

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И. М. СЕЧЕНОВА (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ) МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Вотрин Сергей Владимирович

**Применение кровозамещающей эмульсии перфторуглеродов при
анемии у животных, вызванной острым внутрисосудистым
гемолизом**

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

03.03.01 – Физиология

Научный руководитель
доктор биологических наук, профессор
Воробьев Сергей Иванович

Научный консультант
доктор медицинских наук, профессор
Болевич Сергей Бранцевич

Пушино – 2021

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1. Характеристика анемии	12
1.2. Патолофизиологические особенности острой кровопотери и постгеморрагической анемии	19
1.3. Патолофизиологические особенности острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза	21
1.4. Особенности лечения острой постгеморрагической анемии.....	31
1.4.1. Трансфузия препаратов крови при острой постгеморрагической анемии.....	31
1.4.2. Компенсация утраченного объема циркулирующей крови коллоидными и кристаллоидными системами.....	34
1.5. Особенности лечения анемии при остром внутрисосудистом аутоиммунном гемолизе.....	36
1.6. Газотранспортные кровозамещающие препараты на основе перфторуглеродных эмульсий.....	38
1.6.1. Перфторорганические соединения – газотранспортные компоненты перфторуглеродных кровезаменителей	39
1.6.2. Перфторуглеродные кровезаменители.....	42
1.6.3. Физико-химические и биологические свойства перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан»	43
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	55
2.1. Группы животных, участвующих в исследованиях.....	55

2.2. Гематологический метод исследования.....	57
2.3. Биохимический метод исследования.....	61
2.4. Пульсоксиметрический метод исследования.....	64
2.5. Перфторуглеродная эмульсия – препарат «Перфторан».....	65
2.6. Эритроцитарная масса.....	66
2.7. Кровезамещающий коллоидный раствор – препарат «Стабизол».....	67
2.8. Кристаллоидный препарат раствор хлорида натрия 0,9 %.....	67
2.9. Статистическая обработка экспериментальных данных.....	68
Глава 3. Исследования острой кровопотери и постгеморрагической анемии у животных (кошка).....	69
3.1. Результаты исследований по коррекции острой кровопотери и постгеморрагической анемии у животных с помощью перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы.....	69
3.2. Обсуждения результатов исследований по острой кровопотере и постгеморрагической анемии у животных с использованием перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы.....	85
Глава 4. Исследования острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза у животных (собака).....	93
4.1. Результаты исследований по коррекции анемии у животных, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом с помощью перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы.....	93
4.2. Обсуждения результатов исследований по анемии у животных при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе	

с использованием перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы.....	113
Заключение.....	126
Выводы.....	133
Список сокращений и условных обозначений.....	135
Список литературы.....	137

Введение

Актуальность исследования

Несмотря на значительные успехи трансфузиологии, при лечении анемий различного генеза, вызывающих тяжелую гипоксию, специалисты часто сталкиваются с ятрогенными осложнениями в результате использования донорских эритроцитов, особенно при аутоиммунной анемии, сопровождающейся острым внутрисосудистым гемолизом.

Распространенность анемии в популяции людей очень большая, ежегодно на первичном приеме у врача выявляют около 5,5 млн случаев заболевания [81].

Аутоиммунная гемолитическая анемия, сопровождающаяся острым внутрисосудистым гемолизом, представляет собой ускоренное разрушение эритроцитов вследствие связывания белков клеточной мембраны с антителами и комплементом. Встречается с частотой 1–3 случая на 100000 населения ежегодно. Среди основных причин анемии рассматривают: дефицит железа – 29 %, хронические заболевания – 9 %, острое кровотечение – 18 %, дефицит витамина В₁₂ и фолиевой кислоты – 9 %, гемолиз – 18 %, другие причины – 17 % [73, 81].

При анемии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, помимо лечения основного заболевания, вызвавшего аутоиммунный процесс, для снятия жизненно угрожающей гипоксии применяют донорские эритроциты [51].

Но при остром внутрисосудистом аутоиммунном гемолизе происходит быстрое разрушение как собственных, так и донорских эритроцитов с выделением в плазму большого количества гемоглобина, не связанного с гаптоглобином, и тем самым свободный гемоглобин проявляет патологическое воздействие на почки, печень и другие органы. Следовательно, донорские эритроциты быстро разрушаются и не успевают оказать выраженного терапевтического эффекта, а образовавшийся свободный гемоглобин оказывает дополнительную патологическую нагрузку на печень и почки [1].

Донорские эритроциты при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе, попавшие в кровяное русло реципиента, сразу подвергаются аутоиммунной атаке и гибнут, не успевая произвести терапевтический эффект. Состояние больного дополнительно усугубляется за счет возрастающего непрямого билирубина [73].

Следует отметить, что в большинстве работ по лечению аутоиммунной гемолитической анемии коррекции гипоксии при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе, вызывающим аутоиммунную анемию, не уделяется должного внимания гемокорректору [1, 42, 54].

В настоящее время в биомедицинской практике, помимо донорской эритроцитарной массы, применяют препараты гемокорректоры на основе газотранспортных эмульсий перфторуглеродов, в том числе для коррекции гипоксии при тяжелой анемии [82, 95, 110].

Изучению вопросов по использованию различных перфторуглеродных эмульсий в биомедицине, в том числе и при коррекции гипоксии, посвящены работы ведущих отечественных ученых в данной области: Белоярцева Ф.Ф., 1980, 1984; Иваницкого Г.Р., 1983, 1994; Маевского Е.И., 1980, 1998, 2016; Воробьева С.И., 1984, 1994, 2020; Афолина Н.И., 1981. Изучение перфторуглеродных препаратов как кровезамещающих эмульсий рассмотрено также в работах Исламова Б.И., 1987; Кузнецовой И.Н., 1999; Склифас А.Н., 2000; Терёшиной Е.В., 2003 и других ученых.

Проведенные исследования отечественных авторов, в основном, были направлены на коррекцию гипоксии при острой кровопотере и ишемии органов и тканей. Вместе с тем актуальные вопросы по коррекции гипоксии при тяжелой аутоиммунной анемии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, до настоящего времени не были подробно изучены.

В связи с этим данная работа направлена на изучение острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза и выбор эффективного гемокорректора для купирования тяжелой гипоксии, возникшей вследствие данного патологического

процесса с использованием традиционно применяемой эритроцитарной массы и перфторуглеродной кровезамещающей эмульсии – препарата «Перфторан».

Вышеизложенное обусловило выбор темы, формулирование цели и задач исследования.

Цели и задачи исследования

Основная цель исследования – коррекция гипоксии, вызванной острой кровопотерей и острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом у животных с помощью перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массой.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

- 1) изучить патогенез анемии, вызванной острой кровопотерей и острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом у животных;
- 2) оценить клиническую и газотранспортную эффективность применения перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» в сравнении с донорскими эритроцитами при анемии, вызванной острой кровопотерей и острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом у животных;
- 3) выявить возможные побочные реакции при использовании перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» и донорских эритроцитов у животных при анемии, вызванной острой кровопотерей и острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом.

Научная новизна работы

1. Впервые проведен сравнительный анализ экспериментальных данных, полученных при коррекции анемии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, с использованием донорской эритроцитарной массы и перфторуглеродной эмульсии «Перфторан».
2. Впервые установлено, что использование перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» в качестве гемокорректора при инвазионной трансмиссивной болезни животных – бабезиозе, осложненном тяжелой анемией, вызванной

острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, более эффективно, чем эритроцитарной массой, и не сопровождается усилением внутрисосудистого гемолиза.

3. Впервые показано, что применение донорской эритроцитарной массы при бабезиозе, осложненном тяжелой анемией, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, вызывает сильный побочный эффект в виде усиления внутрисосудистого гемолиза и гипербилирубинемии, приводящих к дополнительному поражению печени и почек у животных, что резко увеличивает летальность, несмотря на проведенное этиотропное лечение.
4. Разработана новая методическая схема применения перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» при коррекции анемии, вызванной острой кровопотерей и острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом у животных, позволяющая уменьшить летальность при данных тяжелых патологических состояниях.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость полученных результатов определяется возможностью дальнейшего более подробного изучения патогенеза острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза на экспериментальных животных и, следовательно, разработки эффективных терапевтических действий для купирования гипоксии при данном патологическом состоянии, в том числе перфторуглеродными эмульсиями типа препарата «Перфторан».

Практическая значимость диссертационного исследования

1. Разработаны рекомендации и методы по использованию перфторуглеродных эмульсий типа препарата «Перфторан» для купирования гипоксии при анемии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом.
2. На основании проведенных исследований разработан регламент по использованию перфторуглеродных эмульсий типа препарата «Перфторан» у

- животных, что позволило эффективно применять газотранспортные эмульсии при анемиях различного генеза.
3. Разработаны рекомендации по противопоказаниям использования донорских эритроцитов при острой стадии аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза.
 4. На основании проведенных исследований разработаны рекомендации по безопасности применения перфторуглеродных эмульсий типа препарата «Перфторан».
 5. Рассмотренные в диссертационной работе маркеры гипоксических состояний при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе могут быть использованы в клинической медицине с целью усовершенствования диагностических мероприятий для оценки тяжести данного патологического состояния, а также контроля эффективности терапии.
 6. Проведенная работа является примером для составления алгоритмов лечения кровопаразитарных патологий, сопровождающихся острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом.
 7. Материалы диссертационной работы используются при проведении лекционных и лабораторно-практических занятий со студентами Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова.

Методология и методы исследования

В работе используются общие методы научного познания: наблюдение, сравнение, измерение, эксперимент, анализ и синтез полученных данных. Создано два блока экспериментальных ретроспективных исследований с параллельным контролем по применению перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» при острой постгеморрагической анемии. Для исследования животных (собак и кошек) в экспериментальных группах применяли следующие методы: гематологический, биохимический, пульсоксиметрический. Также использовались статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Коррекция анемии, вызванной острой кровопотерей и постгеморрагической анемией у животных с помощью перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» и донорской эритроцитарной массой.
2. Коррекция анемии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом у животных, с помощью перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» и донорской эритроцитарной массой.
3. Клиническая и газотранспортная эффективность перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» на фоне острой кровопотери и острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза у животных в сравнении с донорской эритроцитарной массой.
4. Побочные реакции при использовании перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы у животных при анемии, вызванной острой кровопотерей и острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом.

Апробации результатов и публикации

Результаты диссертации представлены, обсуждены и одобрены на:

- 1) V Всероссийской с международным участием студенческой научно-образовательной конференции, посвященной 75-летию РязГМУ, «Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования» 27.04.2018, Рязань;
- 2) VIII международном конгрессе по патофизиологии «Оксидативный стресс в здоровье и болезни: от фундаментальных наук к прикладным исследованиям» 03.09.2018, Сербия.

По материалам диссертации опубликовано десять научных работ, в которых отражены основные положения диссертационного исследования, из них три – в ведущем рецензируемом научном журнале, включенном в перечень Scopus, одна работа опубликована в научном журнале, индексируемом в Международной базе

Web of Science, две работы – в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК.

Личный вклад автора

Вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования; автором лично проведены сбор, обработка и анализ полученных данных. Автору принадлежит ведущая роль в презентации полученных результатов в научных публикациях, докладах и внедрении их в практическую деятельность.

Структура и объем работы

Рукопись диссертационной работы изложена на 147 страницах и состоит из 4-х глав, список литературы включает 123 публикации. Работа иллюстрирована 17 таблицами, 32 рисунками.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Характеристика анемии

Достижения отечественной клинической гематологии за последнее время являются ярким примером прогресса биологической и медицинской науки. Возможность излечения, увеличения продолжительности и улучшения качества жизни пациентов при гематологических заболеваниях обусловлена внедрением в медицинскую практику передовых биофизических разработок. Для эффективного лечения патологического процесса необходимо понимание его патофизиологических особенностей и знание физико-химических свойств препаратов, используемых для лечения.

Анемия – состояние, характеризующееся уменьшением содержания в крови эритроцитов и гемоглобина в них. Анемический синдром может развиваться и при нормальном числе эритроцитов, но низком количестве гемоглобина в красных клетках крови, поскольку именно с этим веществом связан транспорт кислорода и развитие гипоксии как основного патогенетического звена анемии [1, 37].

Этиологические факторы анемии разнообразны. Они могут быть врожденными, приобретенными, но вне зависимости от причины возникновения и патогенеза общим для всех анемий является снижение содержания эритроцитов и гемоглобина в них, в единице объема крови и, как следствие этого, снижение кислородопереносящей функции крови с развитием гипоксемии и гипоксии [54, 85].

Анемия является не самостоятельным заболеванием, а симптомокомплексом, который сопровождает многие физиологические и патологические процессы. Относительно редко анемия вызывается первичными заболеваниями кроветворной системы. Диагноз, дифференциальный диагноз, прогноз и лечение анемий основываются на тщательном общем клиническом обследовании, дополненном специальной анамнестической информацией, оценкой состояния

эритроцитарной и лейкоцитарной систем и биохимического состава плазмы крови. В некоторых случаях требуются специальные исследования, такие как исследование красного костного мозга и др. [51, 118].

Симптомы анемии обусловлены снижением транспорта кислорода к тканям, уменьшением объема крови, компенсаторными механизмами организма, например, уменьшением времени кровообращения и перераспределения крови. Очень важно не забывать и выделять симптомы основного заболевания, которые могут влиять на комплекс клинических признаков, сопровождающих анемию и, в свою очередь, могут служить для прояснения причины анемии. Например, увеличение лимфатических узлов, встречающееся при анемиях вследствие лимфосаркомы или инфекций [68, 70]. Кроме неспецифических симптомов, таких как слабость или утомляемость, которые зависят от степени тяжести, течения и длительности анемии, существуют специфические симптомы, такие как кровотечения или желтуха, которые могут указывать на патогенез анемии [73, 79, 91].

Из анамнеза можно выяснить данные о длительности и причинах анемии. Неожиданный коллапс, резкая слабость, учащенное дыхание и одышка говорят об острой анемии. Неопределенные, постепенно появляющиеся симптомы, такие как утомляемость, уменьшение функциональных способностей, анорексия, одышка при нагрузках, характерны для хронической анемии [89, 93].

