

ЛИТЕРАТУРА

1. Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Ланкин В.З. и др. *Фенольные биоантиоксиданты*. Новосибирск: СО РАМН. 2003; 328 с. [Zenkov N.K., Kandantintseva N.V., Lankin V.Z. et al. *Fenol'nye bioantioksidanty*. (Phenolic bioantioxidants.) Novosibirsk: SO RAMN. 2003; 328 p. (In Russ.)]
2. Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В. и др. *Свободнорадикальное окисление и старение*. СПб.: Наука. 2003; 327 с. [Khavinson V.H., Barinov V.A., Arutyunyan A.V. et al. *Svobodnoradikal'noe okislenie i starenie*. (Free radical oxidation and aging.) Saint Petersburg: Nauka. 2003; 327 p. (In Russ.)]
3. Бабижаев М.А., Деев А.М. Свободнорадикальное окисление липидов и тиоловых групп при катарактогенезе. *Биофизика*. 1986; 31 (1): 109–114. [Babizhaev M.A., Deev A.M. Free radical oxidation of lipids and thiol groups in cataractogenesis. *Biofizika*. 1986; 31 (1): 109–114. (In Russ.)]
4. Багиров Н.А. Современные проблемы катарактогенеза. *Офтальмологический журнал*. 2000; (6): 98–102. [Bagirov N.A. Modern problems of cataractogenesis. *Oftal'mologicheskii zhurnal*. 2000; (6): 98–102. (In Russ.)]
5. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н., Девяткин А.А. и др. *Морфология жидких сред глаза (новая теория инволютивного катарактогенеза)*. Монография. М.: Медицина. 2004; 244 с. [Shabalin V.N., Shatokhina S.N., Devyatkin A.A. et al. *Morfologiya zhidkikh sred glaza (novaya teoriya involyutivnogo kataraktogeneza)*. Monografiya. Moscow: Medicine. 2004; 244 p. (In Russ.)]
6. Horakova L., Ondrejickova O., Bachrata K. et al. Preventive effect of several antioxidants after oxidative stress on rat brain homogenates. *Gen. Physiol. Biophys.* 2000; 19: 195–205. PMID: 11156442.
7. Anderson R.E., Kretzer F.L., Rapp L.M. Free radicals and ocular disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994; 366: 73–86. DOI: 10.1007/978-1-4615-1833-4_6.
8. Леус Н.Ф. О пусковых механизмах катарактогенеза. *Офтальмологический журнал*. 1985; (7): 430–434. [Leus N.F. About the trigger mechanisms of cataractogenesis. *Oftal'mologicheskii zhurnal*. 1985; (7): 430–434. (In Russ.)]
9. Метелицына И.П., Коломийчук С.Г., Кравченко Л.И. и др. Концентрация витаминов-антиоксидантов и субстратов НАД-зависимых дегидрогеназных систем в крови больных возрастной катарактой. *Ж. АМН Украины*. 1996; 2 (4): 696–703. [Metelitsyna I.P., Kolomiychuk S.G., Kravchenko L.I. et al. The concentration of vitamins-antioxidants and substrates over-dependent dehydrogenaznyh systems in blood of patients with age-related cataract. *Zhurnal AMN Ukrainy*. 1996; 2 (4): 696–703. (In Russ.)]
10. Patel R.P., Boersma B.J., Crawford J.H. et al. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radical Biol. Med.* 2001; 31: 1570–1581. DOI: 10.1016/S0891-5849(01)00737-7.
11. Pau H., Graf P., Sies H. Glutathione levels in human lens: Regional distribution in different forms of cataract. *Exp. Eye Res.* 1990; 50: 17–20. DOI: 10.1016/0014-4835(90)90005-F.
12. Мальцев Э.В., Багиров Н.А., Аль Шариф Ясир. Перспективы развития медикаментозного лечения катаракт. *Офтальмологический журнал*. 2002; (2): 46–49. [Mal'tsev E.V., Bagirov N.A., Al' Sharif Yasir. Prospects for the development of medical treatment of cataracts. *Oftal'mologicheskii zhurnal*. 2002; (2): 46–49. (In Russ.)]
13. Зарудий Ф.С. 2,6-Ди-третбутил-4-метилфенол (дибутинол, ионол, тонарол) классический антиоксидант. *Химико-фармацевтический журнал*. 2001; 35 (3): 42–48. [Zarudiy F.S. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (dibutanol, ionol, tonarol) is a classical antioxidant. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 2001; 35 (3): 42–48. (In Russ.)]
14. Esterbauer H., Puhl H., Dieber-Rotheneder M. et al. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann. Med.* 1991; 23 (5): 573–581. DOI: 10.3109/07853899109150520.
15. Bhuyan K.C., Bhuyan D.C., Podos S.M. Free radical enhancer xenobiotic is an inducer of cataract in rabbit. *Free Radic. Res. Commun.* 1991; 12–13 (2): 12–13. DOI: 10.3109/10715769109145837.
16. Колесников А.В. Подбор эффективной антиоксидантной дозы ионала для ткани хрусталика при местном инстилляционном введении его масляного раствора. *Рос. мед.-биол. вестн. им. И.П. Павлова*. 2006; (2): 46–49. [Kolesnikov A.V. The choice of efficient antioxidant dose of ionol for the tissue of lens in local instillation introduction of its oil solution. *Rossiyski. mediko-biologicheskii vestnik im. I.P. Pavlova*. 2006; (2): 4–49. (In Russ.)]

