

© Л.И. Сбродова, С.А. Ерофеев, 2002

## **Тканевая система свертывания крови при удлинении конечности**

*(экспериментальное исследование)*

**Л.И. Сбродова, С.А. Ерофеев**

## **The tissue system of blood coagulation in limb lengthening**

*(Experimental study)*

**L.I. Sbrodova, S.A. Yerofeyev**

Государственное учреждение науки

Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова, г. Курган  
(генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

В эксперименте у 20 взрослых беспородных собак, которым удлинляли голень аппаратом Илизарова, исследовали свертывающий и антисвертывающий потенциал крови и икроножных мышц удлиняемой и контралатеральной конечностей в конце периодов distraction и фиксации. Установлено, что в кровотоке вследствие большой активности и устойчивости к разведению доминировало действие тромбопластических факторов. В конце периода distraction в мышечных экстрактах содержалось больше антигепаринового фактора, чем гепарансульфата, что в целом способствовало поддержанию гиперкоагулемии в этот период эксперимента. Экстракты скелетных мышц при удлинении конечности существенно влияли на угнетение фибринолитической активности крови. Это обеспечивало адекватные условия для репаративных и пластических процессов в тканях удлиняемой конечности. Через 30 дней фиксации показатели свертывающего и антисвертывающего действия, и особенно фибринстабилизирующий фактор в мышечной ткани удлиняемого сегмента приближались к показателям контралатеральной конечности.

Ключевые слова: эксперимент, голень, удлинение, аппарат Илизарова, свертывание крови.

Coagulative and anticoagulative potentials of blood and m. gastrocnemius of lengthened limbs and contralateral ones were studied experimentally at the end of the distraction and fixation periods using 20 adult mongrel dogs, whose legs were lengthened with the Ilizarov fixator. It was established that the effect of thromboplastic factors predominated due to high activity and stability to dilution. There was more antiheparin factor than heparan sulfate (free heparin) in muscular extracts at the end of distraction period, that on the whole contributed to hypercoagulemia maintenance in this experimental period. The extracts of skeletal muscles influenced the suppression of blood fibrinolytic activity considerably during lengthening. This created adequate conditions for reparative and plastic processes in the tissues of the limb being lengthened. The indices of coagulative and anticoagulative effect and particularly fibrin-stabilizing factor in muscular tissue of the segment lengthened approached the indices of contralateral limb 30 days after fixation.

Keywords: experiment, leg, lengthening, the Ilizarov fixator, blood coagulation.

Известно, что в норме тканевая система свертывания крови регулирует отложение фибрина при регенеративных процессах. Вместе с тем ткани и органы являются главными эффекторами в регуляции гомеостаза в системе гемокоагуляции, обеспечивая продукцию, разрушение и экскрецию компонентов данной системы [11]. Все исследованные ткани человека и животных содержат тромбозиназу и необходимые для ее активации факторы. Так, при повреждении тканевая протромбозиназа, в отличие от кровяной, активируется за доли секунд и поступает в кровяное русло, что является одной из основных причин относительно длительной гиперкоагуляции в послеоперационном периоде [5].

В проведенных нами исследованиях [9] было выявлено, что при удлинении сегмента конеч-

ности изменялись тромбопластическая и фибринолитическая активность крови как в оперированной, так и в неоперированной конечностях. Это могло быть одной из неспецифических реакций ограничения агрессии повышения порогового коагулологического потенциала в оперированной конечности. Поэтому гиперкоагуляция и торможение фибринолиза крови являлись отражением изменений в тканевой системе гемокоагуляции. Более того, гемокоагулирующие свойства тканей позволяют даже априорно предвидеть те нарушения свертывания крови, которые могут возникнуть при проникновении тканевой жидкости в сосудистое русло.

Целью настоящего исследования явилось изучение роли тканевых факторов свертывания крови в икроножной мышце при удлинении голени у собак.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 20 взрослых беспородных собаках, у которых удлиняли голень аппаратом Илизарова после закрытой флекссионной остеоклазии в средней трети диафиза большеберцовой кости. Дистракцию осуществляли по 1 мм за 4 приема в день в течение 28 суток, период фиксации продолжался 30 дней. Исследовали свертывающий и антисвертывающий потенциал крови и икроножных мышц удлиняемой и контралатеральной конечностей в конце периодов дистракции и фиксации.

