

Реакция системы гемостаза при гиперкапнической гипоксии после курсового применения мексидола с использованием метода тромбоэластографии

Светлана Валерьевна Москаленко^{1,2*}, Игорь Ильич Шахматов^{1,2},
Юлия Алексеевна Бондарчук^{1,2}, Ольга Васильевна Алексеева^{1,2},
Оксана Михайловна Улитина^{1,2}

¹Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул, Россия;

²НИИ физиологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Россия

Реферат

Цель. Изучить реакцию системы гемостаза на однократное воздействие гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности у крыс и возможность коррекции гемостазиологических нарушений с помощью предварительного курсового применения антигиопксанта — мексидола.

Материалы и методы. В данном исследовании были использованы половозрелые крысы-самцы (48 особей) линии Вистар средней массой $274,0 \pm 32,0$ 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 O_2 — 5,0%, CO_2 — 5,0% в течение однократного 20-минутного воздействия. В качестве тренировочного режима был использован 30-кратный курс мексидола, препарат крысам вводился внутривентриально в дозе 50 мг/кг за 1,5 ч до воздействия гиперкапнической гипоксии.

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

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

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

Для цитирования: Москаленко С.В., Шахматов И.И., Бондарчук Ю.А. Реакция системы гемостаза при гиперкапнической гипоксии после курсового применения мексидола с использованием метода тромбоэластографии. *Казанский мед. ж.* 2018; 99 (6): 936–941. DOI: 10.17816/KMJ2018-936.

Reaction of hemostasis system in hypercapnic hypoxia after the course of mexidol assessed by the method of thromboelastography

S.V. Moskalenko^{1,2}, I.I. Shakhmatov^{1,2}, Yu.A. Bondarchuk^{1,2}, O.V. Alekseeva^{1,2}, O.M. Ulitina^{1,2}

¹Altai State Medical University, Barnaul, Russia;

²Scientific Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

Abstract

Aim. To study the reaction of hemostasis system to a single effect of hypercapnic hypoxia of maximum intensity in rats and possibility of correcting hemostasis disorders by means of a preliminary course of an antihypoxant — mexidol.

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

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 ($n=12 \times 2$).

1-я и 2-я опытные группы подвергались однократному воздействию ГГ максимальной интенсивности путем помещения крыс на 20 мин 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 за 1,5 ч (время обусловлено пиком концентрации препарата в плазме крови [14]) до воздействия гиперкапнической гипоксии предварительно на протяжении 30 дней ежедневно осуществлялось внутривентральное введение мексидола (50 мг/кг).

Режим максимальной интенсивности воздействия гиперкапнической гипоксии был подобран экспериментальным путем, при котором 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 внутривентрального 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) [16]. До проведения эксперимента на протяжении недельной адаптации к условиям вивария все крысы находились в стандартных условиях содержания согласно требованиям «Надлежащей лабораторной

практики» (Good Laboratory Practice, GLP). Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте, а также Директивами 86/609/ЕЕС [17]. Обезболивание и умерщвление животных проводили в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Работа была одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава РФ. Протокол № 1 от 29 января 2018 г.

В настоящей работе для оценки системы гемостаза использовался интегральный метод исследования — тромбоэластография. Запись тромбоэластограммы с использованием активатора «Start-tem» проводилась на аппарате «Rotem Gamma» (Германия) [18].

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 (СФТ). 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, достигнутой к моменту, когда активизируется 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 [18].

Все цифровые данные, полученные в ходе исследования, подвергались статистической обработке. Данные исследований представлены в виде $m [25\% \div 75\%]$, где m — медиана

Таблица 1. Показатели системы гемостаза плазмы крови крыс при однократном воздействии гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности без/после использования курсового приема мексидола (m [25 % ÷ 75 %])

Показатели	Однократное воздействие ГГ максимальной интенсивности (5,0% O ₂ , 5,0% CO ₂)		Однократное воздействие ГГ максимальной интенсивности (5,0% O ₂ , 5,0% CO ₂) после 30-кратного курсового применения мексидола (50 мг/кг)	
	Контроль 1	Опыт 1	Контроль 2	Опыт 2
СТ, с	236,0 [219,3 ÷ 252,8]	124,0*** [116,2 ÷ 140,3]	174,0 [168,2 ÷ 181,2]	188,7 [179,3 ÷ 190,5]
α °	59,0 [52,0 ÷ 64,0]	78,0** [72,3 ÷ 84,0]	62,8 [57,1 ÷ 69,5]	67,2 [64,0 ÷ 72,8]
CFT, с	124,0 [118,9 ÷ 128,3]	72,0*** [67,4 ÷ 76,0]	92,0 [88,2 ÷ 101,4]	88,4 [85,5 ÷ 95,6]
MCF, мм	67,0 [64,2 ÷ 73,6]	79,0 [70,6 ÷ 82,4]**	76,0 [68,4 ÷ 79,8]	68,0** [65,3 ÷ 71,0]
ML, %	1,0 [0,8 ÷ 1,3]	2,0 [1,8 ÷ 2,3]*	0,0 [0,0 ÷ 0,0]	0,0 [0,0 ÷ 0,0]