УДК 613.632.4: 612.398.196: 612.084: 616-008.815: 616.151.55

© 2017 Оруджов Р.А., Джафарова Р.Э.

СВЁРТЫВАЮЩАЯ СИСТЕМА КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ИНГАЛЯЦИОННОМ ОТРАВЛЕНИИ БЕНЗОЛОМ

Рагим Алмамед оглы Оруджов, Рена Энвер кызы Джафарова*

Азербайджанский медицинский университет, г. Баку, Азербайджан

Поступила 03.05.2017; принята в печать 04.07.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-758

Цель. Изучить в эксперименте изменения, происходящие в системе свёртывания крови на фоне интоксикации малыми дозами бензола.

Методы. Эксперимент проведён на 36 кроликах путём хронической затравки животных бензолом на протяжении 4 мес ежедневно по 4 ч с 1 свободным от затравки днём в неделю с месячным восстановительным периодом после завершения затравки. Средняя затравочная концентрация бензола в камерах находилась в пределах 1240 ± 82 мг/м³. Животные были разделены на три группы: первая группа подвергалась затравке повышающимися концентрациями бензола, вторая группа — колеблющимися (интермиттирующими) концентрациями, третья группа — не подвергающиеся действию бензола животные, служащие контролем. В группах определяли общую коагуляционную активность крови, время свёртывания крови, ретракцию кровяного сгустка, время

рекальцификации плазмы, толерантность плазмы к гепарину, протромбиновый индекс, концентрацию фибриногена, фибринолитическую активность крови.

Результаты. Через 1 мес после затравки показатели ретракции кровяного сгустка у животных первой и второй групп увеличились на 79,8 и 23,1% соответственно. Толерантность плазмы к гепарину наиболее значительно изменилась у животных второй группы (на 15,4%). У животных первой группы протромбиновое время увеличилось на 11,4%, тогда как у животных третьей группы этот показатель снижался на 0,4%. Протромбиновый индекс у животных первой группы уменьшался на 4,3%, во второй группе изменения не носили существенного характера. Концентрация фибриногена в крови у животных первой группы существенно не изменялась, понижение составляло 4,2%, тогда как во второй группе понижалась на 10,4%. Фибринолитическая активность в первой и второй группах снижалась на 47,5 и 5,8% соответственно.

