

УДК 612.1:612.223.11:612.273.2:615.272

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ У КРЫС ПРИ ГИПЕРКАПНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ ПОСЛЕ КУРСОВОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕКСИДОЛА

¹Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул²НИИ физиологии и фундаментальной медицины, г. НовосибирскМоскаленко С.В.^{1,2}, Шахматов И.И.^{1,2}, Бондарчук Ю.А.^{1,2}, Улитина О.М.^{1,2}, Алексеева О.В.^{1,2}

Целью работы являлось изучение реакции системы гемостаза на однократное воздействие гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности у крыс и возможность коррекции гемостазиологических нарушений с помощью предварительного курсового применения антигипоксанта – мексидола.

Материалы и методы. В данном исследовании были использованы половозрелые крысы-самцы (48 особей) линии Wistar средней массой 274,0±32,0 г. Крысы содержали на стандартном рационе, корм и воду подавали 1 раз в сутки между 10 и 11 часами. В вечернее время животные подвергались однократной гиперкапнической гипоксии в специальной проточной камере. Состояние гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности моделировалось при содержании O₂ – 5,0%, CO₂ – 5,0% в течение однократного 20-минутного воздействия. В качестве тренировочного режима был использован 30-кратный курс мексидола, препарат крысам вводился внутривентрально в дозе 50 мг/кг за 1,5 часа до воздействия гиперкапнической гипоксии.

Результаты. После однократного воздействия гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности было зарегистрировано укорочение времени начала образования сгустка (СТ), повышение угла α° и максимальной плотности сгустка (МСФ). Также укорачивалось время образования сгустка (СФТ) и увеличивался показатель максимального лизиса сгустка (МЛ). При однократном воздействии гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности после курсового введения мексидола было зарегистрировано укорочение максимальной плотности сгустка (МСФ).

Выводы. Однократное воздействие гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности характеризовалось смещением гемостатического потенциала в сторону гиперкоагуляции на фоне активации фибринолитической системы крови. Курсовое применение антигипоксанта, а именно мексидола, предшествующее гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности, существенно снижает риск тромбообразования.

Ключевые слова: гиперкапническая гипоксия, гемостаз, тромбоэластография, мексидол.

Research objective. To study the reaction of the hemostasis system to the single effect of hypercapnic hypoxia of maximum intensity in rats and the possibility of correction of hemostasiological disorders with the help of preliminary course use of the antihypoxic drug – mexidol.

Materials and methods. In this study, adult male Wistar rats (48 animals) with the average weight of 274.0±32.0 g were used. Rats were kept on a standard diet, food and water were served once a day between 10 and 11 o'clock. In the evening, animals were subjected to a single hypercapnic hypoxia in a special flow chamber. The state of hypercapnic hypoxia of maximum intensity was modeled at the content of O₂ – 5.0%, CO₂ – 5.0% during a single 20-minute exposure. As a training regime, a 30-fold course of mexidol was used, the drug was administered intraperitoneally in rats at a dose of 50 mg/kg 1.5 h before the hypercapnic hypoxia exposure.

Results. After a single hypercapnic hypoxia exposure of maximum intensity, a shortening of the start clotting time (CT), an increase in the angle α° and the maximum clot firmness (MCF) was recorded. The clot formation time (CFT) decreased as well and the maximum clot lysis (ML) increased. With the single hypercapnic hypoxia exposure of maximum intensity, after the course administration of mexidol, a decrease in the maximum clot firmness (MCF) was recorded.

Conclusions. The single effect of hypercapnic hypoxia of maximum intensity was characterized by a shift of hemostatic potential towards hypercoagulation on the background of fibrinolytic blood system activation. Preceding hypercapnic hypoxia of maximum intensity, the course use of the antihypoxic drug, namely mexidol, significantly reduces the thrombotic risk.

Key words: hypercapnic hypoxia, hemostasis, thromboelastography, mexidol.

Острая гиперкапническая гипоксия (ПГ) может возникнуть при нарушении штатной работы системы кислородообеспечения, когда в воздухе герметического объекта содержание кислорода снижается, а концентрация углекис-

лого газа увеличивается. Также ПГ наблюдается при некоторых заболеваниях сердечно-сосудистой, дыхательной систем и системы крови [3].