Симптомы первичных заболеваний служат для выяснения типа анемии. Скрытые кровотечения выявляются часто путем обнаружения крови или паразитов в кале. Нарушение свертываемости крови проявляется в виде кровоизлияний в кожу или слизистые оболочки. Желтоватая окраска слизистых оболочек, температура, спленомегалия и гепатомегалия указывают на увеличение распада эритроцитов, а коричнево-желтая моча указывает на гемоглобинурию вследствие ОАИВСГ [42, 67].

Значение гематокрита, результаты исследования клинического анализа крови и ее биохимического состава необходимы для объективной оценки степени тяжести анемии и выяснения ее типа и причин (таблица 1) [43, 73].

Таблица 1. Данные эритроцитарного дифференциального мазка крови при анемии (приведено по Шиффман Д.Ф., 2017) [73]

Изменения		Цвет внутренней структуры	Возможное значение
Размеры и/или форма			
Анизоцитоз (различные величины)	Умеренный	Нормохромный	Норма
	Выраженный	Полихромазия (различные цвета)	Активное кровотоечение
	Выраженный	Гипохромный	Нарушение кроветворения
Макроцитоз		Полихромазия	Активное кровотоечение
Мегалобластемия		Нормохромный	Торможение созревания эритроцитов (недостаток фолиевой кислоты или В ₁₂)
Микроцитоз и анизоцитоз		Нормохромный или гипохромный	Торможение созревания эритроцитов (недостаток фолиевой кислоты или В ₁₂)
Пойкилоцитоз (полиморфизм)	со сфероцитозом и анизоцитозом	Полихромазия	Аутоиммунный гемолиз
	с фрагментоцитами	Нормохромный или полихромазия	Коагулопатия потребления, опухоли
	с анизоцитами	Нормохромный	Ангиопатия, опухоли
	с мегалобластами	Гипохромный	Костномозговая опухоль
Нормоцитоз		Нормохромный	Начальная стадия многих анемий, нерегенеративные анемии. После удаления селезенки, заболевания печени, искусственные вещества, отравление, реакция на медикаменты
Количество мишеневидных эритроцитов сильно увеличено		Внутренние тельца (денатурированный гемоглобин) тельца Хауэлла – Жолли	После удаления селезенки, эритропоэз, эритролейкемия

Анемии классифицируются по степени тяжести, течению (острому или хроническому), морфологическим критериям эритроцитов, патогенезу и эритроцитарной кинетике (регенеративной или нерегенеративной). Уже взятие и обработка проб крови могут выявить указывающую на гемолитическую анемию спонтанную агглютинацию эритроцитов (агглютинация эритроцитов в виде монетных столбиков указывает на развитие ОАИВСГ) [73, 96].

Степень тяжести анемии определяется значением гематокрита [51]:

- легкая анемия 30–36 %,
- средняя анемия 21–29 %,
- тяжелая анемия < 20 %.

Анемии классифицируются в зависимости от данных общего клинического анализа крови следующим образом:

- по количеству эритроцитов (нормоцитарная, микроцитарная или макроцитарная анемия),
- по содержанию гемоглобина (нормохромная, гипохромная или гиперхромная анемия) [42, 52].

Микроскопия мазка крови имеет очень важное диагностическое значение при лечении анемии и позволяет не только точно определить вид анемии, но и установить причину ее развития [5, 103].

При микроскопии мазка крови эритроциты оценивают с точки зрения отличия размеров (анизоцитоз), различия окраски (полихромазия), агглютинации, наличия ядер (нормобластия), базофильной зернистости, наличия остатков форменных элементов крови (ретикулоциты), внутренних телец (содержащих гемоглобин зерен), атипичности формы (сфероцит или фрагментоцит) и наличия телец Жолли (остатки ядер) или возможного наличия паразитов крови. Также обращают внимание на нормальное соотношение между количеством тромбоцитов и эритроцитов (1:20) и на наличие гигантских тромбоцитов [17, 98].

Тромбоциты различной величины и формы указывают на наличие их усиленного дополнительного образования. Если тромбоциты не обнаружены, необходим непосредственный подсчет тромбоцитов в лаборатории [5].

Лейкоциты имеют особое значение при гемолитической или апластической анемии и для выяснения причин основного заболевания [73, 94].

Обычно распад и образование эритроцитов находятся в состоянии равновесия. Если это равновесие нарушается из-за повышенных потерь или более короткой продолжительности жизни Эр (усиленного распада или уменьшенного

образования эритроцитов), возникает анемия [42]. В соответствии с патогенезом различают следующие виды анемий:

- постгеморрагические анемии, которые возникают в результате повышения проницаемости сосудов, повреждения стенок сосудов или нарушений коагуляции [45, 107];
- гемолитические анемии в результате увеличенного распада Эр как в сосудистом русле (внутрисосудистый гемолиз), так и в СМФ (внесосудистый гемолиз) [1];
- анемии в результате нарушения образования эритроцитов в костном мозге;
- мультифакторные анемии, возникающие в результате нескольких причин [54].

Исходя из кинетики эритроцитов, анемии разделяют на:

- *регенеративные анемии*, в процессе которых происходит увеличенное разрушение Эр (гемолиз) или хроническая потеря Эр во внешнюю среду или ткани. Регенеративная анемия компенсируется усиленной деятельностью костного мозга [73];
- *нерегенеративные, или гипорегенеративные, анемии*, при которых образование Эр в костном мозге, их созревание и выделение в сосудистое русло недостаточно [51];
- *смешанные анемии*, при которых потери, разрушения или сокращенная продолжительность существования эритроцитов объединены с функциональной недостаточностью костного мозга [1].

Ускоренное оседание Эр может свидетельствовать о воспалительных процессах, распаде ткани и определенных формах анемии. Хотя, ввиду одновременного влияния ускоряющих и замедляющих факторов, может симулироваться нормальная реакция, ускоренное оседание эритроцитов тем не менее всегда свидетельствует о патологии [5, 44].

Биохимический состав плазмы крови может отражать патогенез, стадию развития, как первичного заболевания, так и анемии, с ним связанной [21].

Последующий перечень содержит важнейшие показатели, которые необходимы для диагностики анемии: уровень белка плазмы, билирубина, креатинина, щелочной фосфатазы, АЛТ, АСТ, возможно и холестерина [5, 20].

Патогенетическое разграничение анемий проводится посредством подсчета ретикулоцитов, полихромазии, анизоцитоза и других морфологических изменений эритроцитов [60, 92].

Ретикулоциты – молодые полихроматические безъядерные эритроциты в момент появления в кровеносной системе. Количество ретикулоцитов определяется по отношению к 100 эритроцитам, т.е. в процентах, и составляет в норме 0 – 2 %. Их процентное содержание в крови является индикатором активности костного мозга. Активность костного мозга может быть исследована посредством биопсии. При регенеративной анемии количество ретикулоцитов повышается как следствие укороченного времени созревания и раннего перехода в кровеносную систему приблизительно через 72 ч после появления анемии и достигает максимума через 5–7 дней, при мультифакторных заболеваниях позже. Количество ретикулоцитов может быть оценено на основании полихромазии эритроцитов в мазке, т.к. между полихромазией и количеством ретикулоцитов существует прямая связь. Поскольку количество ретикулоцитов вычисляется как процентная доля от количества эритроцитов, то данное значение зависит от степени тяжести анемии [5].

Для выяснения патогенеза анемии учитываются также такие показатели для эритроцитов, как гематокрит, количество эритроцитов и их морфологические изменения (таблица 2) [73].

Таблица 2. Значение нормобластов (приведено по Шиффман Д.Ф., 2017) [73]

Количество нормобластов на 100 лейкоцитов	Другие критерии	Возможное значение
Слегка увеличено (2–4)	Полихромазия и анизоцитоз	Активное кроветворение после внутреннего кровоизлияния
Существенно увеличено	Без полихромазии и без анизоцитоза	Анемия с уменьшенной активностью костного мозга, экстрамедуллярное кроветворение, опухоли
Существенно увеличено (10–100)	Полихромазия, сфероциты, анизоцитоз	Аутоиммунная гемолитическая анемия
Существенно увеличено (5–80)	Полихромазия, анизоцитоз, базофильная зернистость	Гемангиосаркома

При полном прекращении кроветворения гематокрит падает на 2–8 % в неделю. Большое падение гематокрита указывает на дополнительную кровопотерю или гемолиз. Чтобы избежать ошибок, гематокрит всегда следует рассматривать вместе с содержанием белка в плазме и клиническим коэффициентом обезвоживания (учет возрастания гематокрита из-за обезвоживания). Важное диагностическое значение имеет цвет отстоявшейся плазмы в гематокритных пробирках. Так, бесцветная плазма свидетельствует о нарушении образования эритроцитов, недостатке железа. Мутная, опалесцирующая плазма говорит о липидемии. Вишнево-красная или желтушная плазма является характерным признаком гемолиза [5, 112].

Нормобласты, содержащие ядра, являются предшественниками эритроцитов, и их относительное количество имеет важное диагностическое значение. Данные клетки появляются в большом количестве в периферийной крови при перегрузке костного мозга, при этом активизируется функция экстрамедуллярного кроветворения печени и селезенки. Нормобласты подсчитываются вместе с лейкоцитами, т.к. они имеют ядро, и распознаются только при дифференцированном окрашивании мазков крови, выражаются в процентном отношении к количеству лейкоцитов [5, 17].

В таблице 2 перечислены некоторые причины увеличения количества нормобластов. Важно, находится ли количество нормобластов в рамках допустимого, например, при уже существующей анемии. Если нет, то возможно нарушение костномозгового барьера или экстрамедуллярного кроветворения [66].

Основные положения лечения анемий включают в себя проведение симптоматической терапии (переливание крови, смягчение последствий анемии) и устранения основного заболевания. Во многих случаях пытаются посредством комбинации лечебных факторов ускорить или улучшить кроветворение. При тяжелых анемиях ($Ht < 15\%$ – это экстремальные случаи), как правило, требуется принятие неотложных мер (трансфузии препаратов крови). При легких, средних и хронических анемиях имеется достаточно времени для выяснения причин их возникновения и, как правило, осуществляют этиотропную и симптоматическую терапию [51, 71].

Целью симптоматического (паллиативного) лечения является преодоление тяжелой ситуации, которая складывается в результате недостаточного поступления кислорода и/или гиповолемии. В этом случае важнейшими симптоматическими методами лечения являются обогащение кислородом посредством кислородной ингаляции, а также использования кристаллоидов и коллоидов. При этом симптоматическое терапевтическое воздействие оказывают тишина, покой, температурный режим в помещении, легкая, питательная пища, введение витаминов наряду с общеукрепляющими средствами [48, 51].

1.2. Патофизиологические особенности острой кровопотери и постгеморрагической анемии

Лечение кровопотери и ее последствий остается важнейшей медицинской проблемой. Некомпенсированная кровопотеря занимает второе место по смертности людей от 5 до 44 лет, уступая только черепно-мозговой травме. Компенсировать острую кровопотерю и ее последствия приходится врачам практически любой специальности, следовательно, им необходимо иметь четкие представления о патогенезе острой постгеморрагической анемии (ПГА)

[54, 116]. Острая ПГА развивается при массивной наружной кровопотере более чем 20 % от объема циркулирующей крови (ОЦК), снижении гематокрита (Ht) менее 25 – 27 % и концентрации гемоглобина (Hb) ниже 70–80 г/л на фоне циркуляторных нарушений [51].

Как правило, данный патологический процесс является частым последствием травм и оперативных вмешательств. При развитии тяжелой острой ПГА адаптационные механизмы не успевают развиваться: соответственно, клинические проявления, как правило, сильнее, чем при заболевании той же степени тяжести, но имеющем хроническое течение [73, 115].

При развитии острой ПГА различают следующие стадии:

1. Стадия сосудистого коллапса. Она возникает сразу после кровопотери и длится около 24 ч после прекращения кровотечения. На этой стадии в клинической картине доминируют симптомы коллапса, а картина общего клинического анализа крови в этот период практически не отличается от нормы, поскольку при остром обширном кровотечении снижение количества эритроцитов в крови обусловлено равномерным уменьшением как плазмы, так и форменных элементов. Адаптационным фактором в течение этой стадии является спазм периферических сосудов [51, 66].

2. Гидремическая стадия. Уменьшение ОЦК ведет к восстановлению количества плазмы в сосудистой системе, и, соответственно, тканевая жидкость переходит в сосудистую систему; возникшая жажда, наряду с уменьшением диуреза, развивающегося вследствие задержки натрия в организме под влиянием выброшенного надпочечниками альдостерона, приводит к увеличению количества жидкости в сосудистом русле. Происходит также выход в кровь эритроцитов из депо. Гипоксия, возникшая в результате кровопотери, способствует образованию и выделению эритропоэтина, что стимулирует эритропоэз. Данная стадия длится 2–3 дня [51, 56].

3. Ретикулоцитарная стадия. Происходит усиление эритропоэза, о чем говорит значительное увеличение в единице объема крови ретикулоцитов. Поскольку

увеличение количества ретикулоцитов происходит достаточно быстро, эту стадию называют ретикулоцитарным кризом, который длится до двух недель [42].

4. Стадия восстановления. В результате ретикулоцитарного криза нормализуется гемоглобинизация эритроцитов. Продолжается усиленный эритропоэз и существенно увеличивается количество эритроцитов и гемоглобина. На стадии восстановления также стимулируется лейкопоэз, что приводит к небольшому лейкоцитозу [65, 89].

Гипоксия оказывает на больной организм более тяжелое воздействие в гидремическую стадию, т.к. эритроцитарные резервы истощены. Ключевыми факторами здесь выступают ишемия и перестройка клеточного метаболизма. При истощении компенсаторных резервов резко снижается доставка кислорода к тканям. При ишемии высвобождаются медиаторы воспаления и недоокисленные продукты обмена, которые воздействуют на миокард, снижая сердечный выброс, что в итоге усугубляет вазоконстрикцию. Когда истощаются резервы сосудистого русла, геморрагический шок становится необратимым. Таким образом, ишемия тканей и, как следствие, их аноксия являются важнейшими аспектами патофизиологии кровопотери. В данном случае интенсивная терапия при внешней кровопотере опирается на показатели кислородного баланса, он оценивается по изменениям кислотно-основного состояния венозной крови и уровню метаболитов (лактата, пирувата) [54, 108].