Вывод. Изученные концентрации бензола вызывают нарушения свёртывающей и антисвёртывающей системы крови, включая две стадии гемостаза: 1-я стадия — начиная с активации фактора XII, 2-я стадия — начиная с активации протромбина (фактора II).

Ключевые слова: интоксикация бензолом, эксперимент, система свёртывания крови, гепарин, протромбиновый индекс.

BLOOD COAGULATION SYSTEM IN CHRONIC BENZENE POISONING VIA INHALATION

R.A. Oruzhov¹, R.A. Zhafarova²

Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

Aim. To experimentally study the changes occurring in blood coagulation system in exposure to low-dose benzene.

Methods. The experiment was performed on 36 rabbits by chronic exposure of the animals to benzene during 4 months on a daily basis 4 hours a day with 1 non-exposure day a week and a one-month recovery period after the end of exposure. The average poisoning concentration of benzene in the chambers was between 1240±82 mg/m³. The animals were divided into three groups: group 1 was exposed to gradually increasing concentration of benzene, group 2 — to fluctuating (intermittent) concentrations of benzene, group 3 included unexposed to benzene animals and was used as the control group. Overall blood clotting activity, blood clotting time, blood clot retraction, plasma recalcification time, plasma tolerance to heparin, prothrombin index, fibrinogen concentration, blood fibrinolytic activity were determined.

Results. In a month after exposure blood clot retraction rates in groups 1 and 2 increased by 79.8 and 23.1% respectively. Plasma tolerance to heparin most significantly changed in animals from group 2 (by 15.4%). Prothrombin time increased by 11.4% in group 1 while in group 3 this parameter decreased by 0.4%. Prothrombin index in group 1 decreased by 4.3%, and in group 2 the changes were not statistically significant. Concentration of fibrinogen in the blood in group 1 had no significant changes and decreased by 4.2% while in group 2 it decreased by 10.4%. Fibrinolytic activity in group 1 and 2 decreased by 47.5 and 5.8% respectively.

Conclusion. The studied benzene concentrations impair blood coagulation and anti-coagulation systems including two stages of hemostasis: 1st stage — from factor XII activation, 2nd stage — from prothrombin (factor II) activation.

Keywords: benzene poisoning, experiment, blood coagulation system, heparin, prothrombin index.

В современных условиях интенсивного роста доли промышленных химических веществ спектр их неблагоприятного действия на организм человека при профессиональной деятельности чрезвычайно обширен. Наиболее часто регистрируемым эффектом их действия оказываются изменения в системе крови и кроветворения, особенно свёртывающей системе.

Таким действием обладают, в частности, органические растворители, наиболее широко применяемый из которых — бензол [1–4]. Так, например, при хронической бензольной интоксикации у людей, наряду с общими симптомами (такими, как головная боль, повышенная утомляемость, резкая слабость, головокружение, потеря аппетита, тошнота, иногда рвота, бессонница, нервозность и пр.), могут начаться частые и обильные кровотечения (из носа, дёсен и матки, кожные и слизистые геморрагии, кровоизлияния в сетчатку).

Установлено, что бензол и его гомологи — полиморфные яды, которые вызывают преимущественное поражение костного мозга и нервной системы. Исследования В.С. Ткачишина [5] показали влияние бен-

зола и его гомологов на систему кроветворения и свёртывания крови. При этом развивается панцитопения, характеризующаяся уменьшением количества всех форменных элементов. Автор отмечает, что для типичной формы хронической бензольной интоксикации характерно этапное развитие процесса действия на кроветворение: на первом этапе регистрируется поражение лейкопоэтической функции костномозгового кроветворения, на втором этапе нарушается мегакариоцитарная функция, на третьем этапе нарушается эритроцитарная функция костного мозга. При этом в периферической крови постепенно развиваются характерные для бензольной интоксикации лейкопения, тромбоцитопения и анемия.