Установлено, что ПГ вызывает в организме человека и животных сложную интегральную

реакцию, определенная роль в которой принадлежит системе гемостаза [7]. Ранее было выявлено, что различные режимы ГГ приводят к смещению гемостатического баланса в сторону тромбинемии [4]. В то же время, в других исследованиях показано, что ГГ вызывает активацию тромбоцитарного звена, удлинение коагуляционного звена [2] и активацию фибринолитической системы крови [11].

В настоящее время для обеспечения выживаемости человека в условиях острой ГГ используются в основном средства индивидуального жизнеобеспечения [12]. Однако их применение ограничено из-за громоздкости, большой стоимости, сложности эксплуатации и способности ограничивать движения и обзор, а также затруднять прием пищи, воды и т.п. [3, 5]. В то же время, поддержание жизнеспособности в условиях острой гипоксии на достаточно высоком уровне возможно с помощью лекарственных средств, обладающих антигипоксическими свойствами [1].

Дефицит энергии, лежащий в основе любой формы гипоксии, в том числе и при ГГ, приводит к качественно однотипным метаболическим и структурным сдвигам в различных органах и тканях: возникновению ацидоза, активации свободнорадикального окисления, повреждению биологических мембран, затрагивающему как липидный бислой, так и мембранные белки. Среди фармакологических препаратов метаболического типа действия особое место занимает антигипоксант – мексидол [1], представляющий собой сукцинатсодержащее производное 3-оксипиридина (2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат).

Мексидол подавляет агрегацию тромбоцитов, вызываемую коллагеном, тромбином, АДФ и арахидоновой кислотой, ингибирует фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов тромбоцитов, а также защищает клетки крови при механической травме [1]. Установлено, что мексидол обеспечивает подавление агрегации и адгезии тромбоцитов и лейкоцитов, повышает пластичность эритроцитов, улучшает реологические свойства крови, что способствует устранению нормакапнической гипоксии [6].

Показано, что при нормакапнической гипоксии со стороны системы гемостаза мексидол нормализует как сосудисто-тромбоцитарные (что проявляется в сохранности самих кровяных пластинок и их свойств), так и коагуляционные механизмы, а также фибринолитические свойства крови. Это может быть основанием применения препарата при нарушениях гемостаза, вызванных воздействием нормакапнической гипоксии [11].

Стоит отметить, однако, что данные об эффективности применения антигипоксантов при моделировании ГГ в литературе отсутствуют.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось изучение реакции системы гемо-

стаза на однократное воздействие гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности у крыс и возможность коррекции гемостазиологических нарушений с помощью предварительного курсового применения мексидола.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 48 половозрелых крысах-самцах линии Wistar средней массой $259,0 \pm 36,0$ г. Все экспериментальные животные были разделены на 4 группы: две контрольные ($n=12 \times 2$) и две опытные группы ($n=12 \times 2$).

1-я и 2-я опытные группы подвергались однократному воздействию ГГ максимальной интенсивности путем помещения крыс на 20 минут в камеры с газовой средой, содержащей $5,0 \pm 0,5$ % O_2 и $5,0 \pm 0,5$ % CO_2 . Кроме того, 2-й опытной группе животных до экспериментального воздействия предварительно на протяжении 30 дней ежедневно осуществлялось внутрибрюшинное введение мексидола (50 мг/кг).

Режим максимальной интенсивности воздействия гиперкапнической гипоксии был подобран экспериментальным путем, при котором ещё наблюдалась 100% выживаемость животных.

Контрольные группы помещались в ту же камеру на аналогичное по продолжительности время, что и опытные группы, однако в этом случае вместо газовой смеси компрессором нагнетался атмосферный воздух, а вместо мексидола осуществлялось введение 0,9% раствора NaCl по той же схеме.

Для моделирования ГГ использовали специальную проточную камеру, в которую при помощи компрессора подавалась заданная смесь газов со скоростью 15 л/мин. Камера имела выпускное отверстие, соединенное при помощи шланга с емкостью, наполненной водой, что обеспечивало стравливание из камеры повышенного давления газов. Контроль газового состава камеры производили при помощи газоанализатора Microlux O_2+CO_2 (ООО «Микролюкс», Екатеринбург, Россия).