1.3. Патофизиологические особенности острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза

Острый аутоиммунный внутрисосудистый гемолиз – это разновидность острого патологического гемолиза, характеризующаяся разрушением эритроцитов в сосудистом русле под влиянием антител и комплимента. Это быстроразвивающийся аутоиммунный (АИ) процесс, при котором компенсаторные силы организма не успевают в полной мере включиться, чтобы эффективно осуществить лечение больного при данном патологическом

состоянии, необходимо детально и глубоко разобраться в патогенезе и причине возникновения ОАИВСГ [1, 64].

Острый аутоиммунный внутрисосудистый гемолиз приводит к возникновению тяжелой АИ анемии, вследствие чего возникает острая гипоксия, коррекция последней зависит от тяжести анемии и причин возникновения ОАИВСГ. Частой причиной возникновения аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА) являются инфекции. Токсины, бактериальные продукты могут вызывать прямое поражение эритроцитарной мембраны, что наблюдается при эндокардитах и сепсисах, вызванных стрептококком, стафилококком, энтерококком [36]. Тяжелый внутрисосудистый гемолиз возникает в результате прямого поражения Эр такими микроорганизмами, как малярийный плазмодий, бабезия, бартонелла [73, 100].

Аутоиммунная гемолитическая анемия вызывается иммунным лизисом Эр и может сопровождаться как внутрисосудистым, так и внесосудистым гемолизом. Острый аутоиммунный внутрисосудистый гемолиз возникает в результате атаки эритроцитарных антигенов (АГ) антителами – иммуноглобулином (Ig) М и комплемент-фиксированным Ig G, которые активируют комплемент, что приводит к связыванию C-5-9 компонентов комплемента (комплекс мембранной атаки). Данный патологический процесс приводит к появлению каналов на мембране Эр. Через эти каналы проникает вода, в результате чего развивается внутрисосудистый осмотический гемолиз [1, 33]. Это вызывает гемоглобинемию, и появляется гемоглобинурия, т.к. свободный гемоглобин выводится почками. Эти два признака являются критическими для диагностики ОАИВСГ [1, 105]. Характерные лабораторные признаки при ОАИВСГ могут также включать пониженный гематокрит, пониженный гаптоглобин, повышенный уровень лактатдегидрогеназы и присутствие в плазме гемоглобина. Билирубин сыворотки обычно повышается позже, через 6–12 ч [1, 106].

Тяжелые клинические симптомы шока, гипотензии и бронхоспазма, обнаруживаемые при ОАИВСГ, развиваются в ответ на активацию системы комплемента, анафилотоксинов C3a и C5a и других медиаторов воспаления [67]. К тому же происходит ишемия почек, которая может быть причиной тубулярного некроза и развития острой почечной недостаточности. Связывание оксида азота свободным гемоглобином усиливает почечную ишемию. Оксид азота известен как расслабляющий фактор, вазодилататор. Активность оксида азота регулируется эндотелином – потенциальным вазоконстриктором. Связывание оксида азота таким образом способствует почечной вазоконстрикции, тубулярному некрозу и почечной недостаточности. Может также развиваться каскад коагуляционных реакций, инициирующий диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС). Клинические симптомы в значительной степени относятся к активации сети цитокинов, включающих провоспалительные цитокины интрелейкина-1 (IL-1), IL-6, IL-8, и фактора некроза опухоли – альфа (TNF- α), которые вызывают лихорадку, гипотензию, активацию белых клеток и каскад реакций системы свертывания [73].

Важное патогенетическое значение при ОАИВСГ имеет метаболизм билирубина. В результате внутрисосудистого гемолиза освобожденный гемоглобин соединяется с гаптоглобином, который синтезируется в печени. Данный комплекс стабилен, переносится с током крови в печень, где гаптоглобин отщепляется, а Hb метаболизируется по стандартному пути. Когда количества гаптоглобина недостаточно (синтез гаптоглобина нарушается, когда деструкция Эр увеличивается в 2 раза и более по сравнению с нормой), гемоглобин в плазме крови остается несвязанным и проникает через почечный фильтр. Происходит десквамация почечного эпителия, наблюдается гемоглобинурия, моча окрашивается в красный цвет (рисунок 1) [1, 53].

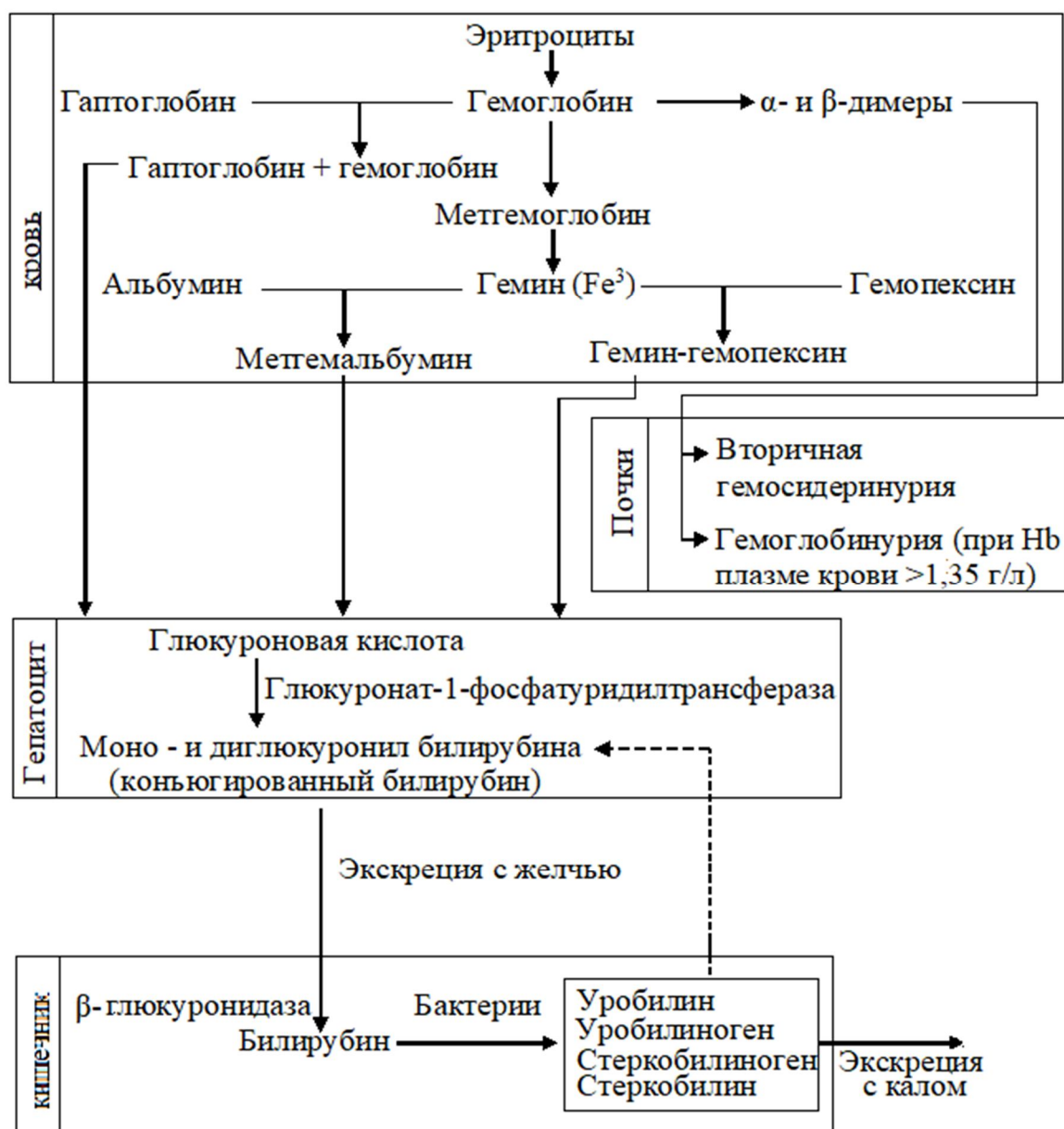


Рисунок 1. Катаболизм гема и метаболизм билирубина при внутрисосудистом гемолизе (приведено по Алексееву Н.А., 2004) [1]

Необходимо понимать и знать отличительные особенности катаболизма гема- и метаболизма билирубина при внутрисосудистом и внесосудистом гемолизе, что позволит, назначая лечение при АИГА, избежать необоснованной терапии и своевременно осуществить коррекцию острого патологического состояния [1, 19].

Уровень билирубина является диагностическим и прогностическим критерием при гемолитических анемиях. Метаболизм билирубина в организме при физиологическом и патологическом состоянии сильно отличается. В здоровом

организме разрушение старых Эр происходит преимущественно по пути внесосудистого гемолиза [1] (рисунок 2).

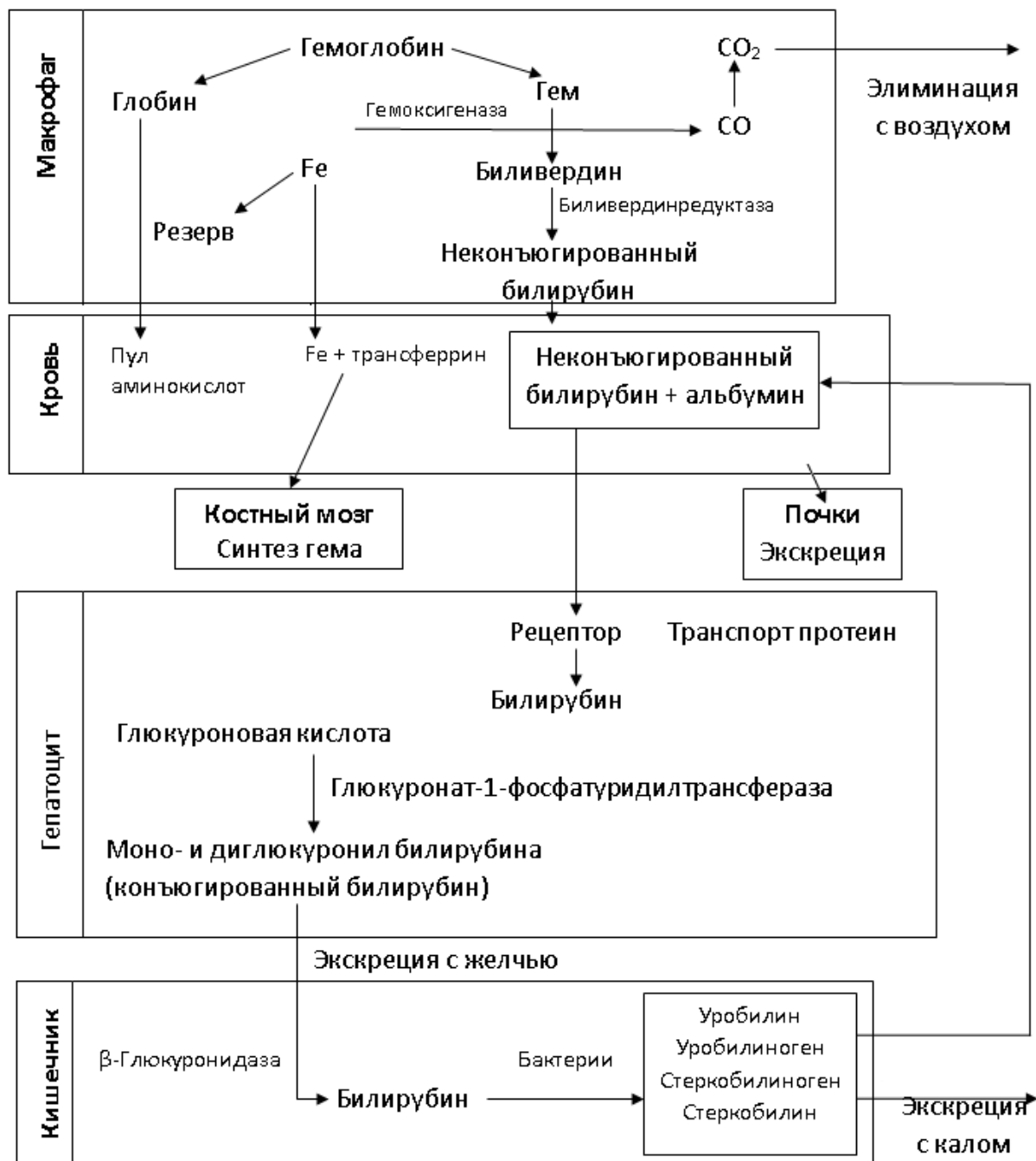


Рисунок 2. Катаболизм гема и метаболизм билирубина при внесосудистом гемолизе (приведено по Алексею Н.А., 2004) [1]

Гемолиз – это необратимый процесс разрушения Эр. При физиологическом состоянии 80–90 % разрушения Эр происходит путем внесосудистого гемолиза и только 10–20 % – внутри кровеносных сосудов [73, 104].

Срок жизни Эр у взрослых людей в физиологическом состоянии в среднем 120 дней. При старении Эр изменяется его морфология в виде нарушении структуры эритроцитарной мембраны и, как следствие, снижения деформабельности клетки в целом [84, 88]. Необходимо обратить внимание, что разрушение измененных эритроцитов на 80–90 % протекает внесосудисто, в клетках системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) селезенки, печени и костного мозга. Разрушение эритроцитов в физиологических условиях в СМФ происходит без выделения гемоглобина в плазму крови [18, 30, 97].

Гемолиз – это постоянно протекающий процесс у здорового человека, в результате чего старые эритроциты замещаются новыми [87]. Ежедневно происходит разрушение около 1 % от всех эритроцитов, при этом высвобождается 6–8 г гемоглобина и связанного с ним железа до 30 мг. Глобиновая часть Нб, подвергнувшаяся гидролизу с образованием аминокислот, пополняет общий пул метаболитов. Гемовая часть Нб переходит в билирубин. Гем оседает в клетках СМФ, предварительно отделившись от глобина. Железо, освобожденное из гема, поступает в кровь и используется эритроидными клетками для синтеза гемоглобина, небольшая часть железа откладывается в макрофагах в виде ферритина и гемосидерина [1, 85].