Свёртывающая и противосвёртывающая системы крови взаимно корректируют состояние организма и не изолированы от других его функциональных систем [6]. Различают 7 степеней свёртываемости плазмы: 1-я, 2-я и 3-я степени характеризуют гипокоагуляцию, 4-я, 5-я и 6-я — норму, 7-я степень — повышенную свёртываемость [7].

Реактивность организма зависит от

функционального равновесия нервной, гуморальной и эндокринной систем. Нарушение такого равновесия ведёт к изменению функционального равновесия свёртывающей и противосвёртывающей систем [8–10]. На фоне интоксикации органическими растворителями происходит изменение всех указанных систем, что в свою очередь оказывает влияние на систему крови. В свете этого мы сочли целесообразным изучить изменения, происходящие в системе свёртывания крови на фоне интоксикации малыми дозами бензола.

Опыты проведены на 36 кроликах с исходной массой тела 1,8–2,2 кг путём хронической затравки животных бензолом. Подопытные животные были разделены на три группы, по 12 животных в каждой: первая группа подвергалась затравке повышающимися концентрациями бензола, вторая группа — колеблющимися (интермиттирующими) концентрациями, третья группа — не подвергающиеся действию бензола животные, служащие контролем.

Режим повышающихся концентраций создавали путём введения в камеру каждые 15 мин по 0,25 пороговой концентрации с тем, чтобы концентрация по бензолу в течение всей экспозиции равномерно повышалась, что обеспечивало замедленное поступление бензола в организм. При режиме колеблющихся концентраций бензол в камеру подавали через 30 мин в таком количестве, чтобы концентрации резко колебались. В отдельные периоды камера открывалась для проветривания на 20 мин. При этом последовательность концентраций каждого дня менялась на протяжении 12 дней, а затем повторялась в таком же порядке.

Затравку животных осуществляли в специальных камерах объёмом 700 л. Средняя затравочная концентрация бензола в камерах находилась в пределах 1240 ± 82 мг/м³. При этом количество животных в камерах соответственно их объёму рассчитывали таким образом, чтобы создать одинаковые условия по содержанию в них кислорода на протяжении 4 ч хронической затравки. Концентрацию бензола в затравочных камерах создавали по расчёту и регулярно проверяли.

Хронические эксперименты на кроликах проводили на протяжении 4 мес ежедневно по 4 ч с 1 свободным от затравки днём в неделю с месячным восстановительным периодом после завершения затравки. Постановка эксперимента учитывала максимальную имитацию условия производства,

где рабочие чаще всего подвергаются воздействию химических веществ, концентрация которых постоянно меняется в течение рабочего дня.

Вне опытов все животные по содержанию и питанию находились в одинаковых условиях. Все эксперименты на животных проведены согласно «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 18 марта 1986 г.).

Учитывая характер токсического действия бензола, проявляющегося в нарушении функций центральной нервной системы и кроветворения, в наших исследованиях были определены следующие показатели, характеризующие свёртывающую систему крови:

- общая коагулирующая активность крови, время свёртывания крови по методу Ли-Уайта, ретракция кровяного сгустка;
- показатели, характеризующие 1-ю фазу гемостаза, — время рекальцификации плазмы, толерантность плазмы к гепарину;
- показатели, характеризующие 2-ю фазу гемостаза — протромбиновый индекс;
- показатели, характеризующие 3-ю фазу гемостаза — концентрация фибриногена, фибринолитическая активность крови [11, 12].

Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрическим с определением значений U для критерия Уилкоксона–Манна–Уитни.

В табл. 1 представлены результаты определения показателей свёртывающей системы крови исследуемых животных. Установлено, что время свёртывания крови у животных контрольной (третьей) группы не подвергается существенным изменениям. Повышающиеся концентрации бензола (первая группа) проводили к значительному увеличению времени свёртывания крови. При действии интермиттирующих концентраций бензола (вторая группа) аналогичная реакция наступала несколько раньше. Уже на 1-м месяце опыта время свёртывания крови в этой группе повышалось.