Забор крови у всех групп животных выполняли на фоне наркотизации путем внутрибрюшинного введения раствора золетила в дозе 5 мг/100 г.

Кровь для исследования в объеме 5 мл получали путем забора из печеночного синуса в полистироловый шприц, содержащий 0,11 М (3,8%) раствора натрия цитрата (соотношение крови и цитрата 9:1). До проведения эксперимента на протяжении недельной адаптации к условиям вивария все крысы находились в стандартных условиях содержания согласно требованиям «Надлежащей лабораторной практики» (GLP – от англ. Good Laboratory Practice). Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской

конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте, а также Директивами 86/609/ЕЕС [8]. Обезболивание и умерщвление животных проводили в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных.

В настоящей работе для оценки системы гемостаза использовался интегральный метод исследования – тромбоэластография. Запись тромбоэластограммы с использованием активатора Start-tem проводилась на аппарате RotemGamma (Германия).

В ходе расшифровки тромбоэластограммы учитывались следующие показатели:

Время начала образования сгустка (СТ). Описывает время от начала анализа до распознаваемого начала формирования сгустка посредством добавления активатора (реагенты и кальций). Время начала образования сгустка является важным параметром активизации показателей свертывания, а также их баланса с соответствующими ингибиторами.

Время образования сгустка (CFT). Отображает кинетику образования стойкого сгустка из тромбоцитов и фибрина. Время образования сгустка зависит в основном от количества тромбоцитов и особенно от их участия в формировании сгустка. Кроме того, на время образования сгустка влияет уровень фибриногена и его склонность к полимеризации.

Угол альфа (α°) – угол, построенный по касательной к тромбоэластограмме из точки начала образования сгустка. Отображает скорость роста фибриновой сети и ее структурообразование (увеличение прочности сгустка).

Максимальная плотность сгустка (MCF)

представляет собой максимальную величину амплитуды формирования сгустка, достигнувшую к моменту, когда активируется процесс фибринолиза. Максимальная плотность сгустка является одним из наиболее важных параметров в тромбоэластометрии.

Максимальный лизис (ML) соответствует максимальной интенсивности фибринолиза, обнаруженной в течение анализа, и определяется как нахождение самой низкой амплитуды после достижения MCF.

Все цифровые данные, полученные в ходе исследования, подвергались статистической обработке. Данные исследований представлены в виде m [25% ÷ 75%], где m – медиана в выборочной совокупности, [25% ÷ 75%] – 25-й и 75-й перцентиль. Достоверность различий оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Для обработки и хранения полученного экспериментального материала создавали базы данных с использованием редактора электронных таблиц Microsoft Excel 2010. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли при помощи программ математической статистики Jmp Statistical Discovery v 6.1.2 и Biostat 5.03 на персональном компьютере.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ результатов данных тромбоэластографии, зарегистрированных после однократного воздействия ГГ максимальной интенсивности, без/после предварительного введения мексидола в течение 30 дней приведен в таблице (таблица 1).

Таблица 1

Показатели системы гемостаза, зарегистрированные по завершении однократного воздействия гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности ($O_2 - 5\%$, $CO_2 - 5\%$) без/после предварительного 30-дневного введения мексидола

Методы исследования	ГГ максимальной интенсивности без введения мексидола (n=10)	ГГ максимальной интенсивности по завершении 30-кратного введения мексидола (n=10)
СТ, с	124,0 [116,2÷140,3]*** ($\Delta - 47\%$)	188,7 [179,3÷190,5] ($\Delta + 8\%$)
α°	78,0 [72,3÷84,0]** ($\Delta + 32\%$)	67,2 [64,0÷72,8] ($\Delta + 4\%$)
CFT, с	72,0 [67,4÷76,0]*** ($\Delta - 42\%$)	94,4 [85,5÷96,6] ($\Delta + 1\%$)
MCF, мм	79,0 [70,6÷82,4]*** ($\Delta + 18\%$)	68,0 [65,3÷71,0]** ($\Delta - 11\%$)
ML, %	2,0 [1,8÷2,3]* ($\Delta + 200\%$)	0,0 [0,0÷0,0] ($\Delta 0\%$)

Примечания: данные представлены в виде Me – медиана выборки; [25÷75] – проценты выборки; n – число наблюдений; Δ – статистически значимая конечная разница показателей системы гемостаза опытных животных относительно их величин в контроле (в процентах); статистическая значимость различий с данными контрольной группы обозначена: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; СТ – время коагуляции; α – угловая константа; MCF – максимальная плотность ТЭГ; CFT – время образования сгустка; ML – максимальный лизис.