Мышечные экстракты готовили следующим образом: кусочки тканей тщательно отмывали от крови физиологическим раствором, высуши-

вали фильтровальной бумагой и взвешивали. После этого 1 г ткани заливали 9 мл физиологического раствора и измельчали в ступке. Экстракты центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут. Для эксперимента использовали надсадочную жидкость, другие же компоненты смеси реактивов оставались теми же, что и в контроле [11].

Свертывающую и фибринолитическую активность крови и экстрактов мышц исследовали общепринятыми биохимическими методиками [1]. Исследования обработаны методом вариационной статистики для связанных между собой наблюдений по Ноткину [8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

К концу периода дистракции, после добавления экстрактов икроножных мышц (при их разведении 1:500) в плазму крови интактных животных, удлинялось время рекальцификации в оперированной конечности до  $130 \pm 1$  с, в контралатеральной - равнялось  $114,2 \pm 8,8$  с (контрольное значение 120 с). При использовании более концентрированных разведений экстрактов (1:100, 1:10) был обнаружен дозозависимый эффект действия - ткань мышц еще больше замедляла время рекальцификации во всех пробах. Тормозящее действие этой ткани обуславливалось содержанием в ней антикоагулянтов. В частности, в мышцах обнаруживался гепарин, очевидно, в виде гепарансульфата, как структурного элемента соединительной ткани, о чем свидетельствовали следующие данные. Тромбиновое время гомогенатов мышц в разведении 1:500 соответствовало  $21 \pm 0,6$  с в контралатеральной конечности и  $21 \pm 0,8$  - в оперированной. После замены в реагирующей смеси физиологического раствора толуидиновым синим, оно сокращалось до  $3,6 \pm 0,68$  и  $2,4 \pm 0,75$  с

( $p < 0,05$ ) соответственно, составляя 82% и 55% от контрольного значения (показатель свободного гепарина). Это указывало на проявление антигепариновой активности, поскольку известно, что гепарин в основном нейтрализуется тромбином. Время рекальцификации гепаринизированной плазмы (толерантность к гепарину) значительно сокращалось при добавлении концентрированного экстракта тканей обеих конечностей, взятых на сроке 28 дней дистракции от  $416 \pm 39$  с до  $191,4 \pm 28$  с в контралатеральной и до  $221 \pm 28,2$  с - в удлиняемой конечности ( $p < 0,01$ ). Сокращение времени потребления протромбина плазмы концентрированными экстрактами мышц с 50 до  $29 \pm 2,6$  с в контрольной конечности и  $28 \pm 3$  с ( $p < 0,01$ ) в опытной свидетельствовало о повышении тромбопластической активности в составе мышечной ткани (табл. 1). При этом необходимо отметить, что разведение экстрактов не оказало значительного влияния на потребление протромбина донорской плазмы.

Таблица 1.

Свертывающая и противосвертывающая активность крови и икроножных мышц при удлинении голени на сроке 28 дней дистракции ( $M \pm m$ )