Неконъюгированный билирубин, образующийся в макрофагах, выделяется в плазму, где, связавшись с альбумином, переносится в печень. В организме в физиологическом состоянии большая часть билирубина связана с альбумином, и только небольшое количество билирубина находится в несвязанном состоянии в плазме крови [50]. При патологическом гемолизе в плазме резко возрастает уровень несвязанного свободного билирубина – это является важным диагностическим критерием. Неконъюгированный билирубин более прочно связан с альбумином по сравнению с конъюгированным. При желтухах, сопровождающихся увеличением неконъюгированного билирубина, эта несвязанная с альбумином фракция фильтруется через сосуды клубочков почек и обратно, не реабсорбируясь в проксимальных канальцах, вследствие чего возникает билирубинурия. Когда желтуха сопровождается увеличением

содержания конъюгированного билирубина в плазме крови, то он не может экскретироваться мочой и очень медленно исчезает из плазмы крови, период полувыведения конъюгированного билирубина составляет 12–14 дней. Переносчиками неконъюгированного билирубина из плазмы крови в печень, помимо альбумина, могут быть Эр и некоторые липопротеины. Данный тип переноса билирубина наблюдается при гипербилирубинемии и гипоальбуминемии [1, 63].

Неконъюгированный билирубин доставляется в гепатоциты плазмой крови путем пассивной диффузии через мембрану синусоидов. Процесс захвата билирубина гепатоцитами обусловлен некоторыми белками. В цитоплазме гепатоцита билирубин взаимодействует с лигандами так, что они могут передавать билирубин от мембраны к мембране. Большая часть водорастворимого конъюгированного билирубина попадает в желчь. При нарушении элиминации конъюгированного билирубина с желчью он попадает в кровь и вызывает желтуху. Конъюгированный билирубин, попавший в просвет тонкой кишки вместе с желчью, под действием ферментов и бактерий гидролизуется. После гидролиза билирубин может реабсорбироваться и таким образом пройти энтерогепатогенный цикл. При попадании в толстую кишку под действием кишечных бактерий происходит поэтапный процесс образования уробилиноидов. Часть образовавшихся уробилиноидов может реабсорбироваться и снова войти в энтеропеченочный цикл, но небольшая часть уробилина экскретируется мочой [1, 42].

Эр разрушаются в клетках СМФ (80–90 %) с образованием билирубина, а 10–20 % стареющих Эр в физиологических условиях разрушаются в сосудистом русле. Данный процесс называется внутрисосудистым гемолизом. При внутрисосудистом гемолизе эритроциты, разрушаясь в текучей крови, выделяют в нее гемоглобин, который соединяется с гаптоглобином, образуя комплекс гемоглобин-гаптоглобин. Данный комплекс стабилен и переносится с током крови в печень, где происходит отщепление гаптоглобина от гемоглобина с последующим метаболизмом Нв по пути, описанному выше, как при внесосудистом гемолизе [50, 104].

Так как размер комплекса гаптоглобин-гемоглобин большой, он не проникает через сосуды клубочков почек и сохраняет железо для организма [1]. Если количество гаптоглобина недостаточно, например, при патологическом нарушении синтеза гаптоглобина, то гемоглобин в плазме крови остается несвязанным и проникает через почечный фильтр после диссоциации молекулы гемоглобина на альфа- и бета- димеры. Они реабсорбируются и катаболизируются клетками почечных канальцев с образованием депо железа. Возникает гемосидеринурия вследствие десквамации почечного эпителия. Если порог содержания Нб в плазме превышает 1,35 г/л, то наблюдается гемоглабинурия, и моча становится красного цвета. Снижение содержания гаптоглобина в плазме крови происходит, когда деструкция Эр увеличивается в два раза и более по сравнению с нормой. Увеличение содержания Нб в плазме наблюдается при инфекционных и воспалительных заболеваниях, злокачественных новообразованиях, терапии кортикостероидами [89, 100].

Свободный гемоглобин в плазме крови может быть элиминирован и другими путями. После аутоокисления в метгемоглобин и диссоциации на глобин и гемин последний может фиксироваться гемопексином или непосредственно альбумином. В организме имеется физиологическое равновесие между количеством разрушившихся и вновь образующихся Эр. Но при определенных патологических состояниях продолжительность жизни Эр уменьшается, и они преждевременно разрушаются. В ответ на гипоксию, при патологическом гемолизе увеличивается продукция эритропоэтина, что повышает скорость образования Эр в 2–3 раза (максимально в 6–8 раз). У здоровых людей (исключая детей периода новорожденности и первых месяцев жизни) содержание ретикулоцитов в периферической крови составляет 0,5–1,5 %, но более ценным показателем наличия гипергемолиза является определение абсолютного количества ретикулоцитов – в норме их число составляет $(50—120) \times 10^9/\text{л}$. Повышение количества ретикулоцитов свыше $150 \times 10^9/\text{л}$ указывает на гемолитическую анемию (ГА). Если число ретикулоцитов повышено, а количество Эр в пределах нормы, это говорит о компенсированном гемолизе [1, 88].

ОАИВСГ лежит в основе патогенеза кровопаразитарных заболеваний человека, таких как малярия и бабезиоз. Особенно ярко ОАИВСГ проявляет свое патологическое действие при осложненном бабезиозе человека и собак. При этом заболевании происходит прямое поражение эритроцитов гемопаразитами, а их токсины вызывают тяжелый острый аутоиммунный процесс, проявляющийся в виде внутрисосудистого гемолиза [89].

Патогенез ОАИВСГ при бабезиозе человека и бабезиозе собак имеет много общего. Но у людей это редко встречаемая патология. У собак данное заболевание встречается часто, поэтому собака может рассматриваться как экспериментальная модель для изучения особенностей ОАИВСГ [42, 98].

Бабезиоз – это трансмиссивное кровопаразитарное заболевание, передаваемое иксодовыми клещами; распространено повсеместно. Хотя частым признаком и является гемолитическая анемия, случаются также и другие вариации течения болезни [100].

Возбудителем бабезиоза собак являются интро эритроцитарные простейшие *Babesia canis* или *Babesia gibsoni*. Возбудителем бабезиоза у человека: *Babesia divergens* и *Babesia rodhaini* – в Европе, *Babesia microti* – в Америке. Первый случай бабезиоза у человека в Европе был диагностирован в 1956 г. Позднее бабезиозы человека были обнаружены и в других странах Азии, Америки, Африки [98].

Бабезиоз часто осложняется ОАИВСГ и отличается тяжелым течением. Без своевременного лечения заражение *Babesia divergens* нередко ведет к гибели пациента. Но даже при интенсивном лечении смертность при бабезиозе, осложненном анемией в результате ОАИВСГ, близка к 50 % [89].

Бабезиоз собак – это сезонное заболевание, большинство случаев заражения происходит в весенне-летние месяцы. Способ заражения – укус инвазированного клеща. Другой способ заражения – переливание крови [42, 51].

Инкубационный период после укуса клеща составляет 2–21 день. Внутрисосудистая паразитемия является причиной как внутрисосудистого, так и внесосудистого гемолиза, который становится причиной развития регенераторной

анемии, гемоглобинемии, гемоглобинурии и билирубинурии. Также появляется гипертермия, которая является результатом выделения эндогенных пирогенов в результате гемолиза Эр, разрушения паразитов и/или активации медиаторов воспаления. Спленомегалия появляется как результат гиперплазии системы мононуклеарных фагоцитов. Гемолитический кризис вызывает анемическую гипоксию, анаэробный метаболизм и метаболический ацидоз [29, 89].

Бабезиоз может быть классифицирован на неосложненную и осложненную форму. Осложненные формы обычно представлены признаками гемолиза, включая лихорадку, анорексию, угнетенное состояние, бледность слизистых, спленомегалию и учащенный пульс. По степени тяжести осложненную форму также можно поделить на легкую, среднюю и тяжелую в зависимости от степени анемии. Случай легкого осложненного бабезиоза может прогрессировать до тяжелого, когда анемия становится угрозой для жизни [98].

Возбудителя можно обнаружить по мазкам периферической крови. Диагноз бабезиоз устанавливается на основе результатов микроскопии мазков по Романовскому или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Клиническая картина при бабезиозе собак, осложненном ОАИВСГ, является классической для ОАИВСГ. При развитии данной патологии у больных отмечают следующие клинические признаки: гемоглобинурию, регенераторную анемию, признаки печеночной, а в тяжелых случаях и почечной недостаточности. Разрушение Эр в результате ОАИВСГ вызывает гемоглобинемию, образовавшийся свободный гемоглобин выводится почками, что может привести к тубулярному некрозу и почечной недостаточности [5, 61].

Из вышесказанного следует, что собаки, больные бабезиозом, осложненным ОАИВСГ, являются хорошей моделью для изучения особенностей патогенеза острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза.

1.4. Особенности лечения острой постгеморрагической анемии

Основной задачей интенсивной терапии при острой кровопотере является поддержание аэробного метаболизма тканей. Для обеспечения и доставки кислорода на должном уровне необходимы хороший сердечный выброс, достаточный объем жидкости в кровеносном русле для восстановления микроциркуляции, адекватное количество Эр, достаточное поступление кислорода через легкие. Данные задачи контролируются следующими критериями: гемодинамическими (центральное венозное давление, сердечный индекс); критериями адекватной доставки кислорода (Hb, Ht, объем циркулирующих эритроцитов, индекс транспорта кислорода); критериями адекватной перфузии (среднее артериальное давление, нормальный уровень лактата и пирувата крови) [5, 23].

В настоящее время для компенсации утраченного объема циркулирующей крови (ОЦК) и устранения гипоксии тканей используют трансфузию крови и ее компонентов, а также две группы инфузионных сред – кристаллоидные и коллоидные растворы [47, 51]. Огромное значение при выборе средств купирования быстроразвивающегося патологического процесса имеет патогенетическая стадия острой постгеморрагической анемии (ПГА), о чем говорилось выше, и степень гипоксии организма больного [42, 69].

1.4.1. Трансфузия препаратов крови при острой постгеморрагической анемии

Инфузионно-трансфузионная терапия (ИТТ) является первой ступенью в лечении кровотечений. При тяжелой гипоксии, возникшей в результате острой внешней кровопотери, препаратами выбора являются цельная кровь и эритроцитарная масса (ЭМ). Гемотрансфузия (hemotransfusion) или трансфузия – введение в кровяное русло реципиенту предварительно заготовленной крови или ее компонентов. Гемотрансфузии разделяют на две группы: аллогенные трансфузии и аутогемотрансфузии. Аллогенные трансфузии – переливание крови

или компонентов донорской крови. Аутогемотрансфузия – переливание реципиенту собственной крови или ее компонентов [51].

На сегодняшний день в медицинской практике цельная кровь используется редко, только в случае массивных замещений крови реципиенту. Консервированная цельная кровь для клинического применения практически недоступна в течение 24 часов, необходимых для обязательной сертификации, что включает комплекс лабораторных исследований, направленных на обеспечение безопасности реципиента от гемотрансмиссивных инфекций и иммунологических осложнений [51].

Необходимо учитывать, что консервированная донорская кровь отличается от крови, циркулирующей у реципиента. Необходимость сохранения крови в жидком состоянии вне сосудистого русла требует добавления в нее растворов антикоагулянтов и консервантов. Антикоагуляция достигается добавлением лимоннокислого натрия (цитрата) в таком количестве, которое достаточно для связывания ионов кальция. Жизнеспособность консервированных эритроцитов поддерживается снижением уровня рН и избыточным количеством глюкозы. В процессе хранения калий постоянно покидает эритроциты и, соответственно, его уровень в плазме повышается. Итогом метаболизма аминокислот плазмы является образование аммиака. В результате консервированная кровь отличается от неконсервированной наличием гиперкалиемии, различной степени гипергликемии, повышенной кислотностью, повышенным уровнем аммиака и фосфатов. В случаях, когда необходимо достаточно быстрое и большое по объему переливание консервированной крови или эритроцитарной массы, различия между циркулирующей кровью и консервированной становятся клинически значимыми [22, 89].

Компонентная гемотерапия анемических состояний базируется на преимущественном применении ЭМ. Преимущества последней по сравнению с консервированной цельной кровью следующие:

- низкое содержание консервирующего раствора;

- низкое содержание факторов гемокоагуляции;
- низкое содержание микроагрегантов;
- более высокая кислородтранспортная емкость в меньшем объеме продукта;
- минимальное содержание иммуногенных факторов (белков плазмы, тромбоцитов, лейкоцитов);
- возможность приготовления отмытых эритроцитов;
- возможность разведения ЭМ необходимыми трансфузионными средами (желатинолем, модежелем и др.) [51, 32].

Вопрос о трансфузиях крови и ее компонентов при лечении острой ПГА решается в зависимости от клинического состояния больного. При проявлении анемического синдрома значение имеет не только количество Эр в ОЦК и концентрация Hb, но и темпы снижения этих показателей, индивидуальная адаптационная способность организма к анемии, возраст, пол больного, сопутствующие заболевания, причина и место нахождения участка кровотечения. К вопросу использования эритроцитсодержащих сред при острой кровопотере нужно подходить, ориентируясь не на уровень Hb, а на уровень оксигенации тканей, который зависит от комплекса факторов [54, 15].

При хронических кровопотерях, в отличие от острых, происходит адаптация к анемии, и многочисленные физиологические механизмы компенсации нивелируют проявления болезни. Если острая кровопотеря достигает 30–40 % ОЦК, то наблюдается критическое снижение гемоглобина и гематокрита крови. В данном случае необходимо использовать эритроцитарную массу или цельную кровь. При потере 40–60 % ОЦК показана инфузия альбумина, т.к. данный уровень кровопотери приводит к гипоальбуминемии и снижению коллоидно-осмотического давления плазмы. При кровопотере, превышающей 60 % ОЦК, возникает дефицит плазмоцитарных и тромбоцитарных факторов свертывания. В данном случае, помимо донорских эритроцитов, реципиенту необходимо использовать свежезамороженную плазму [46, 51].

1.4.2. Компенсация утраченного объема циркулирующей крови коллоидными и кристаллоидными системами

У изначально здоровых пациентов при потере ОЦК до 30 % дефицит восполняют синтетическими коллоидами и кристаллоидами, т.к. при восстановлении сердечного выброса и артериального давления нормализуется микроциркуляция крови и снижается уровень гипоксии тканей. Выбор сред для заместительной терапии зависит от объема кровопотери и от стадии заболевания, на которой осуществляют лечение. До остановки кровотечения эритроцитсодержащие среды лучше не использовать. На этом этапе поддерживать микроциркуляцию в сосудистом русле лучше с помощью коллоидных препаратов в соотношении 1:1 или 2:1 с кристаллоидами [21, 101].