В наших исследованиях не выявлено столь существенных сдвигов в показателях времени рекальцификации плазмы. Только к концу опыта у животных первой группы отмечено некоторое повышение времени рекальцификации плазмы.

В показателях ретракции кровяного

Динамика изменения показателей свёртывающей системы крови у опытных животных (нивелированные данные)

Показатели	Группы	Время от начала эксперимента				
		Исходный уровень	Через 1 мес	Через 2 мес	Через 3 мес	Через 4 мес
Время свёртывания крови, с	I	268,0±25,9	274,9±18,93	444,2±20,0	454,2±17,68	459,51±16,64
	II	268,0±9,42	300,3±16,39	371,5±15,75*	411,9±4,11*	420,1±15,31*
	III	268,0±18,36	269,2± 19,05	250,1 ±17,72	273,0± 18,43	253,0±23,76
Протромбиновое время, с	I	23,6±0,95	26,29±0,77	27,54±1,41	28,91±1,67	30,65±1,79*
	II	25,17±0,84	26,31±1,30	23,65±0,79	24,61±0,99	23,65±1,19
	III	25,17±1,24	25,08±1,42	24,25±10,80	24,08±0,53	23,6±0,95
Протромбиновый индекс, %	I	89,5±3,33	85,64±2,45	82,98±3,86	80,21±4,27*	75,57±4,06*
	II	89,5±3,22	84,23±3,46	91,54±2,65	88,83±3,24	90,61±3,97
	III	89,50±2,60	90,67±4,70	91,83±2,57	92,17±1,86	94,73±3,52
Ретракция кровяного сгустка, %	I	42,73±5,12	76,82±6,26*	96,66±2,72*	98,74±1,86*	99,54±2,68*
	II	42,73±3,45	52,61±1,85*	54,85±2,39*	59,99±3,74*	59,84±2,89*
	III	42,73±1,63	39,4±1,63	39,66±2,6	39,9±0,91	41,9±1,94
Время рекальцификации плазмы, с	I	73,08±4,45	82,2±3,25	72,53±3,96	82,04±3,41	84,82±3,60*
	II	73,08±1,61	79,90±3,15	73,93±5,10	78,64±3,55	77,99±3,55
	III	73,08±2,48	72,42±2,39	73,5±4,70	74,17±3,90	76,91±2,76
Концентрация фибриногена, %	I	0,48±0,04	0,50±0,04	0,39±0,03	0,37±1,93*	0,36±0,02*
	II	0,48±0,04	0,53±0,02	0,54±0,05	0,37±1,93*	0,36±0,02*
	III	0,48±0,03	0,48±0,04	0,52±0,05	0,54±0,04	0,50±0,06
Фибринолитическая активность, %	I	10,4±1,08	5,46±0,45*	5,23±0,29*	5,42±0,29*	5,27±0,33*
	II	10,4±0,79	9,81±0,99	9,87±0,80	9,95±1,54	5,55±0,39*
	III	10,4±1,12	10,8±1,09	9,45±0,88	12,3±1,21	10,5±1,17
Толерантность плазмы к гепарину, с	I	73,58±5,56	76,39±6,34	95,61±13,63	101,2±6,45*	100,35±9,09*
	II	73,58±4,61	84,92±5,67	71,823±4,18	107,36±12,73	131,54±14,16
	III	73,58±5,05	71,92±4,52	63,33±6,91	72,67±4,61	80,55±8,08
Тромботест (степень свёртываемости плазмы)	I	V — 11; VI — 1	V — 9; VI — 3	IV — 3; V — 7	III — 5; IV — 1; V — 4	II — 4; III — 2; IV — 2
	II	V — 11; VI — 1	IV — 1; V — 8; VI — 3	IV — 3; V — 7; VI — 1	III — 4; IV — 3; V — 4	II — 5; III — 1; IV — 3
	III	V — 12	V — 8; VI — 4	V — 11; VI — 1	V — 10; VI — 2	V — 10; VI — 1

Примечание: *статистическая значимость различий с исходным значением ($p < 0,05$); данные представлены в виде $M \pm m$.