Показатели	Данные крови животных		Данные донорской плазмы	Разведение					
	оперир.	контрал.		1:500		1:100		1:10	
				оперир.	контрал.	оперир.	контрал.	оперир.	контрал.
Время рекальцификации (с)	$74,6 \pm 12,2$	$94,2 \pm 17,6$	$120 \pm 0$	$130 \pm 1$	$114,2 \pm 8,8$	$153 \pm 1$	$136 \pm 0,9$	$163 \pm 2$	$154 \pm 1$
Потребление протромбина (с)	$30,2 \pm 8,8$	$23,6 \pm 1,5$	$50 \pm 0$	$28 \pm 3$	$29 \pm 3$	$32 \pm 3$	$28 \pm 2,5$	$31 \pm 3$	$29 \pm 2,6$
Толерантность к гепарину (с)	$207,6 \pm 29$	$201,8 \pm 37$	$416 \pm 39$	$221 \pm 28$	$295 \pm 20$	$270 \pm 18$	$230 \pm 29$	$313 \pm 9$	$191,4 \pm 28$
Тромбиновое время (с)	$18 \pm 1,5$	$19,8 \pm 1,7$	$21 \pm 0,3$	$21 \pm 0,8$	$21 \pm 0,6$	$19 \pm 0,6$	$20 \pm 0,4$	$19 \pm 0,6$	$18 \pm 0,6$
Время свободного гепарина (с)	$3,4 \pm 1$	$3,8 \pm 0,97$	$4 \pm 0,3$	$2 \pm 0,8$	$3,6 \pm 0,68$	$2,6 \pm 0,7$	$1,4 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$	$1 \pm 0$
Фибриназа (с)	$40,8 \pm 9,7$	$40,8 \pm 11$	$27 \pm 0,7$	$37 \pm 3$	$40 \pm 3$	40	$40 \pm 0,5$	$39,6 \pm 6,1$	$42 \pm 3,6$
Фибринолитическая активность (с)			$90 \pm 0$	$67 \pm 2$	$116 \pm 1$	$69 \pm 5,4$	$91 \pm 4$	$106 \pm 3$	$76 \pm 3,6$

Из представленной таблицы 1 видно, что добавление в пробу экстракта икроножных мышц обеих конечностей существенно замедляло время лизиса сгустка, в котором фибрин находился в легкорастворимой форме. Тканевая фибриназа (XIII фактор крови), играющая важную роль в образовании трудно лизируемого фибрина и сохранении тромба в поврежденных сосудах, в концентрированных экстрактах контралатеральной конечности была выше, чем в оперированной, – на 11% и составляла 148% от контроля. Фибринолитическая активность в мышцах была так же несколько выше и так же мало зависела от степени разведения. Экстракты скелетных мышц заметно тормозили фибринолиз, что свидетельствовало о наличии в них ингибиторов фибринолиза, последние превалировали над активаторами и определяли антифибринолитическое действие экстрактов.

Через 30 дней фиксации, при разведении экстрактов мышц 1:500, показатели свертывающего и антисвертывающего действия, и особенно фибринстабилизирующий фактор в мышечной ткани удлиняемого сегмента, приближались к показателям контралатеральной конечности (табл. 2).

При исследовании венозной крови у данных животных было установлено, что после операции и последующей distraction в крови наблюдались гиперкоагуляция и торможение фибринолиза. Очевидно, одной из причин повышения свертываемости крови после операции являлось поступление тканевых факторов гемокоагуляции в кровь из операционной раны. Дальнейшее сохранение в крови гиперкоагуляции осуществлялось за счет увеличения содержания в исследуемых мышцах прокоагулянтов и ингибиторов фибринолиза. Последние сохранялись в мышечной ткани до конца периодов distraction и фиксации, и обнаруживались при разведении от 1:10 до 1:500.

Угнетение фибринолиза обуславливалось конкурентными взаимоотношениями между тканевыми тромбопластическими и фибринолитическими соединениями. Вследствие большой

активности и устойчивости к разведению доминировало действие тромбопластических факторов. В конце периода distraction в мышечных экстрактах содержалось больше антигепаринового фактора, чем гепарансульфата, о чем свидетельствовало укорочение тромбинового времени, что в целом способствовало поддержанию гиперкоагуляции в этот период эксперимента.

Полученные нами результаты согласуются с данными ряда авторов [4, 10], которыми установлено, что при разных стрессорных состояниях организма ткань скелетных мышц обладает высокой антигепариновой активностью.

Изменения, происходящие в крови и тканях, мы связываем с воздействием пролонгированного стресса на организм – удлинения конечности. Растяжение тканей при distraction сопровождалось изменениями в гемодинамике [2], морфологии мышц [6] и, по-видимому, в симпатической иннервации кровеносного русла, поскольку при длительном раздражении включалось его гуморальное звено [3, 7]. Все это создавало предпосылки для нарушения динамического равновесия между свертывающей и противосвертывающей системами.

При изучении влияния экстрактов мышц на III - фазу процесса свертывания крови мы убедились в том, что в них содержался XIII - фибринстабилизирующий фактор и концентрация его была выше, чем в крови, что способствовало повышению ее свертывающему потенциалу [10, 12].

