

УДК 612.11/12

## ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ПРИ ЛАКТАТ-АЦИДОЗЕ

Альфонсова Е.В.

ФБГОУ ВПО «Забайкальский государственный университет»,  
Чита, e-mail: elena-alfonsova@yandex.ru

В работе представлены экспериментальные данные о влиянии различных концентраций молочной кислоты на показатели гемокоагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Молочная кислота в опытах *in vitro* оказывает двухфазное влияние на процессы свертывания крови в зависимости от применяемой дозы: малые концентрации (2,4–5,9 ммоль/л) укорачивают, большие (7,8–16,6 ммоль/л) удлиняют фибринообразование. В опытах *in vivo* наибольшая активация процессов свертывания крови наблюдается при сдвиге pH крови до 7,2–7,1. Гиперкоагуляция, возникающая при сдвиге pH в кислую сторону, связана с рядом факторов: инактивацией антитромбинов, выходом прокоагулянтов из эритроцитов и тромбоцитов, спонтанной агрегацией и нарушением процессов дезагрегации кровяных пластинок, падением электрокинетического потенциала тромбоцитов и более быстрой полимеризацией фибрина.

**Ключевые слова:** лактат-ацидоз, pH, гемостаз, агрегация тромбоцитов, дзета-потенциал тромбоцитов, фибринолиз

## VARIATION OF THE SOME PARAMETERS OF HEMOSTATIC SYSTEM AT THE LACTAT ACIDOSIS

Alfonsova E.V.

Zabaikalsky State University, Chita, e-mail: elena-alfonsova@yandex.ru

The article is devoted to the investigation of effect of different concentrations of lactic acid on the performance hemocoagulation and vascular-platelet hemostasis. Lactic acid *in vitro* experiments has a biphasic effect on blood coagulation, depending on the dose: low concentrations (2,4–5,9 mmol/l) shortened, large (7,8–16,6 mmol/L) prolongs the formation of fibrin. The highest activation of blood coagulation *in vivo* is observed at pH 7,2–7,1. Hypercoagulation, occurred when the pH shift in the acid side, connected with a number of factors: the inactivation of antithrombin, exit procoagulant of red cells and platelets, a violation of the processes of disaggregation of platelets, drop in the  $\xi$ -potential of platelets, a rapid polymerization of fibrin.

**Keywords:** lactat-acidosis, pH, hemostasis, aggregation of thrombocytes,  $\xi$ -potential of platelets, fibrinolysis

Проблема тромбозов в артериях, венах, микроциркуляторном русле является одной из самых актуальных в современной медицине. Артериальные тромбозы в коронарных сосудах являются основной причиной инфаркта миокарда, они же вызывают почти 90% нарушений мозгового кровообращения. Окклюзия микроциркуляторного русла в виде различных вариантов внутрисосудистого микросвертывания крови не имеет точной статистической оценки, хотя встречается при многих заболеваниях, сопровождающихся гипертонией, интоксикацией, сепсисом, нарушениями иммунитета и др. [2, 3].

Важную роль в развитии диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови играют продукты анаэробного метаболизма, вызывающие ацидоз. Они представляют реальную опасность для организма, так как способны не только нарушать функции, но и приводить к морфологическим изменениям в различных органах и тканях [1, 3, 6]. Накопление молочной кислоты, известной в качестве крупного донора протонов, изменяет гемостатические и реологические свойства крови, усиливает гипоксию тканей и уменьшает функцию энергообразования клеток вследствие разобщения гликолиза и цикла Кребса, снижа-

ет ресинтез АТФ и ведет к увеличению энтропии в организме [6, 7]. Влияние ацидоза на показатели гемостаза изучалось многими исследователями [1–3]. Благодаря этому были выявлены основные закономерности изменения функции тромбоцитов, свертывания крови, фибринолиза, антикоагулянтной активности, развития диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС) и тромбогеморрагического (ТГС) синдромов при ацидотических состояниях. Однако некоторые механизмы остаются неясными. Наши исследования посвящены изучению влияния различных сдвигов pH на свертывание крови, фибринолиз, агрегацию и дзета-потенциал тромбоцитов.