Примечание: обозначены статистически значимые отличия от соответствующих показателей группы контроля: * — при $p < 0,05$; ** — при $p < 0,01$; *** — при $p < 0,001$. ГГ — гиперкапническая гипоксия. СТ — время коагуляции; α — угловая константа; MCF — максимальная амплитуда ТЭГ; CFT — время образования сгустка; ML — максимальный лизис.

в выборочной совокупности, [25 % ÷ 75 %] — 25-й и 75-й перцентили. 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 [16, 18].

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

По данным тромбоэластографии 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 (MCF) на 18,0 % ($p < 0,001$). Также выражено укорачивалось время образования сгустка (CFT) 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 тромбоэластограммы животных из контрольной и опытной групп (рис. 1, рис. 2). В описанных выше экспериментах показано, что однократное воздействие ГГ максимальной интенсивности без предшествующего курсового введения мексидола сопровождается активацией как тромбоцитарного, так и коагуляционного звеньев гемостаза, а также активацией фибринолитической системы крови.

Зафиксированные изменения частично подтверждаются результатами, полученными W.D. Toff (2006), показавшего, что вдыхание гиперкапнической смеси (5,0% CO₂ в воздухе) стимулировало гемокоагуляцию вследствие усиления контактной и фосфолипидной активаций пусковых механизмов системы свертывания, повышения тромбопластиновой и тромбиновой активностей, снижения антикоагулянтного потенциала и неферментативного фибринолиза [8].

По данным тромбоэластографии при однократном воздействии ГГ максимальной интенсивности после курсового введения мексидола было зарегистрировано уменьшение показателя 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 (рис. 3, рис. 4). Предварительное курсовое применение мексидола во многом нормализовало гемостазиологическую картину, зарегистрированную после однократного воздействия ГГ максимальной интенсивности.

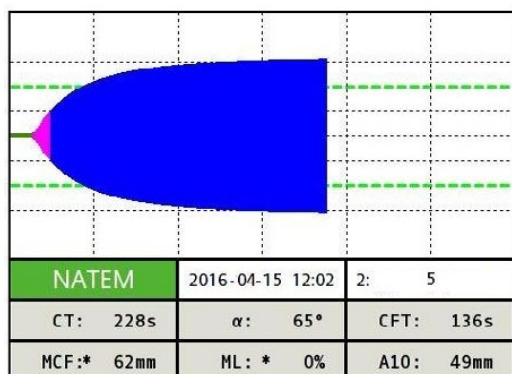


Рис. 1. Тромбоэластограмма (контрольная группа, животное №5), зарегистрированная после однократного пребывания в камере в течение 20 мин в условиях обычного атмосферного давления

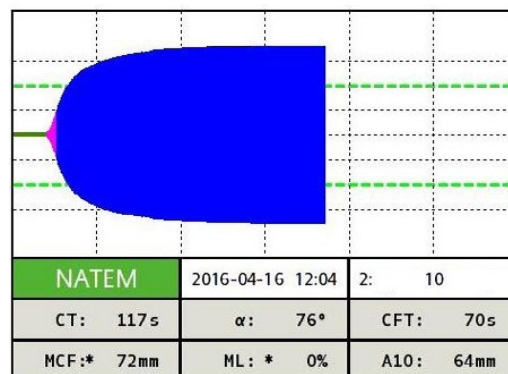


Рис. 2. Тромбоэластограмма (опытная группа, животное №1), зарегистрированная сразу после однократного воздействия гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности (O_2 — 5%; CO_2 — 5%) в течение 20 мин