сгустка не произошло статистически значимых изменений у животных контрольной группы в течение эксперимента. Наряду с этим установлено статистически значимое увеличение этого показателя у животных, получавших повышающиеся концентрации бензола. В течение затравки уровень ретракции кровяного сгустка значительно увеличился. Увеличение ретракции кровяного сгустка было отмечено также у животных, затравленных интермиттирующими концентрациями бензола, начиная с 1-го месяца затравки.

Толерантность плазмы к гепарину характеризует противосвёртывающую систему крови. Известно, что гепарин снижает свёртывание крови во всех фазах. При этом толерантность плазмы к гепарину показывает,

насколько плазма может противостоять антисвёртывающему действию гепарина, что можно рассматривать как корригирование гиперкоагуляции крови [8].

Наши исследования показали, что толерантность плазмы к гепарину у животных контрольной группы практически не изменялась в течение эксперимента. Как видно из табл. 1, более заметные отклонения от фоновых показателей и показателей контрольных животных зарегистрированы у подопытных животных первой группы.

У животных первой группы, подвергавшихся затравке повышающимися концентрациями бензола, протромбиновое время к концу опыта увеличивалось. У животных второй группы этот показатель в период исследований несколько снижался. Протром-

биновый индекс характеризует процессы, происходящие во 2-й фазе свёртывания крови (в фазе тромбинообразования). Проведённые нами исследования показали, что у животных первой группы протромбиновый индекс уменьшался, а во второй группе изменения протромбинового индекса не носили существенного характера.

Уровень фибриногена в крови, фибринолитическая активность и тромботест характеризуют 3-ю, завершающую фазу свёртывания крови. Анализируя тромботест, следует учесть, что в 3-й фазе свёртывания крови растворимый фибриноген (фактор I) превращается в нерастворимый фибрин, что происходит под влиянием тромбина. При этом тромботест показывает степень агрегации нативных белковых молекул, то есть фибриллярных единиц и растворимых глобулярных белков [10–12].

Исследования показали, что концентрация фибриногена в крови у животных второй группы существенно не изменялась и находилась на уровне показателей животных контрольной группы. Затравка животных повышающимися концентрациями бензола вызывала понижение концентрации фибриногена.

О фибринолитической активности мы судили по данным процента фибринолиза. У животных контрольной группы этот показатель существенно не изменялся. На этом фоне отмечено статистически достоверное снижение фибринолитической активности крови в основных группах.

Таким образом, длительное действие повышающихся и интермиттирующих концентраций бензола вызывало у подопытных животных удлинение времени свёртывания крови, времени рекальцификации плазмы, что свидетельствует о нарушениях в ранних фазах свёртывания крови. Удлинение времени рекальцификации плазмы при нормальном протромбиновом индексе свидетельствует о нарушениях в 1-й, тромбопластинообразовательной фазе свёртывания. Снижение концентрации фибриногена и фибринолитической активности крови может быть связано с нарушением функции печени, вызванной действием бензола.

В основе физиологической регуляции жидкого состояния крови и её свёртывания находятся единство и взаимное противоречивое взаимодействие двух систем — свёртывающей и противосвёртывающей, составляющих в эволюционном отношении единый регуляторный физиологичес-

кий механизм. В свете вышеизложенного хроническая затравка повышающимися и интермиттирующими концентрациями бензола приводит к сдвигам показателей антисвёртывающей системы крови. В частности, повышается толерантность плазмы к гепарину, особенно при воздействии интермиттирующих концентраций.

При затравке повышающимися концентрациями бензола у подопытных животных, кроме повышения толерантности плазмы к гепарину, отмечены повышение протромбинового времени и соответствующее снижение протромбинового индекса.