### Методы и организация исследования

Для исследования роли метаболических факторов в механизмах свертывания крови и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза были проведены исследования *in vitro*. На 20 собаках весом от 15 до 25 кг, использованных в качестве доноров, изучали действие различных концентраций молочной кислоты, приготовленных на физ.растворе, на свертывание крови, фибринолиз, показатели сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. В экспериментах применялись различные концентрации лактата (от 2,5 до 17 ммоль/л). Пробы крови брали в силиконированные пробирки, содержащие 3,8% цитрат натрия, так, чтобы конечное соот-

ношение цитрата и крови составляло 1 к 9. Для получения плазмы кровь центрифугировали в течение 10 минут при 1500 об/мин, а плазму, богатую тромбоцитами, для изучения дзета-потенциала и агрегации – при 1000 об/мин. Определение электрокинетической подвижности тромбоцитов проводили в камере Н.А. Абрамсон (1928) модификации В.В. Альфонсова (1977). Показатели КЩР определяли микрометодом Аструпа «Микро-Аstrup». В опытах *in vivo* лактат-ацидоз создавали введением 3% раствора молочной кислоты в изотоническом растворе NaCl в бедренную вену под гексеналовым наркозом. Различный сдвиг pH в кислую сторону достигали дозированным капельным введением лактата от 20 до 38 капель в мин. под контролем pH. Для определения показателей системы гемостаза пробы крови забирали до и после введения лактата из бедренной артерии. В работе с экспериментальными животными были соблюдены требования, изложенные в «Методических рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» от 1985 г. Статистическая обработка материала проводилась на ПЭВМ Pentium 5 с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007 для операционной системы Windows 7. Достоверность различий показателей в группах оценивали по величине *t*-критерия Стьюдента

**Результаты исследования и их обсуждение**

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что молочная кислота в опытах *in vitro* оказывает выраженное влияние на систему свертывания крови. Сдвиг pH в кислую сторону как в плазме, так и в цельной крови приводит к двухфазным изменениям гемокоагуляции. По мере подкисления плазмы от 7,4 до 7,22–7,10 скорость образования фибринового сгустка увеличивается, дальнейший сдвиг реакции среды в кислую сторону приводит

к замедлению свертываемости крови и при pH 6,0 сгусток не образуется. Активность факторов, входящих в протромбиновый комплекс, наиболее устойчива к сдвигу pH в кислую сторону, VII фактор проявляет оптимальную активность при pH 7,40–7,22, дальнейшее подкисление среды приводит к быстрой его инактивации. Тромбиновое время в присутствии различных концентраций молочной кислоты также претерпевает двухфазные изменения. В малых дозах (до 5,95 ммоль/л) лактат укорачивает время перехода фибриногена в фибрин за счет связывания естественных антикоагулянтов, в больших (16,6 ммоль/л) – блокирует формирование фибрина в связи с нарушениями полимеризации фибрин – мономера (табл. 1).

Внутривенное введение 3%-го раствора лактата приводит к выраженному ацидозу (pH – 7,10), падению щелочного резерва и уровня кислорода в крови. На фоне изменения внутренней среды организма происходит резкая активация процессов свертываемости крови – время рекальцификации укорачивается почти вдвое. Протромбиновое время обычной плазмы и плазмы с низким содержанием V и VII факторов практически не изменяется, активность антигемофильного глобулина возрастает. Ацидоз сопровождается устойчивым падением уровня фибриногена. В то же время время лизиса эуглобулинов в течение опыта остается замедленным. Снижение концентрации фибриногена и появление в крови фибриногена В заставляет предположить, что введение больших доз лактата сопровождается внутрисосудистым свертыванием крови (табл. 2).

**Таблица 1**

Влияние различных концентраций молочной кислоты на свертывание плазмы и фибринолиз в опытах *in vitro* (M ± m)

Исследуемые показатели <i>n</i> = 8	Контроль	Концентрация лактата в плазме в ммоль/л				
		2,5	4,0	5,95	7,77	16,6
Время рекальцификации	130,0 ± 3,5	127 ± 3,2	120 ± 3,6*	124 ± 4,8	154 ± 10,0*	Нет сгустка
Протромбиновое время	14, ± 0,9	14 ± 0,95	14 ± 0,90	15 ± 1,05	17 ± 1,5	28 ± 5,0*
Фактор VII	30,0 ± 1,5	30 ± 1,8	30 ± 1,9	37 ± 2,5*	48 ± 3,1**	Нет сгустка
Тромбиновое время	19 ± 1,2	15 ± 0,8**	13 ± 0,72***	13 ± 0,82***	14 ± 1,0**	30 ± 3,1*
Тромбиновое время гепаринизированной плазмы	98 ± 16	26 ± 16**	18 ± 12***	15 ± 13***	15 ± 13**	28 ± 22*
Фибринолиз	38 ± 1,8	41 ± 2,0	43 ± 2,0*	47 ± 1,8**	52 ± 2,1***	78 ± 4,5***
pH	7,55 ± 0,05	7,35 ± 0,08**	7,22 ± 0,10**	7,10 ± 0,15**	6,85 ± 0,20**	6,0 ± 0,31***

Примечание: \* – *p* < 0,05, \*\* – *p* < 0,01, \*\*\*- *p* < 0,001 – различия достоверны между контролем и опытом.