Коллоидные плазмозаменители используют при гиповолемическом шоке, кровопотере, септическом шоке. К преимуществам коллоидов относят:

- эффективное восполнение внутрисосудистого объема;
- коррекцию и поддержание коллоидно-онкотического давления плазмы;
- восстановление и поддержание микроциркуляции;
- увеличение внутригрудного объема крови без повышения содержания воды в интерстициальном пространстве легких и ухудшения оксигенации [51].

Коллоиды делятся на препараты естественного и искусственного происхождения. На сегодняшний день в медицине преимущественно применяют препараты, для производства которых используется гидроксиэтилкрахмал. Данные коллоиды обладают существенным преимуществом по отношению к другим препаратам данной группы:

- эффективно восполняют объем;
- в рекомендованных дозах не нарушают гемостаз;
- не влияют на функции почек;
- снижают капиллярную утечку при нарушенной проницаемости сосудов;
- ослабляют системную воспалительную реакцию.

Хорошая контролируемость и предсказуемость действия сделала коллоиды на основе гидроксипропилкрахмала препаратами выбора при лечении острой кровопотери [40].

Также в настоящее время для компенсации утраченного ОЦК используют кристаллоидные (солевые) растворы, которые делятся на две группы: нормотонические (0,9 % раствор натрия хлорида, раствор Рингера, Рингер лактат, трисоль, ацесоль и др.) и гипертонические (7,2 или 7,5 % раствор натрия хлорида) [47]. К преимуществам нормотонических солевых растворов относят:

- повышение сердечного выброса;
- хорошее восполнение внесосудистого объема жидкости.

К недостаткам кристаллоидов относят:

- короткое действие (время пребывания в кровотоке до сорока минут с последующим перемещением до восьмидесяти процентов введенного объема в интерстициальное пространство);
- дозы кристаллоидов в 2–4 раза превышают эквивалентные дозы коллоидов;
- снижают онкотическое давление плазмы;
- вызывают ацидоз при больших объемах инфузии;
- не восстанавливают микроциркуляцию [40, 70].

Расчет скорости инфузии нормотонических солевых растворов, обеспечивающей физиологические потребности в воде, производится с учетом массы тела и предполагаемого объема инфузии (таблица 3) [51].

Таблица 3. Расчет инфузии, обеспечивающей физиологические потребности в воде (приведено по Рагимову А.А., 2015) [51]

Масса тела, кг	Скорость инфузии, мл/ч	Объем инфузии, мл/сут
50	90	2169
60	100	2400
70	110	2640
80	120	2880
90	130	3120
100	140	3360

Основное назначение гипертонического раствора хлорида натрия заключается в быстром увеличении ОЦК за счет интерстициальной жидкости, что обеспечивает стабилизацию гемодинамики. К отрицательным последствиям использования гипертонических солевых растворов относят гипернатриемию, гиперосмолярный синдром, что ограничивает его использование [47].

1.5. Особенности лечения анемии при остром внутрисосудистом аутоиммунном гемолизе

Лечение АИГА, осложненной ОАИВСГ, должно быть комплексное. При выраженной анемии и явных клинических признаках, отображающих гипоксическое состояние у пациента, назначают трансфузии концентратов ЭМ. Также необходимо использовать иммуносупрессивные препараты. Использование глюкокортикостероидов ингибирует фиксацию фрагментов Fc IgG на макрофагах в течение 1–4 дней, уменьшает синтез Ig, следовательно, титр антител (АТ) снижается через 2–5 недель после начала лечения, под влиянием глюкокортикостероидов изменяется сродство АТ к АГ на Эр.

Преднизолон назначают по 2–3 мг/кг в сутки, под контролем гемолитического процесса. Если пациент с ОАИВСГ остается рефрактерен к лечению преднизолоном, то можно в качестве ударной терапии назначить метилпреднизолон внутривенно 1 г/м^2 [1].

При лечении анемии врачи в тяжелых случаях прибегают к трансфузии донорских Эр для восстановления необходимого количества красных клеток крови в организме реципиента. Для этого донорские эритроциты в необходимом объеме можно получить от здорового донора и использовать реципиенту незамедлительно, для того чтобы устранить тяжелую гипоксию. При этом необходимо учитывать, что применение донорских Эр может вызвать тяжелые побочные реакции. Известно, что при острой аутоиммунной гемолитической анемии определяющим фактором тактики трансфузии донорских Эр является их использование только по жизненным показаниям, т.к. высок риск развития посттрансфузионных осложнений [51].

В связи с этим заслуживает внимания информация о международных сроках хранения эритроцитов, полученных из крови, заготовленной на CPD и ресуспендированных раствором SAGM. Срок хранения при помощи данного консерванта у эритроцитарной массы составляет 42 дня. По данным Мороз В.В., различимые в электронный микроскоп крупные дефекты эритроцитарных мембран, затрудняющие деформируемость Эр их пластичность, появляются у большинства консервированных эритроцитов уже к 8 дню хранения [41, 84].

Считается, что важнейшим показателем кислородтранспортной функции эритроцитов в условиях анемии и вызванной ею тяжелой гипоксии является промежуточный компонент гликолиза – 2,3 бисфосфоглицерат (БФГ). В консервированной крови при помощи цитратдекстрозного компонента за 10 дней концентрация БФГ снижается с 4,5 до 0,5 мМ. Через 10 дней хранения в консерванте CPDA-1 и через 7 при хранении в CPD, глюцидере он исчезает из эритроцитов полностью. Донорские эритроциты за 24 ч могут восстанавливать лишь половину нормальной концентрации БФГ. При низкой концентрации 2,3 БФГ в донорских эритроцитах аффинность гемоглобина с кислородом повышена, при этом диссоциация оксигемоглобина и передача кислорода к тканям, наоборот, затрудняются. Если такие донорские Эр со сниженной концентрацией БФГ перелить тяжелобольным, возникнет опасность развития тяжелой гипоксии тканей. При этом если добавить в кровь БФГ отдельно, то нельзя восстановить нормальную концентрацию его в эритроцитах, так как, имея высокий отрицательный заряд, БФГ не может проникать через мембраны Эр. Следовательно, консервированная кровь, введенная реципиенту, начинает переносить кислород только через 12–24 ч [36, 89]. Поэтому при острых и тяжелых анемиях целесообразно применение кислородопереносящей эмульсии препарата «Перфторан». Это позволяет снять угрожающую жизни пациента гипоксию, дать возможность организму больного восстановиться при тяжелых анемиях и избежать использования донорских консервированных Эр [82, 95].

При АИ анемии сильное повышение билирубина и нарушение его транспорта приводят к высокой летальности, несмотря на комплексное и своевременное

лечение основного заболевания. Эффективно используются биофизические методы для борьбы с гипербилирубинемией. Фототерапия является эффективным методом снижения уровня неконъюгированного билирубина, в итоге образуются водорастворимые дериваты билирубина, которые легко экскретируются в желчь [1, 75].

Билирубин IXa является изомером билирубина. Он содержит пирольные кольца, которые стабилизируются шестью внутримолекулярными водородными мостиками, связывающими группы пропионовой кислоты с азотом и кислородом. Водородные связи обеспечивают водонерастворимость билирубина. При фототерапии под действием синего или зеленого света пирольные кольца билирубина IXa распадаются, и образуются нестабильные геометрические изомеры, или фотобилирубин. Эти фотоизомеры не способны образовывать внутримолекулярные водородные мостики и легко экскретируются в желчь без предварительной конъюгации. Таким образом, биофизический метод фототерапии позволяет существенно снизить гипербилирубинемии практически без побочных эффектов [1].

Внедрение в гематологическую практику передовых биофизических разработок, таких как кислородопереносящая эмульсия ПФОС и фототерапия, позволяет эффективно корректировать и контролировать гипоксию и сопутствующие патологические состояния, возникающие при АИГА [1, 114].

1.6. Газотранспортные кровозамещающие препараты на основе перфторуглеродных эмульсий

Одной из главных патофизиологических задач в клинической практике является устранение гипоксии, а также доставка кислорода к тканям и органам при кровопотере с помощью кислород-переносящих кровезаменителей. Возмещение кровопотери с помощью гемодилуции традиционными плазмозаменителями без газотранспортной функции или с низкими газотранспортными свойствами приводит к уменьшению кислородной емкости полученной смеси и, соответственно, к ухудшению кислородотранспортных

свойств крови. Понижение кислородной емкости крови не всегда может компенсироваться увеличением скорости кровотока и другими механизмами адаптации [34]. Поэтому создание и применение полноценных гемодиллютантов на основе газотранспортных кровозамещающих препаратов, способных при возмещении кровопотери не уменьшать кислородную емкость крови и ее реологические свойства, в настоящее время становится актуальной патофизиологической проблемой. Такими препаратами – гемодиллютантами, кровезаменителями с функцией переноса кислорода – являются перфторуглеродные эмульсии, переносящие любой газ, в том числе кислород и углекислый газ. Отечественные перфторуглеродные кровезаменители типа «Перфторан» (разрешенный к клиническому применению) и «ФТОРэмульсия III» (проходший 1 фазу клинических испытаний) состоят из смеси перфторорганических соединений [8, 12].

Перфторуглеродные кровезаменители «Перфторан» и «ФТОРэмульсия III» – это концентрированные эмульсии на основе бинарной смеси перфтордекалина и перфторметилциклогексилпиперидина. Высокая энергонасыщенность перфторуглеродных частиц, их ультрадисперсность создают уникальные свойства данным эмульсионным кровозамещающим системам и ставят их в особую переходную наноразмерную область (10^{-8} м), рядом с коллоидным (10^{-9} м) и атомно-молекулярным состоянием вещества. Это особое состояние перфторуглеродных кровозамещающих дисперсных систем проявляется в их высокой медико-биологической активности и в физическом взаимодействии со многими веществами и газами [11, 12].

1.6.1. Перфторорганические соединения – газотранспортные компоненты перфторуглеродных кровезаменителей

Перфторорганические соединения – бесцветные маслянистые жидкости с высокой плотностью, обладающие низким поверхностным натяжением и вязкостью, нерастворимые в воде и трудно растворимые в большинстве органических растворителей. Перфторуглероды были выбраны в качестве основы

перфторуглеродных кровозамещающих эмульсий в связи с тем, что они обладают одновременно, как значительной растворяющей способностью по отношению к газам, так и чрезвычайно высокой химической инертностью. Растворимость газов в ПФОС выше, чем в воде, приблизительно в 20 раз (таблица 4) [7, 122]. При атмосферном pO_2 перфторуглероды как растворяющие кислород агенты значительно менее эффективны по сравнению с кровью. Однако с физиологической точки зрения важна не только способность жидкости растворять кислород, но и способность переносить его к тканям.

Таблица 4. Сравнительная характеристика растворимости газов в крови, жидких ПФОС и в их эмульсиях (об.% при 1 атм.)

Жидкости	Растворимость O_2 при 37 °С	Растворимость CO_2 при 37 °С
Плазма	2,4	54
Кровь	20,0	50
ПФМЦП	42,5	150
ПФД	40,0	140
ПФТБА	40,3	142
Флюозол-ДА 20 % (Япония)	7,5	70
Перфторан (Россия)	7,0	60
Фторэмульсия III (Россия)	7,0	60

Во время перфузии изолированных органов при нормальных условиях только 50–60 % кислорода, имеющегося в крови, извлекается тканями. В то же время для эмульсии ПФОС эта величина намного выше и достигает 90 %. Иными словами, органы в ряде случаев извлекают кислород более эффективно из ПФОС, чем из крови. В крови кислород образует комплекс с железом в гемоглобине, в

результате чего кривая поглощения имеет S-образную форму. В противоположность этому, объем кислорода, растворенного в эмульсиях, возрастает линейно в соответствии с законом Генри (рисунок 3) [7, 122]. Растворимость газов в эмульсиях ПФОС связана в первую очередь с наличием пустот внутри жидких перфторуглеродов, т.е. с формой и упаковкой молекул ПФОС [7, 10, 12].

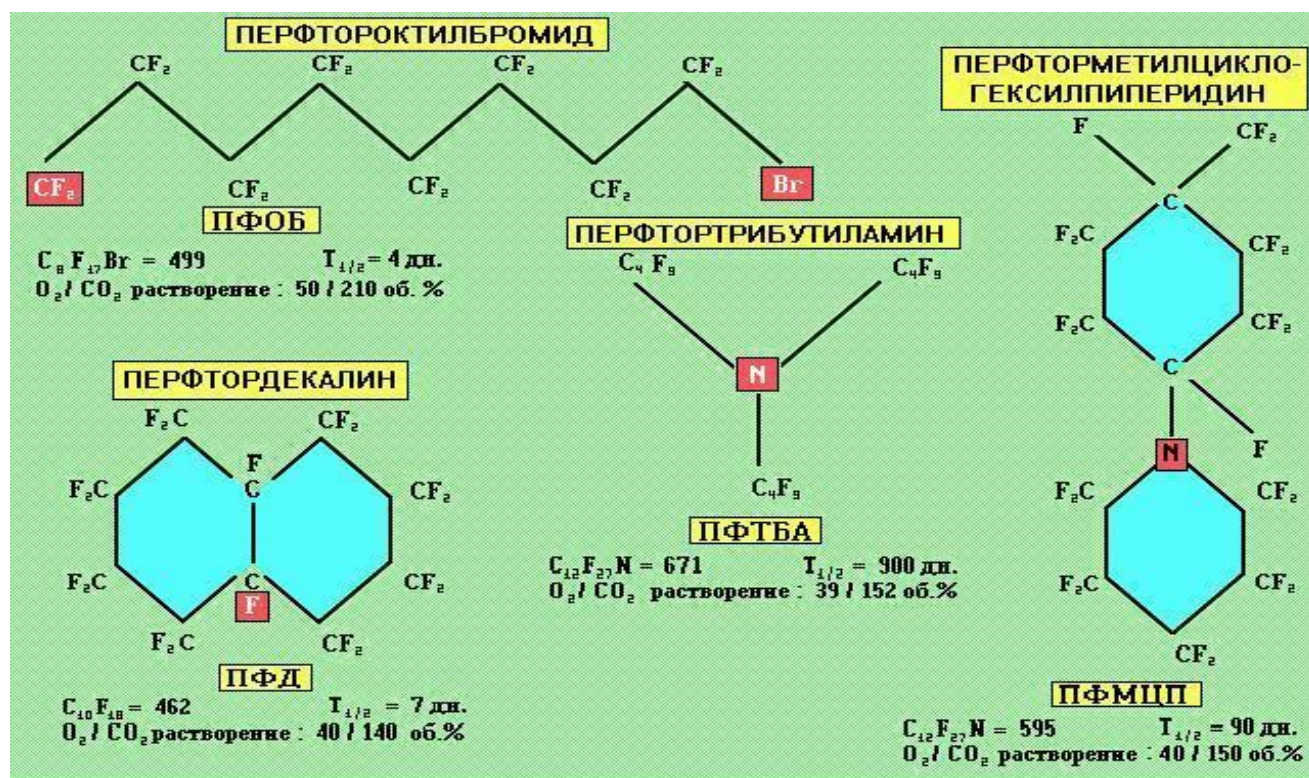


Рисунок 3. Химическая структура некоторых перфторорганических соединений, используемых при создании перфторуглеродных кровезаменителей:

ПФОБ – перфтороктилбромид (период полувыведения – 4 дн.), эмульсии ПФОБ, стабилизированные проксанолом не стабильны;
 ПФД – перфтордекалин (период полувыведения – 7 дн.), эмульсии ПФД, стабилизированные проксанолом не стабильны;
 ПФТБА – перфтортрибутиламин (период полувыведения – 900 дн.), эмульсии ПФТБА на проксаноле очень стабильны;
 ПФМЦП – перфторметилциклогексилпиперидин (период полувыведения – 90 дн.), эмульсии ПФМЦП на проксаноле стабильны;
 смесь ПФД/ПФМЦП (в соотношении 2/1) – основа отечественных перфторуглеродных кровезаменителей типа Перфторан и Фторэмульсия III

Сами ПФОС, как правило, химически чрезвычайно инертны. Исследования последних лет показывают, что химически инертные перфторсоединения могут оказывать непосредственное влияние на биологические системы, и это не может быть объяснено лишь способностью перфторуглеродов транспортировать газы. Влияние перфторуглеродов, показанное ранее в экспериментах на уровне бислойных липидных мембран, эритроцитов, микросом, свидетельствует об этом. Известно, что перфторуглероды (ПФУ) обладают сродством к фосфолипидам – важнейшим компонентам клеточных мембран. Это предполагает возможность гидрофобного взаимодействия ПФУ с мембраной, с последующими конформационными изменениями в ней [16, 28, 34].

1.6.2. Перфторуглеродные кровезаменители

Искусственные кровезаменители на основе перфторуглеродных эмульсий – это дисперсия масляной фазы (перфторуглеродов), распределенная в другой жидкости (воде) – дисперсионной среде. Такая дисперсная система по агрегатному состоянию имеет обозначение Ж/Ж, в нашем случае ПФУ/В (перфторуглерод/вода). В зависимости от состава дисперсной фазы и дисперсионной среды эмульсии могут быть прямыми и обратными. В перфторуглеродной эмульсии дисперсионной средой является полярная жидкость – вода. Эмульсии ПФОС – это прямые эмульсии, они относятся к свободнодисперсным системам. Применение эмульсий ПФОС во многом определяется их газотранспортной функцией. Происходит именно физическое, а не химическое, как в молекуле гемоглобина, растворение газа в перфторсоединениях. Основой газотранспорта в перфторуглеродном кровезаменителе, препарате Перфторан, являются перфторсоединения перфтордекалин и перфторметилциклогексилпиперидин в соотношении 2/1, что определяет высокую способность растворения кислорода, по сравнению с другими кровозамещающими жидкостями (рисунок 4) [9, 10].

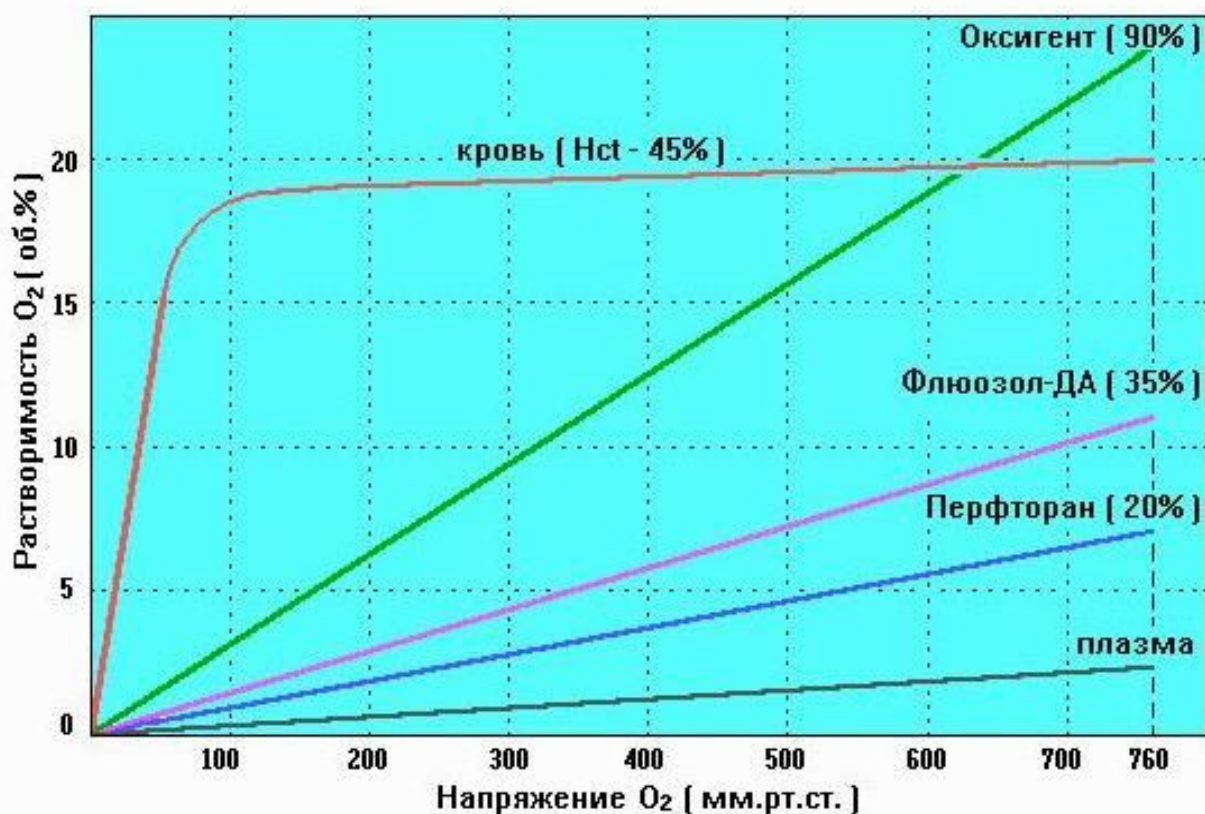


Рисунок 4. Растворимость кислорода в различных кровозамещающих жидкостях (при $pO_2 = 760$ мм рт. ст., $t = 20$ C°)

На рисунке 4 показано, что кровь при Hct – 45 % растворяет 20 об.% O_2 ; перфторуглеродная кровозамещающая 90 % эмульсия, препарат «Оксигент» (США), растворяет ~ 24 об.% O_2 ; перфторуглеродная кровозамещающая 35 % эмульсия, препарат «Флюозол ДА» (Япония), растворяет ~ 11 об.% O_2 ; перфторуглеродная кровозамещающая 20 % эмульсия, препарат «Перфторан» (Россия), растворяет ~7 об.% O_2 ; плазма крови растворяет 2,3 об.% O_2 [7, 122].

1.6.3. Физико-химические и биологические свойства перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан»

Согласно инструкции по применению, «Перфторан» – субмикронная эмульсия с газотранспортными функциями, содержащая 10 об.% перфторорганических соединений (ПФОС). Сложный состав данного препарата

определяет его физико-химические и биологические свойства (таблица 5). «Перфторан» считается полифункциональным кровезаменителем, обладающим газотранспортной функцией за счет высокой способности ПФУ растворять кислород. Препарат обладает большой поверхностью газообмена, что обеспечивает высокую скорость диффузии кислорода. За счет субмикронных частиц эмульсии происходит более полное снабжение кислородом участков ткани с обедненной сосудистой сетью и зон значительной гипертрофии [7, 10].

Соотношение между диаметром частиц эмульсии «Перфторан» и сечением самих узких капилляров обеспечивает ламинарность потока и низкое сопротивление сосудов. Проксанол, входящий в состав препарата, как эмульгатор, улучшает реологические свойства крови и положительно влияет на микроциркуляцию в тканях (рисунок 5) [7, 8, 117].

Таблица 5. Состав и физико-химические свойства перфторуглеродной эмульсии - препарата Перфторан [7]

Состав	Кол-во
Перфтордекалин	13,0 г
Перфторметилциклогексилпиперидин	6,5 г
проксанол-268	4,0 г
натрия хлорид	0,6 г
калия хлорид	0,039 г
магния хлорид	0,019 г
натрия гидрокарбонат	0,065 г
натрия гидрофосфат	0,02 г
Глюкоза	0,2 г
вода для инъекции	до 100 мл
Физико-химические свойства	
средний размер частиц	~ 30–150 нм
количество частиц в 1 л	$1,53 \times 10^{16}$
содержание ионов фтора	$< 10^{-5}$ М
осмолярность	280–310 мОсм/л
Вязкость	2,5 сП
рН	7,2–7,8
растворимость O ₂ (при pO ₂ при = 760 мм рт.ст., t – 20 °С)	6,0–7,0 об.%
растворимость CO ₂ (при pCO ₂ при = 760 мм рт.ст., t – 2 0°С)	60 об.%
ЛД ₅₀	130 мл/кг

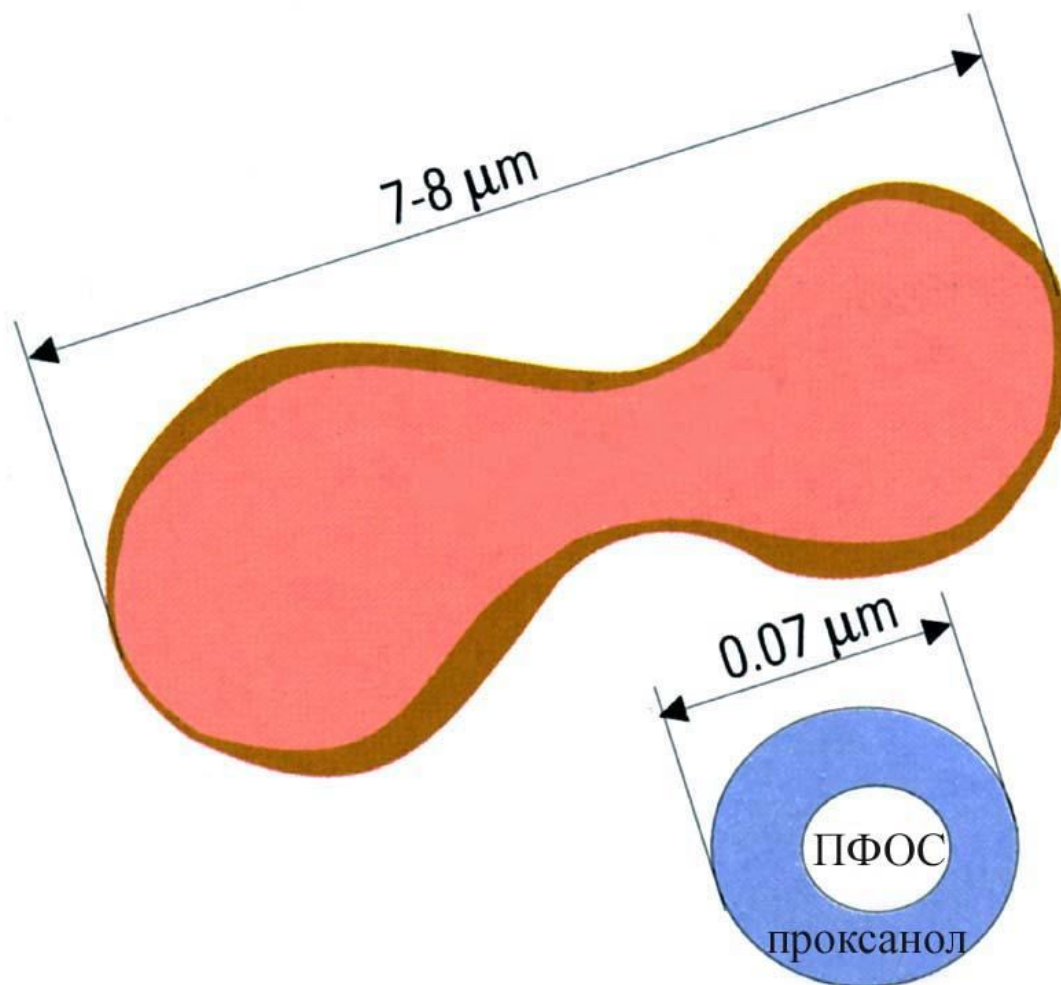


Рисунок 5. Соотношение по размеру эритроцита клетки крови и субмикронной (наноразмерной) частицы – «синтетического эритроцита» перфторуглеродной эмульсии типа препарата «Перфторан»

В представленной на рисунке 5 эмульсионной частице, в 100 раз меньшей эритроцита, находится, собственно, перфторсоединение – ПФОС, покрытое эмульгатором – поверхностно-активным веществом – проксанолом-268. Эмульгатор образует адсорбционно-сольватный слой, препятствующий слипанию и укрупнению частиц. Толщина слоя эмульгатора составляет ~ 20–40 ангстрем, который не препятствует газообмену. Средний диаметр частицы ПФОС – «синтетического эритроцита» ~ 70–100 нм [7, 8].

Перфторуглероды химически и метаболически инертны, не имеют токсической активности – в организме отсутствуют системы, способные их разрушить. Вследствие гидрофобности вводятся в кровь в виде мелкодисперсных

эмульсий. Тяжелее воды в 1,5 раза. Средний размер подавляющего числа частиц эмульсии Перфторан 0,03–0,15 мкм, что примерно в 100 раз меньше диаметра эритроцита, равного у человека и собаки 5–9 мкм, у кошки 5 мкм, и значительно меньше средней величины диаметра капилляра, равной 2–4 мкм. Препарат обладает реологическими, гемодинамическими, диуретическими, мембраностабилизирующими, кардиопротекторными и сорбционными свойствами. Влияние «Перфторана» на газотранспорт обеспечивается увеличением кислородной емкости и динамики газообмена. Кислородная емкость «Перфторана» почти в 3 раза выше, чем у всех традиционных негазотранспортных кровезаменителей и плазмы, но приблизительно во столько же раз она ниже кислородной емкости цельной крови [7, 8].