ВЫВОД

Изученные концентрации бензола вызывают нарушения свёртывающей и антисвёртывающей системы крови, включая две стадии гемостаза: 1-я стадия — начиная с активации фактора XII, 2-я стадия — начиная с активации протромбина (фактора II).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по данной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Измеров Н.Ф., Денисов Э.И., Прокопенко Л.В. и др. Методология выявления и профилактики заболеваний, связанных с работой. *Мед. труда и промышл. экология*. 2010; 9: 1–7. [Izmerov N.F., Denisov Je.I., Prokopenko L.V. et al. Methodology to reveal and prevent diseases associated to work. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2010; 9: 1–7. (In Russ.)]
2. Оруджев Р.А. Различие в действии промышленных наркотиков на примере бензола, бензина и ацетона. *Азмеджурнал*. 2014; (2): 95–98. [Orudzhev R.A. The difference in the effect of industrial drugs on the example of benzene, gasoline and acetone. *Azmedzhurnal*. 2014; (2): 95–98. (In Azerb.)]
3. Muttray A., Martus P., Schachtrup S. et al. Acute effects of an organic solvent mixture on the human central nervous system. *Eur. J. Med. Res.* 2005; 10 (9): 381–388. PMID: 16183550.
4. Xiao S., Gao L., Liu Y. et al. Association of genetic polymorphisms in ERCC1 and ERCC2/XPD with risk of chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population. *Mutation Research. Genetic Toxicol. Environmental Mutagenesis*. 2013; 751 (1): 52–58. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2012.11.002.
5. Ткачишин В.С. Гематологические синдромы в клинике профессиональных заболеваний. *Искусство лечения*. 2007; 3: 12–14. [Tkachishin V.S. Hematologic syndromes in the clinic of occupational diseases. *Isskustvo lecheniya*. 2007; 3: 12–14. (In Russ.)]
6. Азизова О.А., Пирязев А.П., Асейгев А.И. Окислительная модификация фибриногена замедляет его превращение в фибрин под влиянием тромбина. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2009; 147 (92): 160–163. [Azizova O.A., Piriyazev A.P., Aseygev A.I. Oxidative modification of fibrinogen slows its conversion into fibrin under the influence of thrombin. *Byulleten'*

eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2009; 147 (92): 160–163. (In Russ.)]

7. Felli A., Zeidler P., Jilma B. et al. Different heparin contents in prothrombin complex concentrates may impair blood clotting in outpatients with ventricular assist devices receiving phenprocoumon. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2016; 30 (1): 96–101. DOI: 10.1053/j.jvca.2015.08.012.

8. Sin J.H., Berger B., Lesch Ch.A. Four-factor prothrombin complex concentrate for life-threatening bleeds or emergent surgery: A retrospective evaluation. *J. Crit. Care.* 2016; 36: 166–172. DOI: 10.1016/j.jcrc.2016.06.024.

9. Bailey M.A., Griffin K.J., Sohrabi S. et al. Plasma thrombin-antithrombin complex, prothrombin fragments 1 and 2, and D-dimer levels are elevated after endovascular but not open repair of infrarenal abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* 2013; 57 (6): 1512–1518. DOI: 10.1016/j.jvs.2012.12.030.

10. Gionis M.N., Ioannou Ch.V., Katsamouris A.N. et al. The study of the thrombin generation mechanism

and the effect of low molecular weight heparin as thromboprophylaxis in patients undergoing total knee and hip replacement. *Thrombosis Res.* 2013; 132 (6): 685–691. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.09.037.

11. Ослопов В.Н., Садыхова А.Р., Абдулхаков Р.А. *Клиническая лабораторная диагностика*. 3-е издание. М.: МЕДпресс-информ. 2005; 64 с. [Osloпов V.N., Sadykova A.R., Abdulkhakov R.A. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. (Clinical laboratory diagnostics. Third ed.) Moscow: MEDpress-inform. 2005; 64 p. (In Russ.)]