Таблица 2

Влияние внутривенного введения 4% раствора молочной кислоты на свертывание, фибринолиз и некоторые физико-химические показатели крови ( $M \pm m$ )

Исследуемые показатели $n = 8$	До инъекции	На фоне инъекции	После инъекции	
			Через 10 мин	Через 60 мин
pH пробы	$7,35 \pm 0,043$	$7,07 \pm 0,02^{***}$	$7,23 \pm 0,03^{***}$	$7,29 \pm 0,02$
Время рекальцификации (с)	$121 \pm 5,2$	$65 \pm 4,1^{***}$	$82 \pm 7,0^{**}$	$120 \pm 6,0$
Фактор V (с)	$19 \pm 0,85$	$20 \pm 0,9$	$22 \pm 1,2$	$23 \pm 2,0$
Фактор VII (с)	$57 \pm 2,6$	$54 \pm 3,0$	$65 \pm 3,0^*$	$68 \pm 3,5^*$
Фактор VIII (с)	$17 \pm 1,5$	$11 \pm 1,5^*$	$16 \pm 2,0$	$17 \pm 2,1$
Фактор X (с)	$22 \pm 1,8$	$22 \pm 1,6$	$22 \pm 2,0$	$23 \pm 1,8$
Протромбиновое время (с)	$15 \pm 0,85$	$14 \pm 0,76$	$14 \pm 0,95$	$14 \pm 1,3$
Тромбиновое время (с)	$36 \pm 1,5$	$39 \pm 0,9^*$	$43 \pm 0,1^{***}$	$45 \pm 0,7^{***}$
Фибриноген (мг%)	$395 \pm 17,8$	$346 \pm 18^*$	$364 \pm 26,7$	$370 \pm 28,9$
Фибриноген В	–	+++	+++	+++
Эуглобулиновый фибринолиз (мин)	$49 \pm 2,2$	$51 \pm 3,4$	$54 \pm 3,1$	$58 \pm 3,1^*$
Лактат (ммоль/л)	$0,70 \pm 0,034$	$1,49 \pm 0,11^{***}$	$1,02 \pm 0,08^*$	$0,74 \pm 0,07^*$
Щелочной резерв (Мэкв/л)	$110 \pm 4,2$	$90 \pm 5,0^*$	$95 \pm 5,5$	$105 \pm 2,1$
Кислород (об%)	$17 \pm 1,0$	$14 \pm 1,2^*$	$14 \pm 1,2$	$16 \pm 1,1$

Примечание: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  – различия достоверны между контролем и опытом.

В следующей серии опытов изучали агрегацию тромбоцитов при различных сдвигах pH (7,50; 7,4; 7,34; 7,2; 7,18; 6,92; 6,8; 6,50; 6,11). Анализ кривых агрегации в контрольных наблюдениях показывает, что тромбоци-

ты без добавления агрегирующего агента не склеиваются. Кривые агрегации, записанные при pH 7,4–7,5, характеризуют нормальную реакцию тромбоцитов на дозу АДФ, равную 0,0005 мк/мл плазмы (рис. 1).