Период полувыведения Перфторана из кровотока составляет 24 ч. Проксанол – 268 выводится с мочой в течение 1–2 суток. ПФОС выводятся через легкие и кожу, в меньшей степени – с желчью. Перфторуглероды химически инертны и в организме не метаболизируются. Частицы эмульсии ПФОС временно аккумулируются в макрофагах печени, селезенки, костного мозга. Период полувыведения ПФОС из макрофагов составляет для перфтордекалина – 14 дней (полное выведение – 1 месяц), для перфторметилциклогексипипридина – 90 дней (полное выведение – 18–24 месяца) [7, 8, 11].

При применении Перфторана возможны аллергические реакции, учащение пульса, снижение артериального давления, повышение температуры, головная боль, боль за грудиной и в поясничной области, затруднения дыхания, анафилактикоидные реакции. Введение Перфторана можно сочетать с трансфузиями альбумина человека, донорской крови, изотонических солевых растворов, глюкозы, введением антибактериальных препаратов. При применении Перфторана обязательно проведение биологической пробы. При лечении острой или хронической гиповолемии Перфторан вводят внутривенно струйно или капельно в дозе 5–30 мл/кг (взрослым). Разовая и суммарная дозы препарата зависят от тяжести исходного состояния и возраста больного. Эффект

«Перфторана» максимален, если во время и после его инфузии в течение суток больной дышит смесью, обогащенной кислородом (40–60 %) [7, 8, 11].

Показания к применению газотранспортной кровозамещающей эмульсии препарата Перфторан (инструкция по применению):

- 1) острая и хроническая гиповолемия (травматический, геморрагический, ожоговый и инфекционно-токсический шок);
- 2) нарушения микроциркуляции и периферического кровообращения (нарушения тканевого метаболизма и газообмена, черепно-мозговая травма; ишемический отек головного мозга, нарушения мозгового кровообращения, шоковая почка, жировая эмболия при множественной травме, облитерирующие заболевания сосудов конечностей);
- 3) противоишемическая защита органов, отключаемых временно от кровотока или предназначенных к трансплантации (кардиоплегия при реконструктивных операциях на сердце, предварительная подготовка донора и реципиента к трансплантации);
- 4) использование в аппарате искусственного кровообращения при перфузионном сохранении отключаемых от кровотока органов и региональной перфузии;
- 5) проведение глубокой изоводемической гемодилюции;
- 6) отсутствие донорской крови и эритроцитных сред при наличии анемической гипоксии, угрожающей жизни больного;
- 7) отказ реципиента от гемотрансфузий по религиозным соображениям или опасности заражения вирусными инфекциями (СПИД, гепатиты, цитомегаловирус и др.);
- 8) местное применение (лаваж и аэрозольная обработка поверхности альвеол легких, промывание плевральной и брюшной полости, промывание гнойных ран, орошение раневой поверхности слизистых и кожи) [7].

Для противоишемической защиты донорских органов «Перфторан» используют в аппарате искусственного кровообращения в составе перфузата из расчета 10–40 мл/кг массы тела [28].

При нарушении микроциркуляции и периферического кровообращения «Перфторан» вводят внутривенно капельно в дозе 4–10 мл/кг. Препарат можно вводить в той же дозе 2–3 раза с интервалом в 1–4 дня [41].

Согласно инструкции по медицинскому применению препарата, Перфторан следует хранить в замороженном состоянии при температуре -18°C . Размораживают препарат при комнатной температуре, но не выше $+30^{\circ}\text{C}$. Время размораживания при комнатной температуре флаконов с Перфтораном по 200 мл составляет 1,5–2 ч. После разморозки препарат необходимо осторожно взболтать до полной однородности состава, а перед инфузией – согреть до $+21 - 23^{\circ}\text{C}$. Допускается пятикратное размораживание/замораживание. В размороженном виде препарат хранить в холодильнике при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ не более 2 недель. Перфторан выпускают во флаконах из стекла по 50, 100, 200 и 400 мл [7].

При сравнении эффективности лекарственных средств (ЛС) значение имеют их «биодоступность» и «биоэквивалентность». Эти понятия расшифрованы применительно к ЛС, проявление активности которых определяется особенностью химической структуры используемого вещества (субстанции). По определению само внутривенное введение ЛС определяет их биодоступность, т.к. в данном случае происходит быстрое распределение введенного вещества между различными системами организма [40, 49].

Для эмульсий ПФУ главным условием выполнения ими газотранспортной функции при циркуляции в сосудистом русле является сохранение корпускулярной природы частиц, поскольку газы крови не образуют комплексов с молекулами ПФУ. В силу химической инертности ПФУ практически нерастворимы в воде и сами не растворяют другие вещества. Это достигается за счет покрытия ПФУ поверхностно-активными веществами (ПАВ), что определяет структуру эмульгированных частиц ПФУ в виде двухслойного шара. В центре его находится ПФУ (агрегатное состояние – жидкость), а на поверхности слой ПАВ. Представление о структуре частиц помогает понять важное для эмульсионных препаратов, содержащих ПФУ, обстоятельство. При одинаковом размере эмульгированные частицы могут отличаться поверхностными свойствами и

поэтому по-разному реагировать с макромолекулами плазмы и клетками крови при попадании в сосудистое русло. Особенности проявления поверхностных свойств эмульсий ПФУ разного состава проявляются при контакте с биологической средой (плазма крови) [34].

Различия обусловлены содержанием фторуглеродной фазы в препарате и его кислородной емкостью, структурой эмульсии, взаимодействием с клетками крови и макромолекулами плазмы. Названное взаимодействие во многом зависит от поверхностных свойств частиц, которые определяются природой ПАВ в поверхностном слое (фосфолипиды – ФЛ или проксанол – П-268), также прочностью связи поверхностного слоя ПАВ с ПФУ [34].

В самом начале создания инфузионных сред, содержащих ПФУ, сложилось теоретическое представление об определяющей роли абсолютного количества кислорода, транспортируемого эмульсиями в живом организме – их кислородной емкости (КЕ). До настоящего времени принято сопоставлять газотранспортные свойства эмульсий ПФУ и крови, этот подход основывается на количественном сравнении особенностей к диссоциации O_2 этих сред. Для крови это сигмоидная кривая, отражающая кооперативное взаимодействие гемоглобина с кислородом, для эмульсий ПФУ – линейная зависимость, обусловленная физической растворимостью кислорода в ПФУ. Процесс доставки газов кровью определяется «микрокинетикой», т.е. скоростью диффузии молекул O_2 от эритроцитов к тканям и молекул CO_2 в противоположном направлении [24, 91, 121].

Частицы ПФУ занимают определенный объем на пути диффузионных потоков O_2 и CO_2 при совместной циркуляции с эритроцитами. Тем самым они могут изменить условия доставки газов кровью, что должно сказаться на скоростях оксигенации и деоксигенации эритроцитов. Причина этого явления обусловлена повышенной растворимостью газов крови во фторуглеродной фазе эмульсии и увеличением коэффициента массопереноса O_2 частицами, поскольку толщина оболочки ПАВ вокруг частиц не препятствует возможности свободного прохождения газов через частицы (рисунок 6) [7].

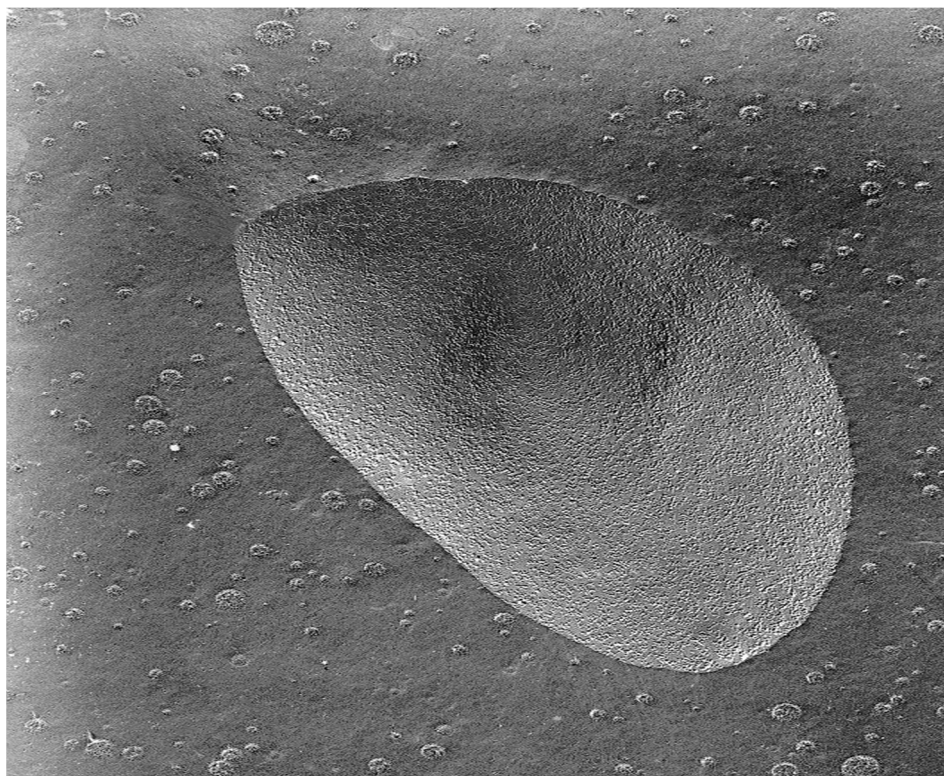


Рисунок 6. Электроннограмма фрагмента эритроцита клетки крови (~ 7 мкм) в окружении субмикронных частиц ($\sim 0,03$ – $0,150$ мкм) эмульсии ПФОС, полученная после контрастирования в насыщенном растворе уранилацетата и исследованная в электронном микроскопе. Количество частиц ПФОС – «синтетических эритроцитов» в 1 л 20 % эмульсии перфторсоединений типа «Перфторан» составляет $\sim 1,53 \times 10^{16}$, общая площадь частиц в 1 л эмульсии ~ 12000 м², масса частицы $\sim 1,3 \times 10^{-16}$ г, объем частицы $\sim 6,54 \times 10^{-23}$ м³, площадь частицы $\sim 7,8 \times 10^{-15}$ м².

По данным, представленным в работе [72], частицы ПФУ выполняют, во-первых, роль пассивного переносчика газов O_2 и CO_2 пропорционально перепаду парциального давления соответствующего газа; во-вторых, роль усилителя потока газов O_2 и CO_2 за счет большего массопереноса, обусловленного повышенной растворимостью газов во фторуглеродной фазе.

На рисунке 7 представлена общая схема, на которой наглядно иллюстрируется роль частиц ПФУ, выступающих в качестве усилителя потоков газов. В физиологических условиях все механизмы «работают» одновременно и их невозможно разделить. Условия доставки O_2 тканям определяются также реологией, или текучестью крови [34].

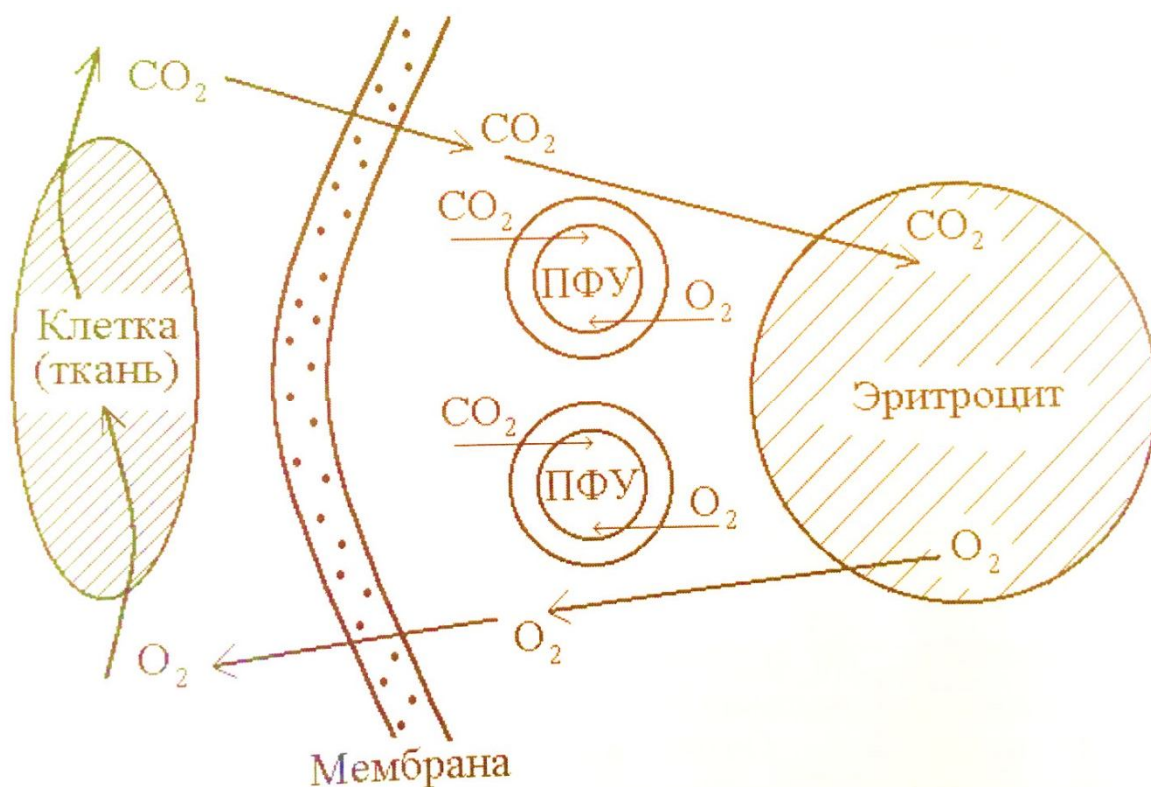


Рисунок 7. Влияние эмульсий ПФУ на процесс доставки газов эритроцитами

Эмульсии ПФУ сочетают в себе два неразрывно связанных свойства: способность растворять большие объемы газов и чужеродность частиц, т.е. неспособность частиц к метаболизму, которая обусловлена химической инертностью этих соединений. Будучи чужеродными, частицы ПФУ захватываются лейкоцитами и попадают в различные органы, откуда выводятся с выдыхаемым воздухом в химически неизменном состоянии. Способностью к захвату чужеродных частиц (фагоцитарные свойства) обладают нейтрофилы и моноциты. Моноциты при переходе в ткани претерпевают трансформацию и превращаются в макрофаги различных органов с морфологической функциональной перестройкой [38, 39].