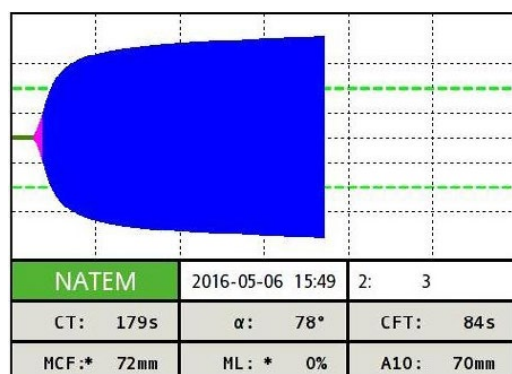


Рис. 3. Тромбоэластограмма (контрольная группа, животное №3), зарегистрированная при однократном воздействии гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности (O_2 — 5%, CO_2 — 5%) в течение 20 мин после 30-кратного введения 0,9% раствора NaCl

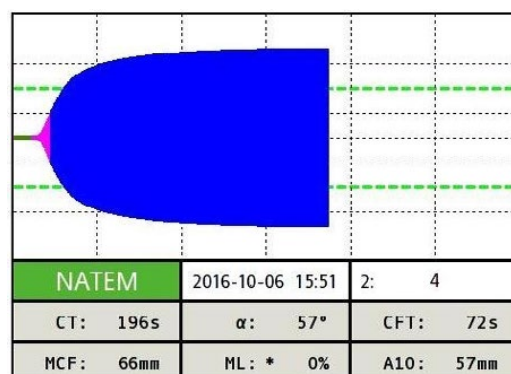


Рис. 4. Тромбоэластограмма (опытная группа, животное №4), зарегистрированная при однократном воздействии гиперкапнической гипоксии максимальной интенсивности (O_2 — 5%, CO_2 — 5%) в течение 20 мин после 30-кратного введения мексидола

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 [19], приводящую к увеличению содержания в кровотоке NO, обладающего мощным дез- и антиагрегантным действием [20]. Кроме того, известно, что мексидол самостоятельно улучшает кровообращение в сосудистом русле, ингибируя агрегацию тромбоцитов и повышая антитромбогенный потенциал крови.

ВЫВОДЫ

Однократное воздействие ГГ максимальной интенсивности приводит к гиперкоагуляции в системе гемостаза.

Предварительное 30-кратное введение мексидола (50 мг/кг) перед воздействием ГГ максимальной интенсивности устраняет состояние гиперкоагуляционного сдвига в системе гемостаза.

Мексидол повышает резистентность организма к воздействию экстремальных факторов и кислородзависимым патологическим состояниям.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

- Новиков В.Е., Катунина Н.П. Фармакология и биохимия гипоксии. *Обзор по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2002; 1 (2): 73–78. [Novikov V.E., Katunina N.P. Pharmacology and biochemistry of hypoxia. *Obzor po klinicheskoy farmakologii*

i lekarstvennoy terapii. 2002; 1 (2): 73–78. (In Russ.)]

2. Агаджанян Н.А., Степанов О.Г., Архипенко Ю.В. Адаптация к гипоксии как метод лечения и профилактики поражений слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2001; 132 (9): 358–360. [Agadzhanyan N.A., Stepanov O.G., Arkhipenko Yu.V. Adaptation to hypoxia as a method of treatment and prevention of mucosal damage of stomach and duodenum. *Byulleten' ehksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2001; 132 (9): 358–360. (In Russ.)]

3. Шахматов И.И., Вдовин В.М., Киселев В.И. Состояние системы гемостаза при различных видах гипоксического воздействия. *Бюллетень СО РАМН*. 2010; 2: 131–138. [Shakhmatov I.I., Vdovin V.M., Kiselev V.I. State of hemostasis in different types of hypoxic effect. *Byulleten' SO RAMN*. 2010; 2: 131–138. (In Russ.)]

4. Гриневич И.В. Влияние адаптации к гипоксической гипоксии на клеточный состав селезенки. *Патология*. 2011; 8 (2): 127–129. [Grinevich I.V. Effect of adaptation to hypoxic hypoxia on cellular composition of the spleen. *Patologiya*. 2011; 8 (2): 127–129. (In Russ.)]

5. Пак Г.Д. Влияние дыхательной гипоксии на свертывающую систему крови у собак. *Вестник АН КазССР*. 1979; 10: 50–52. [Pak G.D. Effect of respiratory hypoxia on coagulation system in dogs. *Vestnik AN KazSSSR*. 1979; 10: 50–52. (In Russ.)]

6. Mannucci P.M., Gringeri A., Peyvandi F., Paolantonio T. Di, Mariani G. Short-term exposure to high altitude causes coagulation activation and inhibits fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2002; 87 (2): 342–343. DOI: 10.1055/s-0037-1612997.