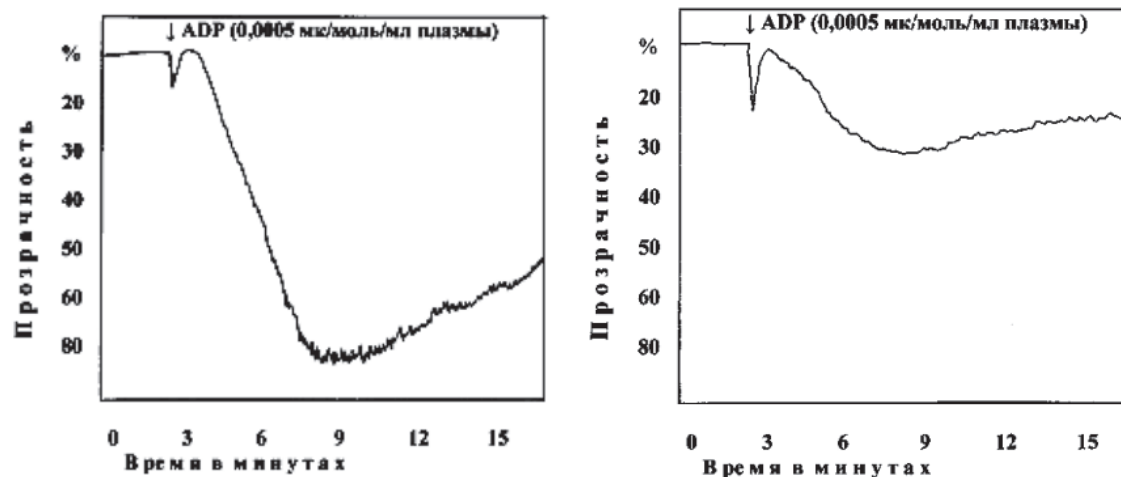


Рис. 1. Варианты кривых агрегации тромбоцитов под влиянием АДФ (контроль)

Замена в изучаемых пробах физиологического раствора на различные концентрации молочной кислоты приводила к изменению характера агрегации тромбоцитов (рис. 2). При уменьшении pH до 7,34 в отдельных случаях появлялась спонтанная агрегация тромбоцитов, которая составляла по средним данным 2,5°, при этом время начала агрегации после внесения АДФ увеличивается не достоверно. Угол агрега-

ции снижался до 59,0°. Процесс становился более растянутым, он удлинялся до 369 с, однако ввиду большой вариабильности результатов эти изменения не достоверны. Амплитуда агрегации пластинок уменьшалась, величина агрегатов оставалась практически неизменной. Сдвиг реакции среды в кислую сторону приводит также к снижению интенсивности дезагрегации. Более выраженные изменения агрегации

наблюдались, если рН пробы равнялся 7,2. При такой концентрации водородных ионов во всех опытах обнаружена спонтанная агрегация тромбоцитов. Внесение в кювету калориметра агрегирующего агента усиливало склеивание кровяных пластинок, однако средняя величина угла агрегации падала до 42°, процесс агрегации становился бесконечным и через 900 с плотность плазмы достигала 33,5%. Величина агрегатов при рН 7,13 оставалась такой же, как в контроле, дезагрегация отсутствовала во всех экспериментах. Дальнейшее подкисление среды приводило к более выраженным изменениям агрегации, основной осо-

бенностью которых являлось увеличение угла спонтанной агрегации в присутствии лактата и блокирование специфического действия АДФ. При рН 6,92 угол спонтанной агрегации тромбоцитов возрастал до 11,3° ( $p < 0,2$ ), при 6,50 до 16° ( $p < 0,05$ ), при 6,11 до 21,8° ( $p < 0,05$ ). Угол наклона агрегации под влиянием АДФ в пробе с рН 6,92 несколько увеличивался, при рН 6,5 и 6,11 внесение АДФ уже не приводило к дальнейшему изменению угла агрегации. «Спонтанное» склеивание кровяных пластинок в кислой среде всегда было необратимым, амплитуда агрегации со временем увеличивалась.

