В., Оглоблина О.И., Денисов А.Ю. и др. Специфическая плазмасорбция протеиназ как новый метод детоксикации крови в неотложной хирургии органов брюшной полости // Труды IV Всесоюз. съезда гастроэнтерологов. - Москва, Ленинград, 1990. - Т.2. - С.647-648. 9. Криворучко Н.А., Гусак И.В., Тищенко А.М. и др. Механизмы возникновения полиорганной недостаточности при перитоните // Клин. хирургия. - 1996. - №2-3. - С.32. 10. Павловський М.П., Шахова Т.І., Вишневський В.І. та ін. Лікування та прогноз перитонеального септичного шоку // Клин. хирургия. - 1996. - №2-3. - С.44-45. 11. Патент України на винахід № 30727 А. Спосіб визначення тканинної фібринолітичної активності / Б.М. Бондар, О.Л. Кухарчук, В.М. Магалає. - Бюл. № 8. - 1999; Бюл. № 7-11. - 2000. 12. Программные документы ВОЗ по старению // Клин. геронтол. - 2000. - № 9-10. - С.90-92. 13. Navarrete-Navarro P., Medina P., Ruiz-Bailan M. et al. Respiratory distress in severe trauma: mortality protection factors // Intensive Care Med. - 1997. - Vol. 23, № 1. - P.7. 14. Robbic L.A., Dummer S., Booth N.A. et al. Plasminogen activator inhibitor 2 and

urokinase-type plasminogen activator in plasma and leucocytes in patients with severe sepsis // Brit. J. Haematol. - 2000. - Vol.109, № 2. - P.342-348.

ХАРАКТЕРИСТИКА ОСОБЕННОСТЕЙ ИЗМЕНЕНИЙ ТКАНЕВОГО ФИБРИНОЛИЗА У СТАРЫХ КРЫС С РАНЕНИЕМ СЕЛЕЗЕНКИ

В.П. Полевой, С.Ю. Каратсева

Резюме. Установлено, что после ранения селезенки у половозрелых крыс суммарная фибринолитическая активность селезеночной ткани быстро возрастает и остается повышенной на протяжении всего одночасового экспериментального периода вследствие увеличения как неферментативного фибринолиза, так и за счет интенсификации энзиматического лизиса фибрина. У старых крыс в ответ на ранение селезенки происходит быстрое и продолжительное повышение суммарной фибринолитической активности в селезеночной ткани, что также происходит за счет повышения как ферментативного, так и неферментативного фибринолиза. В первые 30 мин. после ранения селезенки в структуре общего тканевого фибринолиза в селезеночной ткани половозрелых крыс преобладает доля неферментативной фибринолитической активности, что в дальнейшем сменяется повышением доли ферментативного лизиса фибрина. Подобные, но значительно более выраженные, изменения структуры тканевого фибринолиза происходят в ответ на травму селезенки у старых животных.

Ключевые слова: селезенка, ранение, ткань, фибринолиз, возраст.

THE CHARACTERISTIC OF PECULIARITIES OF THE TISSUE FIBRINOLYSIS CHANGES IN OLD RATS WITH SPLEEN INJURY

V.P. Poliovy, S.Y. Karatyeyeva

Abstract. After spleen injury in mature rats the total fibrinolytic activity of the spleen tissue increases quickly and remains high during the whole one hour experimental period due to the both increasing non - enzymatic fibrinolysis and intensification of enzymatic fibrinolysis. Old rats respond to spleen injury by quick and long increase of the total fibrinolytic activity in the spleen tissue, that, also takes place at the expense of increasing both enzymatic and non - enzymatic fibrinolysis. During the first 30 minutes after spleen injury in the structure of general tissue fibrinolysis in the spleen tissue of mature rats the part of non - enzymatic fibrinolytic activity prevails that later changes into the increase of enzymatic fibrinolysis. Similar, but more expressed changes of the tissue fibrinolysis structure take place in the response to spleen injury of old animals.

Key words: spleen, injury, bleeding, fibrinolysis, age.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2008. - Vol.7, №1. - P.81-85.

Надійшла до редакції 15.11.2007

Рецензент - проф. Ф.Г. Кулачек