12. Бокарев И.Н., Доронина А.М., Козлова Т.В. и др. *Лабораторные методы исследования системы свёртывания крови*. Методические рекомендации. М. 2011; 15 с. [Bokarev I.N., Doronina A.M., Kozlova T.V. et al. *Laboratornye metody issledovaniya sistemy svertyvaniya krovi*. (Laboratory methods of studying the blood coagulation system. Guidelines.) Moscow. 2011; 15 p. (In Russ.)]

УДК 616.831-005.4-085: 615.033: 612.084

© 2017 Соколов М.Е. и соавторы

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ГОЛОВНОГО МОЗГА

Михаил Евгеньевич Соколов*, Фарид Вагизович Баширов, Зуфар Зуфарович Сафиуллов

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Поступила 14.07.2017; принята в печать 07.08.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-763

Цель. Разработка протокола прямой и клеточно-опосредованной генной терапии ишемического инсульта головного мозга.

Методы. Вирусный вектор, несущий репортёрный ген зелёного флуоресцирующего белка (GFP), создан на основе аденовируса человека 5-го серотипа (Ad5). Заготовку крови пуповины производили по инструкции банка стволовых клеток Казанского государственного медицинского университета. Мононуклеарные клетки крови пуповины выделяли в градиенте плотности фикола по стандартной методике и трансдуцировали Ad5-GFP. Ишемический инсульт головного мозга у крыс вызывали методом дистальной окклюзии средней мозговой артерии через трепанационное отверстие в височной кости под операционным микроскопом. Через 4 ч после моделирования инсульта животным, находящихся в наркозе, производили ламинэктомию на уровне L₄–L₅ и интратекально вводили (1) 0,9% раствор натрия хлорида, (2) Ad5-GFP и (3) мононуклеарные клетки крови пуповины + Ad5-GFP. Выживание, адресную миграцию в очаг нейродегенерации, способность к синтезу рекомбинантного белка и эффективность влияния мононуклеарных клеток крови пуповины на площадь инфаркта оценивали с помощью люминесцентной микроскопии и морфометрического анализа.

Результаты. Через 3 нед после моделирования инсульта установлена экспрессия GFP в зоне очага инсульта, как после интратекального введения Ad5-GFP, так и после ксенотрансплантации мононуклеарных клеток крови пуповины, трансдуцированных Ad5-GFP *ex vivo*. При сравнении площадей инфаркта головного мозга через 3 нед после моделирования инсульта у животных в группе мононуклеарных клеток крови пуповины + Ad5-GFP медиана площади инфаркта была на 47,4% меньше, чем у животных, получивших инъекцию изотонического раствора натрия хлорида.

Вывод. Мононуклеарные клетки крови пуповины + Ad5-GFP после интратекального введения животным с ишемическим инсультом способны к адресной миграции в очаг нейродегенерации и синтезу рекомбинантного белка; результаты свидетельствуют о целесообразности доставки терапевтических генов в зону очага инсульта с помощью мононуклеарных клеток крови пуповины, сверхэкспрессирующих нейротрофические факторы.

Ключевые слова: ишемический инсульт, мононуклеарные клетки крови пуповины, генная терапия, экспериментальное исследование.

EXPERIMENTAL VALIDATION OF GENE THERAPY FOR ISCHEMIC STROKE

M.E. Sokolov, F.V. Bashirov, Z.Z. Safiullov

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Aim. To develop a protocol of direct and cell-mediated gene therapy for ischemic stroke.

Methods. Viral vector carrying green fluorescent protein (GFP) reporter gene was created on the basis of human adenovirus serotype 5 (Ad5). The umbilical blood supply was preserved according to instructions of Kazan State Medical University Stem cell bank. Umbilical cord blood mononuclear cells were isolated in a ficoll density gradient by standard procedure and transduced with Ad5-GFP. Ischemic cerebral stroke in rats was caused by distal occlusion of the middle cerebral artery through trephination hole in a temporal bone under surgical microscope. Within four hours after modeling stroke in the anesthetized animals laminectomy was performed at the L₄–L₅ level, and (1) 0.9% sodium