По данным тромбозаграфии, после **однократного воздействия ГГ максимальной интенсивности** было зарегистрировано укорочение времени начала образования сгустка (СТ) на 47,0% ($p < 0,001$) на фоне повышения угла α° на 32,0% ($p < 0,01$) и максимальной плотности сгустка (МСФ) на 18,0% ($p < 0,001$). Также выражено укорачивалось время образования сгустка (СФТ) на 42,0% ($p < 0,001$). Увеличение функциональной активности фибринолитической системы подтверждалось повышением показателя максимального лизиса (ML) в два раза ($p < 0,05$). Для наглядности полученных данных представлены тромбозаграммы животных из контрольной и опытной групп (рисунок 1 и рисунок 2). В описанных выше экспериментах показано, что однократное воздействие ГГ мак-

симальной интенсивности без предшествующего курсового введения мексидола сопровождается активацией как тромбоцитарного, так и коагуляционного звеньев гемостаза, кроме того, активацией фибринолитической системы крови.

Зафиксированные изменения частично подтверждаются результатами, полученными W.D. Toff (2006), показавшим, что вдыхание гиперкапнической смеси (5,0% CO_2 в воздухе) стимулировало гемокоагуляцию вследствие усиления контактной и фосфолипидной активации пусковых механизмов системы свертывания, повышения тромбопластиновой и тромбиновой активности, снижения антикоагулянтного потенциала и неферментативного фибринолиза [11].

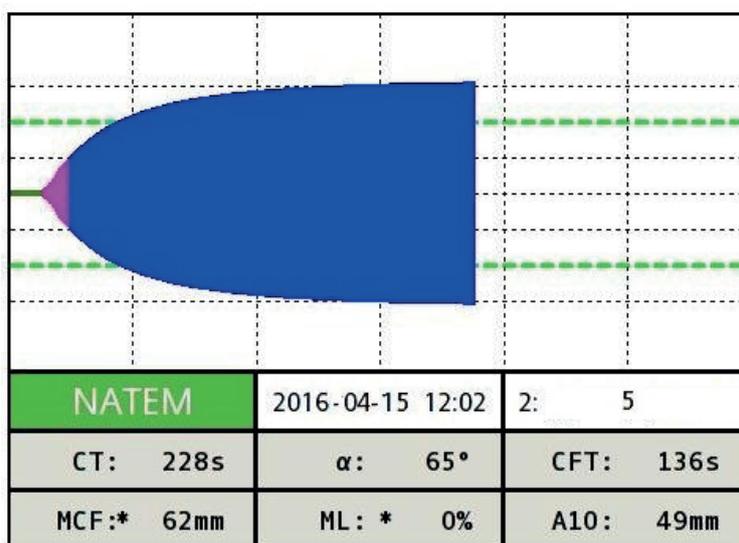


Рисунок 1 – Тромбозаграмма (контрольная группа, животное № 5), зарегистрированная после однократного пребывания в камере в течение 20 минут в условиях обычного атмосферного давления.