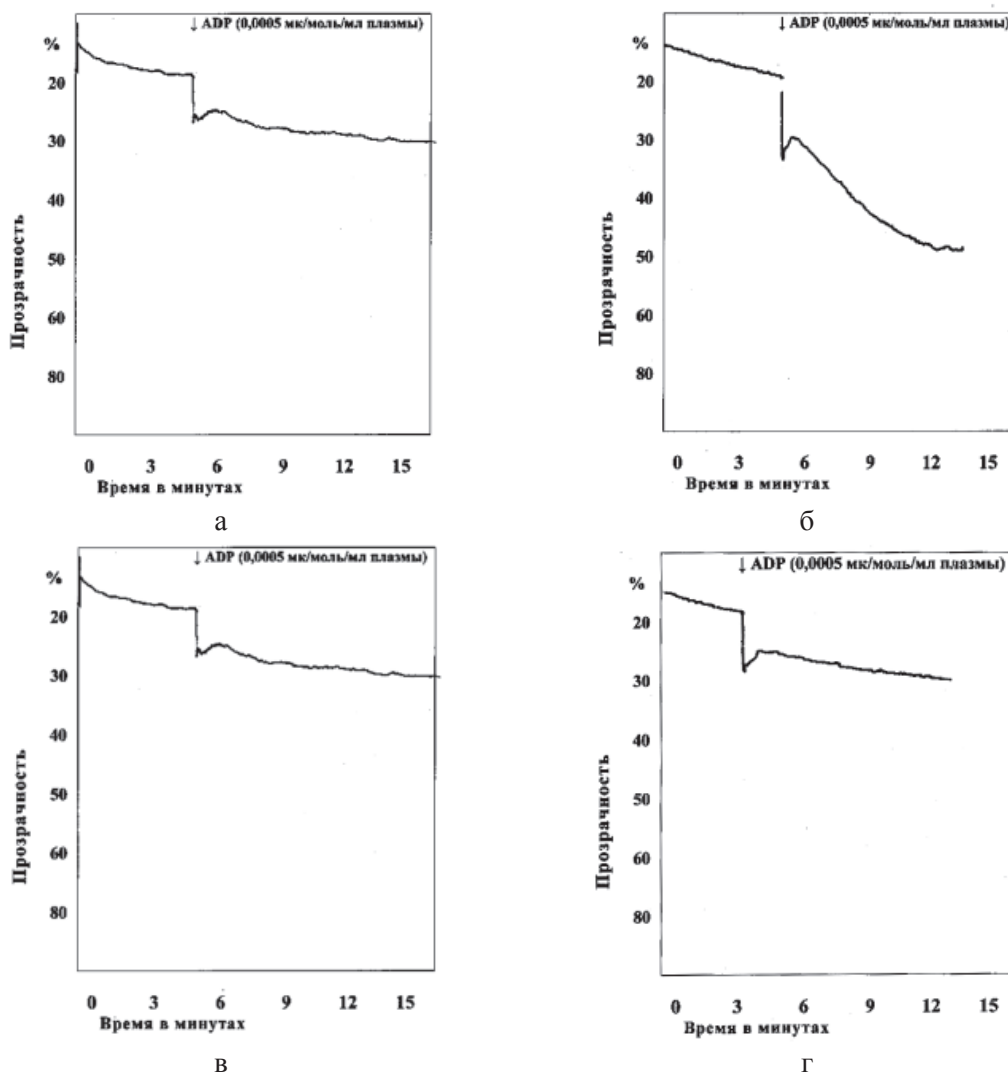


Рис. 2. Агрегация тромбоцитов под влиянием различных концентраций молочной кислоты: а – кривая агрегации тромбоцитов при рН крови 7,0; б – кривая агрегации тромбоцитов при рН крови 7,2; в – кривая агрегации тромбоцитов при рН крови 6,9; г – кривая агрегации тромбоцитов при рН крови 6,42

Таким образом, тромбоциты при сдвиге в кислую сторону или ацидозе способны повышению гемокоагуляционных

свойств крови и приобретают способность к спонтанной агрегации. Интересно проследить, как изменяется электрокинетиче-

ский потенциал кровяных пластинок при ацидозе, вызываемом внутривенной инъекцией молочной кислоты.

В следующей серии наблюдений было выявлено, как влияют сдвиги рН в кислую сторону при внутривенном введении 3% молочной кислоты из расчета 10 мл/кг веса (опыты на 8 собаках) на электрокинетический потенциал тромбоцитов (табл. 3).

**Таблица 3**  
Влияние инъекции 4% раствора молочной кислоты на дзета-потенциал тромбоцитов ( $M \pm m$ )

До инъекции $n = 8$	На фоне инъекции $n = 8$	Через 10 мин после инъекции $n = 8$
14,958 +	13,940 $\pm$ 0,16 $p < 0,05$	14,825 $\pm$ 0,13 $p < 0,05$

