

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ВИТАМИНОВ-АНТИОКСИДАНТОВ НА ГЕМОСТАЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИДАЦИИ

А. Ш. Бышевский, С. Л. Галян, И. В. Ральченко, А. Ю. Рудзевич, Р. Г. Алборов, Е. А. Винокурова, А. И. Волков, М. К. Умутбаева¹

Введение крысам прооксиданта (ацетат свинца) с рационом ускоряет липопероксидацию, снижает антиоксидантный потенциал и толерантность к тромбину, повышает уровень маркеров внутрисосудистого свертывания крови. При введении свинца на фоне витаминных комплексов с антиоксидантными свойствами (компливит или селмевит) сдвиги ослабляются и растет толерантность к тромбину. Особенно эффективен селмевит, содержащий наряду с витаминами селен. Допущена возможность коррекции нарушений гемостаза при гипероксидации витаминами-антиоксидантами.

Ключевые слова: липопероксидация, антиоксиданты, гемостаз

ВВЕДЕНИЕ

Ускорение липопероксидации, свойственное многим патологическим состояниям [6], усиливает склонность к тромбозам [13 – 15]. Антиоксиданты, ограничивая липопероксидацию и сдвиги гемостаза, снижают частоту тромботических осложнений [4, 5]. Целесообразно изучить влияние на гемостаз антиоксидантных витаминных комплексов, не имеющих противопоказаний, и, следовательно, могущих использоваться при заболеваниях, протекающих с активацией липопероксидации. В этом плане представляют интерес поливитаминные комплексы с высокой антиоксидантной активностью — компливит и селмевит [10]. Антиоксидантные свойства обоих препаратов обусловлены содержащимися в их составе витаминами А, Е, С, Р, В₁, В₂ и РР, которые играют роль “ловушек” свободных радикалов, содержат протектор HS-групп (липоевую кислоту). Селмевит, кроме того, содержит еще и селен — компонент глутатин пероксидазы — энзима антиоксидантной защиты [5, 10].

Цель работы — сравнить влияние компливита и селмевита на липопероксидацию, гемостаз и толерантность к тромбину в эксперименте.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на нелинейных белых крысах-самцах (308 особей, 150 ± 15 г, распределение по группам — в тексте и таблицах). В плазме крови определяли содержание фибриногена, растворимых комплексов фибринмономеров [2], тромбоцитарных факторов P₃ и P₄ по Rabiner, Groder [1], D-димеров (“D-dimer test” Roche), продуктов деградации фибрина [2], т.е. маркеров внутрисосудистого свертывания крови [8], активированное время рекальцификации, активированное частичное тромбопластиновое время, общую коагулирующую активность тромбоцитов [3], их спонтанную и АДФ-агрегацию [1, 7]. Липопероксидацию оценивали в тромбоцитах по уровню диеновых конъюгатов и липопероксидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, а антиоксидантную активность — по величине индукции — времени, затрачиваемого на поглощение

исследуемой пробой 25 мкл O₂ после внесения инициатора свободнорадикального окисления динитрилазобисизомаляной кислоты [11]. Исследуемые вещества вводили с рационом: прооксидант (ацетат свинца) [9] 0,5 мг/кг ежедневно в течение 15 дней без добавок либо с компливитом или селмевитом (из расчета по витамину А — 1,8 мг/кг в сутки; ранее показано, что в этих дозах проявляется антиоксидантный эффект, менее выраженный на фоне нормы и особенно заметный на фоне гипероксидации [4, 5, 10]). Соответствие этой дозы дозе для человека определено тем, что она превышает суточную потребность крысы во столько же раз, во сколько лечебная доза для человека превышает его суточную потребность.

Пробы брали на 5-е, 10-е и 15-е сутки. Толерантность к тромбину оценивали на 15-й день по частоте выживания после введения тромбина контрольным крысам и крысам, получавшим свинец без добавок, либо с компливитом или с селмевитом. Раствор тромбина вводили в яремную вену (1 мл/кг массы, активность — 25 с) после пробуждения от наркоза (диэтиловый эфир), который применяли кратковременно для обнажения яремной вены овальным разрезом с тем, чтобы в соответствии с гемостазиологическими правилами произвести инъекцию или отбор крови в строго необходимом количестве в шприц, содержащий стабилизирующий раствор [1]. У части выживших крыс через 0,5 ч после инъекции тромбина определяли в плазме маркеры внутрисосудистого свертывания крови.