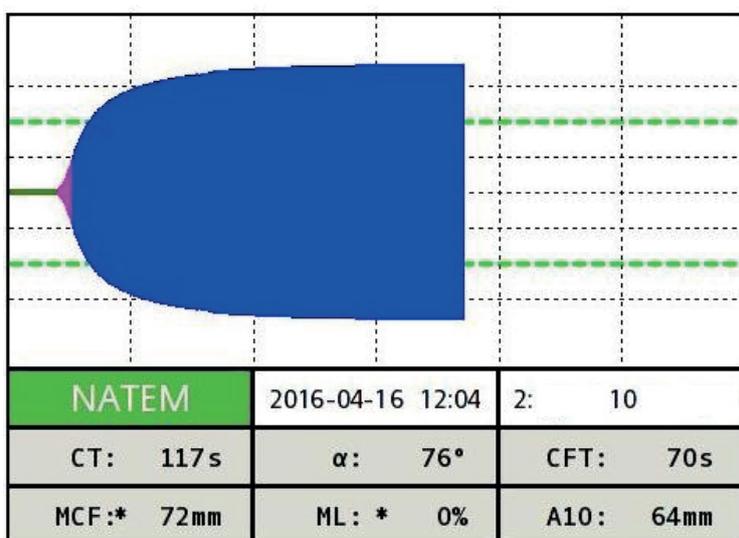


Рисунок 2 – Тромбозаграмма (опытная группа, животное № 1), зарегистрированная сразу после однократного воздействия гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности ($\text{O}_2 - 5\%$; $\text{CO}_2 - 5\%$) в течение 20 минут.

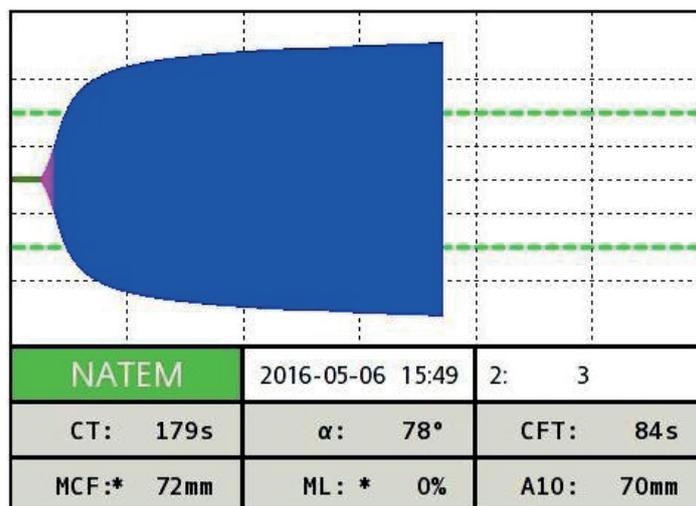


Рисунок 3 – Тромбоэластограмма (контрольная группа, животное № 3), зарегистрированная при однократном воздействии гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности (O_2 – 5%, CO_2 – 5% – 20 минут) после 30-кратного введения 0,9% раствора NaCl.

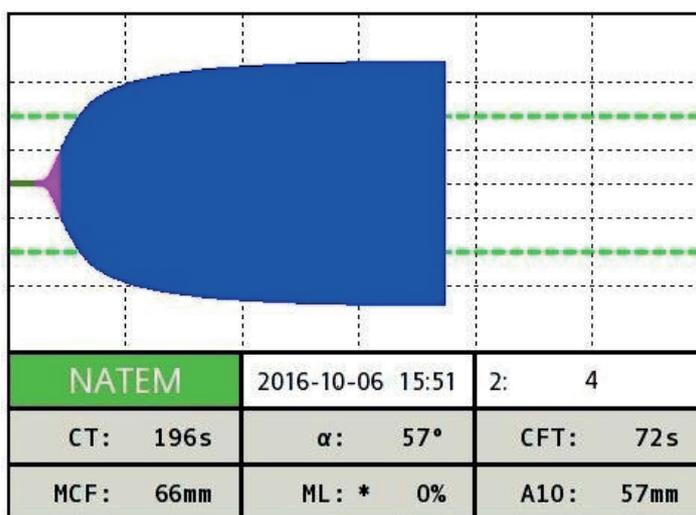


Рисунок 4 – Тромбоэластограмма (опытная группа, животное № 4), зарегистрированная при однократном воздействии гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности (O_2 – 5%, CO_2 – 5% – 20 минут) после 30-кратного введения мексидола.