7. Куликов В.П., Полушина М.Г., Беспалов А.Г. и др. Влияние гипоксически-гиперкапнического preconditionирования на гемостаз, реологию и толерантность головного мозга к ишемии. *Региональное кровообращение и микроциркуляция*. 2004; 3 (1): 27–32. [Kulikov V.P., Polukhina M.G., Bepalov A.G., et al. Effect of hypoxic-hypercapnic preconditioning on hemostasis, reology and tolerance of brain to ischemia. *Regional'noe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2004; 3 (1): 27–32. (In Russ.)]

8. Toff W.D., Jones C.I., Ford I., Pearse R.J., Watson H.G., Watt S.J., 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. DOI: 10.1001/jama.295.19.2251.

9. West J.B., Schoene R.B., Milledge J.S. *High Altitude Medicine and Physiology*. USA: Hodder Arnold. 2007; 499 p.

10. Стратиенко Е.Н., Петухова Н.Ф. Поиск средств фармакологической коррекции гипоксических состояний. *Вестник Брянского государственного университета*. 2012; 4 (2): 232–234. [Stratienko E.N., Petukhova N.F. Search for ways of pharmacological correction of hypoxia. *Vestnik Bryanskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2012; 4 (2): 232–234. (In Russ.)]

11. Александров О.В., Стручков П.В., Веницкая Р.С. и др. Клинико-функциональный эффект курса интервальной нормобарической гипокситерапии у больных хроническим обструктивным бронхитом и бронхиальной астмой. *Терапевтический архив*. 1999; 3: 28–32. [Aleksandrov O.V., Struchkov P.V., Vinitskaya R.S., et al. Clinical functional effect of interval normobaric hypoxic therapy for patients with chronic obstructive bronchitis and bronchial asthma. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1999; 3: 28–32. (In Russ.)]

12. Левченкова О.С., Новиков В.Е. Индукторы регуляторного фактора адаптации к гипоксии. *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова*. 2014; 2: 134–143. [Levchenkova O.S., Novikov V.E. Inductors of regulatory factor of adaptation to hypoxia. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2014; 2: 134–143. (In Russ.)]

13. Каркищенко Н.Н. Фармакология процессов адаптации и переносимости предельных нагрузок в спорте и режимах работы «до отказа»: второй тайм для дженериков. *Биомедицина*. 2010; 4: 6–23. [Karkishchenko N.N. Pharmacology of adaptation processes and endurances of maximum loads in sports and operating mode “to overflowing”: the second time for generics. *Biomeditsina*. 2010; 4: 6–23. (In Russ.)]

14. Чукаев С.А. Оценка фармакотерапевтической эффективности мексидола в качестве средства коррекции гипоксических ишемических и реоксигенационных повреждений. *Вестник Бурятского государственного университета*. 2014; 12: 19–24. [Chukaev S.A. Evaluation of mexidol pharmacotherapeutic efficiency as a remedy of correction at hypoxia, ischemia and reoxygenation injury. *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2014; 12: 19–24. (In Russ.)]

15. Микуляк Н.И., Иванов П.В., Захаркин А.Г. Экспериментальное исследование эффективности препарата с антиоксидантным типом действия — мексидола на гемостаз при лучевой терапии. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2009; 1: 72–76. [Mikulyak N.I., Ivanov P.V., Zakharkin A.G. Experimental studies of antioxidant mexidole medicine on hemostasis in x-ray therapy. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik*. 2009; 1: 72–76. (In Russ.)]

16. Москаленко С.В., Шахматов И.И., Бондарчук Ю.А. и др. Влияние однократного и многократного воздействия гипоксической гипоксии сильной интенсивности на состояние системы гемостаза у крыс. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2018; 1: 32–37. [Moskalenko S.V., Shakhmatov I.I., Bondarchuk Yu.A., et al. Effect of single and multiple impact of hypoxic hypoxia of strong intensity on the state of the hemostatic system in rats. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 1: 32–37. (In Russ.)] DOI: 10.15372/SSMJ20180105.

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

18. Москаленко С.В. Система гемостаза у крыс при изолированном и сочетанном воздействии мексидола и гипоксической гипоксии с использованием метода тромбозластографии. *Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты*. 2016; 27: 34–43. [Moskalenko S.V. Hemostasis in rats in isolated and combined effect of mexidol and hypoxic hypoxia with the use of thromboelastography. *Fundamental'nye i prikladnye issledovaniya: problemy i rezul'taty*. 2016; 27: 34–43. (In Russ.)]

19. 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. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.016.

20. 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: 736–740. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3205.