В работе использованы: для определения показателей состояния гемостаза реагенты фирмы “Технология-стандарт” (лицензия Минздрава РФ № 42/97-466-0406), компливит и селмевит, произведенные предприятием “УфаВит” (Башкортостан).

Цифровые результаты исследований обрабатывали методом вариационной статистики для малых рядов наблюдений, вычисляя среднюю арифметическую (M), ее среднюю ошибку (m) и среднеквадратическое отклонение (σ). Для оценки достоверности отличий вычисляли доверительный коэффициент Стьюдента (t) и величину вероятности (p). Сопоставляя интенсивные показатели, использовали альтернативное варьирование, рассчитывая те же величины. Различия считали достоверными при p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведены только изменявшиеся показатели, где видно, что на 5-й день введения свинца имеется тенденция ускорения липопероксидации (рост уровня диеновых конъюгатов), реализованная на 10-й и 15-й дни (рост уровня диеновых конъюгатов, вторичных липопероксидов и сокращение периода индукции). Активировались и тромбоциты (рост спонтанной и АДФ-агрегации), повысился уровень маркеров

¹ Кафедра биохимии (зав. — проф. А. Ш. Бышевский) Тюменской государственной медицинской академии Минздрава России, Тюмень, 625023, ул. Одесская 54.

внутрисосудистого свертывания (продукты деградации фибрина, растворимые комплексы фибринмономеров, D-димеры, факторы P₃ и P₄).

При введении свинца с компливитом (особенно с селмевитом) липопероксидация не активировалась, а на 15-й день была снижена (снижен уровень диеновых конъюгатов, удлинен период индукции). Сдерживались активация тромбоцитов и рост уровня маркеров внутрисосудистого свертывания — их содержание на 15-й день ниже контроля.

Таким образом, антиоксиданты препятствуют активации гемостаза при гиперлипидпероксидации, как это предположили ранее [4, 5, 12]. Кроме того, выявилась способность антиоксидантов ограничивать ускорение непрерывного внутрисосудистого свертывания, от интенсивности которого зависит склонность к гиперили гипокоегуляции [8]. Селмевит, включающий наряду с витаминами кофактор ферментов антиоксидантной защиты (селен), оказался эффективнее компливита.

Ускоренной липопероксидации и низкому антиоксидантному потенциалу на всех этапах опытов сопутствует активация внутрисосудистого свертывания кро-

ви: росту уровня липопероксидов и удлинению периода индукции соответствует рост уровня маркеров внутрисосудистого свертывания крови (см. табл. 1).

После введения тромбина из 40 контрольных крыс выжили 26 (65 ± 3,2 %), из 40 получавших свинец (15 дней) после введения тромбина выжило 12 (30 ± 2,8 %, $p < 0,05$), из 40 получавших свинец и компливит выжили 14 (35 %, $p < 0,05$), из 40 получавших селмевит — 19 (47,5 %, $p < 0,05$). Разница между получавшими компливит или селмевит также достоверна — $p < 0,05$.

Активация липопероксидации свинцом усилила реакцию на тромбин: резкое снижение фибриногемии, прирост маркеров внутрисосудистого свертывания, усиление агрегации тромбоцитов (табл. 2). У крыс, получавших свинец с компливитом или селмевитом сдвиги менее выражены, особенно на фоне селмевита.

ВЫВОДЫ

1. Интенсивность непрерывного внутрисосудистого свертывания крови пропорциональна уровню продук-

Таблица 1. Липопероксидация и гемостаз при введении свинца (верхняя строка — вводили только свинец, вторая — свинец и компливит, нижняя — свинец и селмевит), $n = 6$ в каждой точке