По данным тромбоэластографии, при однократном воздействии ГГ максимальной интенсивности после курсового введения мексидола было зарегистрировано укорочение максимальной плотности сгустка (MCF) на 11% ($p < 0,01$), по остальным показателям достоверных отличий зафиксировано не было. В качестве примера представлены тромбоэластограммы, полученные у животных из контрольной и опытной групп (рисунок 3 и рисунок 4). Предварительное курсовое применение мексидола во многом нормализовало гемостазиологическую картину, зарегистрированную после однократного воздействия ГГ максимальной интенсивности. При этом было обнаружено лишь снижение максимальной плотности сгустка, что может быть связано со снижением количества тромбоцитов, а также угнетением их способности к агрегации. Этот факт может быть

объяснен тем, что CO_2 способен стимулировать эндотелиальную NO-синтазу [9], приводящую к увеличению содержания в кровотоке NO, обладающего мощным дез- и антиагрегантным действием [10]. Кроме того, известно, что мексидол самостоятельно улучшает кровообращение в сосудистом русле, ингибируя агрегацию тромбоцитов и повышая антитромбогенный потенциал крови.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы:

1. Александров О.В., Стручков П.В., Виницкая Р.С. и др. Клинико-функциональный эффект курса интервальной нормобарической гипокситерапии у больных хроническим obstructивным бронхитом и бронхиальной астмой. *Терапевтический архив*. 1999; 3: 28–32.

2. Куликов В.П., Полухина М.Г., Беспалов А.Г. и др. Влияние гипоксически-гиперкапнического прекодиционирования на гемостаз, реологию и толерантность головного мозга к ишемии. *Региональное кровообращение и микроциркуляция*. 2004; 3(11): 27-32.

3. Новиков В.Е., Катунина Н.П. Фармакология и биохимия гипоксии. *Обзор по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2002; 1(2): 73-78.

4. Пак Г.Д. Влияние дыхательной гипоксии на свертывающую систему крови у собак. *Вестник АН КазССР*. 1979; 10: 50-52.

5. Стратиенко Е.Н., Петухова Н.Ф. Поиск средств фармакологической коррекции гипоксических состояний. *Вестник Брянского государственного университета*. 2012; 4 (2): 232-234.

6. Чукаев С.А. Оценка фармакотерапевтической эффективности мексидола в качестве средства коррекции гипоксических ишемических реоксигенационных повреждений. *Вестник Бурятского государственного университета*. 2014; 12: 19-24.

7. Шахматов И.И., Вдовин В.М., Киселев В.И. Состояние системы гемостаза при различных видах гипоксического воздействия. *Бюллетень СО РАМН*. 2010; 2: 131-138.

8. *European Convention for the Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*. Strasbourg: Council of Europe. 1986; 51 p.

9. Checchin D, Sennlaub F, Sirinyan M, Brault S, Zhu T, Kermorvant-Duchemin E. et al. Hypercapnia prevents neovascularization via nitrate stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; 40: 543-553.

10. Kimura C, Koyama T, Oike M, Ito Y. Hypotonic stress-induced NO production in endothelium depends on endogenous ATP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 3(274): 736-740.

11. Toff WD, Jones CI, Ford I, Pearse RJ, Watson HG, Watt SJ et al. Effect of hypobaric hypoxia, simulating conditions during long-haul air travel, on coagulation, fibrinolysis, platelet function, and endothelial activation. *JAMA*. 2006; (295): 2251-2261.

12. West JB, Schoene RB, Milledge JS. *High Altitude Medicine and Physiology*. USA: Hodder Arnold. 2007; 499 p.

Контактные данные

Автор, ответственный за переписку: Москаленко Светлана Валерьевна, преподаватель кафедры нормальной физиологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, младший научный сотрудник НИИ физиологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск. 656031, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126; 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4. Тел.: (3852) 566928.

E-mail: sunrisemsv@gmail.com

Информация об авторах

Шахматов Игорь Ильич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, главный научный сотрудник НИИ физиологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск.

656031, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126; 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4. Тел.: (3852) 566928.

E-mail: iish59@yandex.ru

Бондарчук Юлия Алексеевна, к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, старший научный сотрудник НИИ физиологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск.

656031, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126; 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4. Тел.: (3852) 566928.

E-mail: bondarchuk2606@yandex.ru

Улитина Оксана Михайловна, к.б.н., доцент кафедры нормальной физиологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, младший научный сотрудник НИИ физиологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск.

656031, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126; 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4. Тел.: (3852) 566928.

E-mail: oulitina@mail.ru

Алексеева Ольга Васильевна, к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, старший научный сотрудник НИИ физиологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск.

656031, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126; 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4. Тел.: (3852) 566928.

E-mail: alekseeva0506@mail.ru