Таким образом, экстракты скелетных мышц при удлинении конечности существенно влияли на угнетение фибринолитической активности крови. Это обеспечивало адекватные условия для репаративных и пластических процессов в тканях удлиняемой конечности. В обратном случае высокая фибринолитическая активность приводила бы к быстрому лизированию фибрина и, как следствие, угнетению репаративных процессов.

Таблица 2.

Свертывающая и противосвертывающая активность крови и икроножных мышц при удлинении голени, через месяц фиксации (M±m)

Показатели	Данные крови животных		Данные донорской плазмы	Разведение					
	оперир.	контрал.		1:500		1:100		1:10	
				оперир.	контрал.	оперир.	контрал.	оперир.	контрал.
Время рекальцификации (с)	62,6±10	72±7,8	105±2	122±2	119±0,6	141±17	129±6	169±4	162±4
Потребление протромбина (с)	28,8±7,2	25,2±4,4	34±0,5	22±0,9	21±0,4	20±0,4	21±0,8	19±0,3	28±0,6
Толерантность к гепарину (с)	284,2±14,7	292±13,6	308±5	209±17,5	182±7,8	180,4±5,7	211±11,8	180±4,8	195±16
Тромбиновое время (с)	21±2,6	22,6±3,9	20±0,3	17±0,6	20±0	20±0,4	20±0,4	18±0,4	18±0,6
Время свободного гепарина (с)	4,8±1,2	6,4±1,57	5±0,3	2±0,48	4±0,7	2,6±0,5	1,5±0,29	2,2±0,73	1,25±0,25
Фибриназа (с)	74±5,2	47±3,2	28±0,7	34,4±3,4	34,4±1,7	28,2±1,4	35,4±2,1	52±1	37±2,7
Фибринолитическая активность (с)			100±0	73±1	62±0,9	85±1	81±1	105±4	85±1

ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда В.П. и др. Лабораторные методы исследования гемостаза / В.П. Балуда, З.С. Баркаган, Е.Д. Гольдберг. – Томск, 1980. – 312 с.
2. Гордиевских Н.И. Состояние кровообращения удлиняемой по Илизарову конечности в условиях разной дробности distraction: Автореф. дис... канд. биол. наук. - Пермь, 1994. – 22 с.
3. Джавадян Н.С. Изменения отдельных компонентов свертывания крови при болевых раздражениях: Автореф. дис... д-ра мед. наук. - М., 1947. – 42 с.
4. Казначеев В.П. Роль и значение гепарина в проницаемости капиллярно-соединительнотканых структур. Сообщение 11 // Вопросы теорет. и клин. медицины. - Новосибирск, 1959. - С. 120.
5. Кузник Б.И. О роли сосудистой стенки в процессе гемостаза // Успехи современной биологии. - 1973. - Т. 75, № 1. - С. 61-85.
6. Илизаров Г.А., Наумов А.Д., Чикорина Н.К. Влияние дозированного растяжения аппаратом Илизарова на структурно-функциональное состояние скелетных мышц в эксперименте // Метод Илизарова: Теория, эксперимент, клиника: Тез. докл. Всесоюз. конф., посвящ. 70-летию Г.А. Илизарова. - Курган, 1991. - С. 290-293.
7. Маркосян А.А. Нервная регуляция свертывания крови. – М.: Изд-во АПН, 1960. – 376 с.
8. Ноткин Е.Л. Руководство по военно-медицинской статистике. - М., 1956.
9. Сбродова Л.И., Ерофеев С.А. Свертывающая и фибринолитическая активность крови при удлинении голени (экспериментальное исследование) // Гений ортопедии. – 1999. - № 2. - С. 38-42.
10. Скипетров В.П. Тканевая система свертывания крови и тромбгеморрагический синдром в хирургии. – Саранск, 1978. – 62 с.
11. Скипетров В.П., Герасименко Л.Г., Усикова Т.А. Фибринстабилизирующие свойства тканей // Проблемы гематологии и переливания крови. - 1968. – Т. XIII, № 6. – С. 24-27.
12. Astrup T., Permin P.M. Fibrinolysis in the animal organism // Nature. – 1947. - N 4096. - P. 681.

Рукопись поступила 20.11.01.