Показатель	Контроль	5-й день	10-й день	15-й день
Диеновые конъюгаты, А/мг липопрогеида	0,05 ± 0,002	0,09 ± 0,008* 0,08 ± 0,007* 0,07 ± 0,07	0,11 ± 0,005* 0,07 ± 0,006 ⁺ 0,07 ± 0,003 ⁺	0,11 ± 0,004* 0,06 ± 0,005 ⁺ 0,04 ± 0,001* \ll
Период индукции, мин/мл	45,8 ± 1,6	46,9 ± 2,5 47,8 ± 1,9 48,7 ± 1,8	41,4 ± 2,1* 48,6 ± 2,0 ⁺ 54,6 ± 2,1* \ll	40,1 ± 2,2+~ 49,8 ± 2,0* ⁺ 55,7 ± 1,9* \ll
Общая коагулирующая активность тромбоцитов, %	92,3 ± 1,7	95,7 ± 2,2* 91,8 ± 1,9 90,3 ± 1,8	97,8 ± 2,4* 90,4 ± 1,9 ⁺ 88,0 ± 1,6* \ll	106 ± 3,1* 88,7 ± 2,7 ⁺ 83,6 ± 1,9* \ll
Спонтанная агрегация, %	5,4 ± 0,28	5,6 ± 0,35 5,4 ± 0,61 5,2 ± 0,57	5,9 ± 0,30 5,1 ± 0,29 ⁺ 4,4 ± 0,29* \ll	6,3 ± 0,31* 5,0 ± 0,12 ⁺ 4,8 ± 0,29* \ll
АДФ-агрегация, %	62,7 ± 1,32	63,8 ± 2,5 62,5 ± 1,9 60,5 ± 2,1	66,7 ± 1,8* 60,1 ± 1,8+ 55,2 ± 1,6* \ll	69,8 ± 1,4* 57,7 ± 1,5* ⁺ 53,4 ± 1,4* \ll
Тромбоцитарный фактор P ₃ , %	90,2 ± 2,3	91,1 ± 2,3 90,8 ± 1,9 88,1 ± 2,2	94,3 ± 2,4 89,0 ± 1,7+ 83,2 ± 1,8* \ll	99,7 ± 2,4 87,2 ± 1,4* ⁺ 81,8 ± 1,4* \ll
Тромбоцитарный фактор P ₄ , с	4,1 ± 0,03	3,8 ± 0,04 3,7 ± 0,03* 3,6 ± 0,04*	4,3 ± 0,03 3,8 ± 0,02* ⁺ 3,4 ± 0,01* \ll	4,8 ± 0,03* 3,7 ± 0,01* ⁺ 3,1 ± 0,02* \ll
Продукты деградации фибрина, мг%	16,3 ± 1,5	16,9 ± 1,5 16,2 ± 1,6 15,8 ± 1,5	18,9 ± 1,1* 15,8 ± 1,7 ⁺ 14,2 ± 1,1* ⁺	19,8 ± 1,0* 14,4 ± 1,0* ⁺ 12,1 ± 0,9* \ll
Растворимые комплексы фибринмомера, мкг/мл	25,5 ± 0,8	24,9 ± 0,9 23,8 ± 1,1 22,9 ± 1,6	27,9 ± 1,0* 24,6 ± 1,9 ⁺ 22,0 ± 1,4* \ll	28,9 ± 0,9* 22,7 ± 0,5* ⁺ 20,0 ± 0,4* \ll
D-димеры, нг/мл	0,18 ± 0,091	0,17 ± 0,012 0,16 ± 0,016 0,15 ± 0,019*	0,23 ± 0,014* 0,17 ± 0,013 ⁺ 0,15 ± 0,015 ⁺⁺	0,25 ± 0,02* 0,15 ± 0,03* ⁺ 0,12 ± 0,01* \ll

Примечание. А — оптическая плотность при длине волны 232 нм. Отличия достоверны: * — от контроля, ⁺ — от первой строки, \ll — между третьей и второй строками.

Таблица 2. Индикаторы внутрисосудистого свертывания через 0,5 ч после внутривенного введения тромбина (0,1 мл/100 г, активность 12 с) на фоне свинца, свинца и антиоксидантов

Показатель	Контроль, n = 8	Вводили свинец, n = 9	Вводили свинец и компливит, n = 8	Вводили свинец и селмевит, n = 9
	1	2	3	4
Тромбоцитарный фактор P ₃ , %	89,7 ± 2,1	132 ± 2,6 ¹	103 ± 2,3 ¹	94,2 ± 2,0 ^{1,2,3}
Тромбоцитарный фактор P ₄ , с	4,2 ± 0,1	7,2 ± 0,2 ¹	6,1 ± 0,3 ^{1,2}	5,1 ± 0,2 ^{1,2,3}
Фибриноген, г/л	3,3 ± 0,1100	0,09 ± 0,0001 ¹	1,12 ± 0,0021 ^{1,2}	2,11 ± 0,09 ^{1,2,3}
Продукты деградации фибрина, мг %	15,9 ± 1,7	41,3 ± 1,9 ¹	25,6 ± 1,7 ^{1,2}	23,4 ± 1,5 ^{1,2,3}
Растворимые комплексы фибринмономера, кг/мл	25,5 ± 0,8	44,2 ± 2,0 ¹	38,2 ± 2,0 ^{1,2}	29,9 ± 1,4 ^{1,2,3}
D-димеры, нг/мл	0,18 ± 0,091	0,83 ± 0,102 ¹	0,61 ± 0,103 ^{1,2}	0,43 ± 0,097 ^{1,2,3}

Примечания. Отличия достоверны от соответствующей колонки.