**Примечание:**  $p$  – достоверность различий между контролем и опытом,  $n$  – количество исследований.

До инъекции молочной кислоты дзета-потенциал тромбоцитов, полученных из крови бедренной артерии, равнялся 14,958 мВ. На фоне введения лактата электрокинетический заряд кровяных пластинок падал до 13,940 мВ или на 6,9% ( $P < 0,05$ ). Одновременно в системном кровотоке наблюдалось увеличение концентрации молочной кислоты с 11 до 26 об% ( $P < 0,002$ ), снижение рН с 7,30 до 7,07 ( $P < 0,001$ ), щелочного резерва со 110 до 90 м-экв/л ( $P < 0,05$ ) и уровня кислорода с 17 до 14 об% ( $P < 0,05$ ). На 10-й минуте после введения кислоты метаболические показатели частично восстанавливались, наряду с этим имело место и увеличение дзета-потенциала тромбоцитов. Из приведенных данных видно, что метаболические сдвиги, возникающие в организме в ответ на появление в кровеносном русле лактата, сопровождается снижением электрокинетического потенциала тромбоцитов. Снижение заряда кровяных пластинок создает благоприятные условия для их взаимного склеивания и нарушения движения крови по микроциркуляторному руслу. Ацидоз, вероятно, приводит к снижению не только электрокинетического потенциала форменных элементов крови, но и сосудистой стенки, что должно сопровождаться адгезией пластинок к поверхности эндотелия. В связи с этим можно наблюдать два одновременно протекающих процесса: с одной стороны – нарушение микроциркуляции тромбоцитарными агрегатами, и с другой – снижение числа тромбоцитов за счет прилипания их к измененной внутренней поверхности крупных сосудов.

Таким образом, гиперкоагуляция, возникающая при сдвигах рН крови в кислую сторону, сопровождается увеличением активности плазменных факторов, более быстрой полимеризацией фибрина, спонтанной агрегацией, нарушением процессов дезагрегации и понижением электрокинетического потенциала тромбоцитов.

*Работа выполнена в рамках Государственного задания по вузу Минобрнауки РФ, № 4.3604.2011.*

#### Список литературы

1. Альфонсов В.В., Альфонсова Е.В. Гемостаз, морфологический эквивалент ДВС-синдрома и нарушение структурной организации сердца при метаболическом ацидозе // Вестник Иркутского РО АН ВШ России. – 2001. – № 1. – С. 156–164.
2. Баркаган З.С., Момот А.П. Современные аспекты патогенеза, диагностики и терапии ДВС-синдрома // Вестник гематологии. – 2005. – № 2. – С. 5–14.
3. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии: монография. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 832 с.
4. Тверской А.Л. Лактат-ацидоз // МРЖ. Анестезиология и реаниматология. – 1981. – № 3. – С. 50–57.
5. Brus F., van Oeveren W., Okken A., Oetomo S.B. Number and activation of circulating polymorphonuclear leukocytes and platelets are associated with neonatal respiratory distress syndrome severity // Pediatrics. – 1997. – Vol. 99, № 5. – P. 672–680.
6. De Backer D. Lactic acidosis // Intensive Care Med. – 2003. – Vol. 29. – P. 699–702.

#### References

1. Al'fonsov V.V., Al'fonsova E.V. Gemostaz, morfologicheskij jekvivalent DVS-sindroma i narushenie strukturnoj organizacii serdca pri metabolicheskom acidoze // Vestnik Irkutskogo RO AN VSh Rossii. 2001. no. 1. pp. 156–164.
2. Barkagan Z.S., Momot A.P. Sovremennye aspekty patogeneza, diagnostiki i terapii DVS-sindroma // Vestnik gematologii. 2005. no. 2. pp. 5–14.
3. Kuznik B.I. Kletochnye i molekulyarnye mehanizmy reguljacii sistemy gemostaza v norme i patologii: monografija / B.I. Kuznik. Chita : Jekspress-izdatel'stvo, 2010. 832 p.
4. Tverskoj A.L. Laktat-acidoz // MRZh. Anesteziologija i reanimatologija. 1981. no. 3. pp. 50–57.
5. Brus F., van Oeveren W., Okken A., Oetomo S.B. Number and activation of circulating polymorphonuclear leukocytes and platelets are associated with neonatal respiratory distress syndrome severity // Pediatrics. 1997. Vol. 99, no. 5. pp. 672–680.
6. De Backer D. Lactic acidosis // Intensive Care Med. 2003. Vol. 29. pp. 699–702.

#### Рецензенты:

Степанов А.В., д.м.н., зав. кафедрой безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф Читинской государственной медицинской академии, г. Чита;

Авсеенко Н.Д., д.м.н., профессор кафедры безопасности жизнедеятельности и защиты окружающей среды Забайкальского института железнодорожного транспорта (ИрГУПС), г. Чита.

Работа поступила в редакцию 07.05.2013