тов перекисления липидов и находится в обратной зависимости с антиоксидантным потенциалом.

2. Способность организма компенсировать внезапное увеличение тромбинемии ослабляется при ускорении липопероксидации.

3. Витаминные комплексы с антиоксидантной активностью (селмевит и компливит), ограничивая эффект прооксиданта, уменьшают активацию тромбоцитов и ускорение непрерывного внутрисосудистого свертывания крови, повышают толерантность к тромбинемии. Селмевит (более “мощный” антиоксидант) действует эффективнее компливита.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Балуда, З. С. Баркаган, Е. Д. Гольдберг и др., *Лабораторные методы исследования системы гемостаза*, Томский государственный университет, Томск (1980).
2. А. Ш. Бышевский, И. А. Мухачева, В. М. Шафер, А. С. 1659855 СССР, *Бюлл. Открыт.*, № 24, (1991).
3. А. Ш. Бышевский, В. Г. Соловьев, И. В. Селиванова, Патент 2061953, *Бюлл. Открыт.*, № 16, (1996).
4. А. Ш. Бышевский, С. Л. Галян, В. А. Полякова и др., *Тромбоз, гемостаз и реология* № 1, 53 – 58 (2003).
5. А. Ш. Бышевский, М. К. Умутбаева, Р. Г. Алборов, *Связь гемостаза с перекисным окислением липидов*, Медицинская книга, Москва.
6. Ю. А. Владимиров, *Вестн. РАМН*, № 7, 43 – 51 (1998).
7. З. А. Габбасов, Е. Г. Попов, И. Ю. Гаврилов и др., *Бюлл. экпер. биол.*, № 10. 437 – 439 (1989)
8. Д. М. Зубаиров, *Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования*, ФЭН АНТ, Казань (2000).
9. Д. С. Марченко, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Уфа (1998).
10. Ю. Ф. Удалов, А. Ш. Бышевский, А. Г. Дараган и др., *Планета и здоровье — 2000*, Москва (2000).
11. В. Н. Ушкалова, Н. В. Иоанидис, З. М. Деева и др., *Лаб. дело*, № 6, 446 – 460 (1987).
12. П. Я. Шаповалов, *Тромбоз, гемостаз и реология*, № 2 (2), 28 – 33 (2000).
13. C Antoniades, D Tousoulis, C. Tentolouris, et al., *Thromb. Haemost.*, № 89, 990 – 995 (2003)
14. C. Banfi, M. Camera, G. Giandomenico, et al., *Thromb. Haemost.*, № 89, 544 – 553 (2003).
15. S. T Laroia., A. K. Ganti, A. T. Laroia, et al., *Int. J. Cardiol.*, № 88, 1 – 9 (2003).

Поступила 08.09.04

THE EFFECT OF A COMBINED VITAMIN – ANTIOXIDANTS PREPARATIONS ON HEMOSTASIS IN RATS WITH EXPERIMENTAL HYPERPEROXIDATION

A. Sh. Byshavskii, S. L. Galyan, I. V. Ral'chenko, A. Yu. Rudzevich, R. G. Alborov, E. A. Vinokurova, A. I. Volkov, and M. K. Umutbaeva

Tyumen State Medical Academy, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. Odesskaya 54, Tyumen, 625000 Russia

Experiments on a group of 308 rats showed that prooxidant (lead acetate) introduced *per os* with daily meals decreases the antioxidant potential (increases lipid peroxidation, LPO) and reduces tolerance with respect to thrombin (increases the level of intravascular blood coagulation markers). For the same treatment on the background of a vitamin – antioxidants preparations (complivit or selmevit), the level of changes was significantly decreased and the resistance to thrombin was increased. Selmevit (containing selenium) was more effective. It is concluded that complex vitamin – antioxidants preparations can be used for correcting hemostatic changes in cases of hyperoxidation.