Изучение влияния эмульсий ПФУ на системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) проводят на уровне целостного организма. Реакция СМФ зависит от дозы и состава вводимой эмульсии. Показано, что эта реакция имеет фазный характер «угнетение – активация – возвращение к норме» при введении эмульсии в дозах 3

и 10 г ПФУ/кг. Вместе с тем отмечено, что малые дозы (менее 1 г ПФУ/кг) стимулируют функцию печеночных макрофагов без фазы угнетения. С точки зрения безопасности приведенные результаты также свидетельствуют в пользу применения малых доз эмульсий ПФ, но не раскрывают механизмы влияния эмульсий ПФУ на клетки СМФ [110].

Очевидно, можно говорить и о системном влиянии эмульсий ПФУ на клетки крови. Это вытекает в основном из следующих положений. Во-первых, циркулирующие в сосудистом русле форменные элементы крови не являются «сухими» клетками. Они окружены неперемешиваемым слоем воды. Толщина этого слоя вокруг эритроцита составляет ~ 1 мкм. Средний диаметр частиц эмульсий ПФУ на порядок меньше – 0,1 мкм. Из этого следует, что частицы ПФУ могут находиться не просто в плазме, но и в плотном примембранном водном слое, вступая в непосредственный контакт с клеточной мембраной. Во-вторых, согласно проведенным ранее расчетам, при внутривенном введении 10 об.% (10 % по объему, 20 % весовых) эмульсии ПФУ в дозах 5-10 мл/кг, число частиц в единице объема 1мм^3 составляет $2,5 \times 10^{10} - 1,2 \times 10^{10}$. Расчет сделан исходя из физиологической нормы: объем циркулирующей крови составляет ~ 5 л при среднем весе 65–70 кг, а средний диаметр частиц равен 0,1 мкм. Если сопоставить это количество частиц ПФУ с числом клеток в том же объеме 1мм^3 , то оно на 3 порядка превышает число эритроцитов ($\sim 5 \times 10^6$) и почти на 6 порядков превышает число лейкоцитов ($\sim 9 \times 10^3$) и тромбоцитов ($\sim 3 \times 10^3$). Таким образом, на каждую клетку, циркулирующую в сосудистом русле, приходится от одной тысячи до одного миллиона эмульгированных частиц ПФУ. Из приведенных сведений следует, что циркулирующие в токе крови частицы ПФУ неизбежно будут оказывать влияние на специфическую активность форменных элементов крови [110, 114].

С общебиологических позиций все названные процессы связаны с воздействием ПФУ на клеточные мембраны. Для эритроцитов это влияние на пластичность мембран доказано. Разная степень липофильности ПФУ определяет разную скорость их выведения из организма. Изменение под действием ПФУ рецепторно-адсорбционных свойств мембран нейтрофилов и макрофагов, изменение

микровязкости мембран лимфоцитов могут существенным образом влиять на их функцию [38].

Прогресс в изучении стабильности и улучшении качества эмульсий ПФУ связан с развитием представлений об их структуре и разработкой методов ее изучения. Для описания анализа параметров состояния эмульсий ПФУ введены следующие элементы структуры: «общая структура», определяемая средним диаметром и распределением частиц по размеру, и «микроструктура», зависящая от состояния молекул ПАВ в оболочке вокруг частиц, их взаимного расположения, упорядоченности, окисленности и др. Разработана физико-химическая система исследований для наблюдения за трансформацией структуры эмульсий ПФУ, которая значительно повысила информативность процедуры контроля за стабильностью этих сред [113].

Согласно принятым в нашей стране международными правилами в сфере обращения лекарств GMP, основное внимание уделяется их качеству. Современное понимание качества включает не только соответствие фармакопейным требованиям, т.е. спецификации, но и пригодности препаратов к применению в клинике. Такое обеспечение качества основывается на комплексном, профилактическом подходе, а также на недопущении в процесс производства случайных факторов, потенциально способных изменить терапевтические или токсикологические свойства препарата. В целом, введенные требования (GMP) направлены на улучшение потребительских свойств любого препарата [40, 101].

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Группы животных участвующих в исследованиях

В первом блоке исследований (глава 3) для коррекции гипоксии при острой постгеморрагической анемии были отобраны 42 кошки обоих полов, поступивших в Клинику ветеринарной медицины Научного центра биологических исследований города Пущино, с кровотечением в результате различных травм в период 2009–2018 гг. Животные были рандомизированы по способу лечения на 3 группы: 1 – контрольную (n=10), 2 – группа с использованием препарата «Перфторан» (n=10) и 3 – группа с использованием донорской эритроцитарной массы (n=10).

В первую контрольную группу вошли животные, для лечения которых применялась традиционная инфузионная терапия, включающая в себя использование коллоидного раствора «Стабизол» в дозе 20 мл/кг веса.

Во вторую группу включили животных, которым помимо коллоидного раствора «Стабизол», применялся перфторуглеродный кровезаменитель «Перфторан». Терапевтическая доза составила 10 мл/кг веса, инфузию проводили животным в первый, второй, третий, пятый и седьмой день после получения травмы.

В третью группу вошли кошки, для лечения которых в первый день поступления в клинику применялась традиционная инфузионная терапия, включающая в себя использование коллоидного раствора «Стабизол» в дозе 20 мл/кг веса, а через сутки после получения травмы и кровотечения по показаниям провели трансфузию донорской ЭМ в дозе 10мл/кг веса.

Во все три группы первого блока исследований отбирались животные с одинаковыми критериями: Ht 9–18 %, билирубин 7–11 мМоль/л, лактат 2,3 – 5,4 мМоль/л, SpO₂ 77–84 %, K⁺ 4,1–5,4 мМоль/л. Уровень креатинина был в рамках нормальных значений 80–160 мМоль/л. Масса тела животных от 3 до 5 кг.

Для выявления летальности в первом блоке исследований участвовали три группы животных, включающих 30 особей из биохимической группы и 12 особей дополнительно, с соответствующей коррекцией гипоксии.

Во втором блоке исследований (глава 4) для коррекции гипоксии при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе использовали 71 собаку обоих полов, поступивших в Клинику ветеринарной медицины Научного центра биологических исследований города Пущино в период 2009–2018 гг. с диагнозом бабезиоз, осложненным ОАИВСГ.

В данном исследовании с параллельным контролем животные были рандомизированы на 3 группы по вариантам лечебного воздействия. Во все три группы отбирались собаки с одинаковыми критериями: Ht 9–12 %, билирубин 40–60 мМоль/л, лактат 5–6 мМоль/л, SpO₂ 78 – 80 %, K⁺ 3,6–5,6 мМоль/л. Уровень креатинина был в рамках референсных значений – 80–160 мМоль/л. Отбирались собаки, вес которых составлял от 15 до 35 кг. У данных собак присутствовал гемолиз плазмы, гемоглобинурия, анемичность и иктеричность слизистых оболочек, при микроскопии мазка крови были обнаружены бабезии и агглютинация Эр в виде «монетных столбиков», при центрифугировании крови плазма была окрашена в красный цвет, что подтверждало наличие ОАИВСГ в результате заражения животных бабезиозом [31, 89].

В первую контрольную группу включили 10 собак, для лечения которых применялась базовая терапия, подразумевающая: преднизолон внутривенно (в/в) в дозе 4мг/кг один раз в день пять дней подряд, который используется в качестве иммуносупрессора, в качестве дезинтоксикационного раствора в/в вводили 0,9 % NaCl 10 мл/кг, один раз в день пять дней подряд, антипротозойную терапию осуществили подкожным (п/к) введением препарата «Пиро-Стоп» 0,5 мл/10 кг однократно.

«Пиро-Стоп» – это антипротозойный лекарственный препарат из группы имидазола. В качестве действующего вещества в 1 мл раствора для инъекций

содержится 120 мг имидакарба дипропионата. Лечебная доза собакам 0,5 мл на 10 кг массы животного, путем подкожного введения, однократно [47].

Во вторую группу вошли 10 животных, которым, помимо базовой, проводилась заместительная терапия: для восполнения количества погибших Эр в результате острого АИВСГ в первый день обращения использовалась ЭМ, при помощи которой гематокрит у реципиента поднимали до 20 %. Чтобы поднять Ht реципиента на 1 %, требуется на один кг веса реципиента 1мл донорской ЭМ с Ht 45 %. ЭМ применяли в разбавлении 0,9 % NaCl в соотношении 1:1, в целом объем вводимого реципиенту препарата крови с Ht 10 % равнялся 20 мл/кг [42, 27].

В третью группу включили 10 собак, которым к базовой терапии добавили введение газотранспортной эмульсии ПФУ в виде препарата «Перфторан», в дозе 10 мл/кг для уменьшения гипоксии, возникшей в результате ОАИВСГ, при этом ЭМ данным животным не использовали.

Для выявления летальности во втором блоке исследований участвовали три группы животных, включающих 30 особей из биохимической группы и 41 особь дополнительно, с соответствующей коррекцией гипоксии.

2.2. Гематологический метод исследования

Кровь – наиболее часто используемый для аналитического тестирования образец, так как она протекает по всему организму, на нее влияет множество физиологических и патологических факторов, и оценка количества форменных элементов дает достаточно полное представление о клиническом состоянии больного организма, особенно при гематологических патологиях. Наиболее точный подсчет клеток крови обеспечивают автоматические гематологические анализаторы [5, 18].

Кровь от больных животных для гематологических исследований получали из вены предплечья. Общий клинический анализ крови осуществляли с использованием автоматического гематологического анализатора крови

Mindrey BC-2800 vet (Китай) с импедансным способом регистрации частиц (рисунок 8). Порцию крови объемом 1 мл помещали в пробирки с ЭДТА-К3 для гематологического исследования [5].



Рисунок 8. Автоматический гематологический анализатор крови *Mindrey BC-2800 vet* (Китай) с импедансным способом регистрации частиц

Гематокрит – это отношение суммарного объема всех форменных элементов к общему объему крови. Эритроциты составляют 99 % от общего объема форменных элементов. Наиболее точный подсчет эритроцитов обеспечивают автоматические счетчики клеток. Ручной подсчет связан со значительной степенью погрешности, но при микроскопии мазка крови можно оценить форму и размер Эр, что очень важно для определения вида анемии и степени ее тяжести. Гематокрит – расчетный показатель, определяемый автоматическим гематологическим анализатором. Гематологические анализаторы измеряют количество эритроцитов и их средний эритроцитарный объем, а затем по уравнению подсчитывают Ht [$Ht \% = \text{эритроциты (RBC)} \times 10^6/\text{мкл} \times \text{средний эритроцитарный объем (фл)}/10$] [5].

Референсные интервалы различаются в зависимости от географической локализации, лаборатории, возраста, пола и породы животного. Собаки: 40–60 %, кошки 30–45 %. У животных снижение гематокрита разделяют на легкое, умеренное и тяжелое. Собаки: легкое – 30–37 %; умеренное – 20–29 %; тяжелое – 13–19 %. Кошки: легкое – 20–26 %; умеренное – 14–19 %; тяжелое – 10–13 % [42, 43].

При использовании автоматического гематологического анализатора за короткий промежуток времени можно получить подробный клинический анализ крови. На специальном бланке последовательно распечатываются базовые гематологические показатели (рисунок 9).

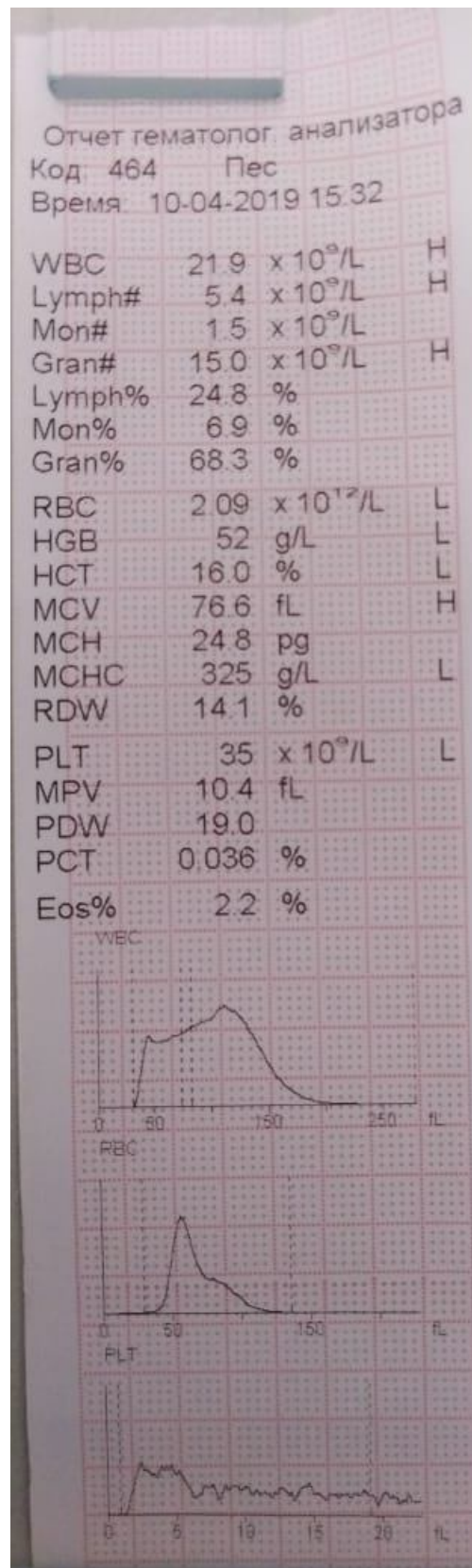


Рисунок 9. Бланк клинического анализа крови, который выдает автоматический гематологический анализатор крови *Mindrey BC-2800 vet* с импендансным способом регистрации частиц

2.3. Биохимический метод исследования

Кровь от больных животных для биохимических исследований получали по правилам получения крови для гематологических исследований. Порцию крови объемом 3 мл помещали в пробирки с активатором образования сгустка для биохимических исследований [5].

Биохимические исследования сыворотки крови проводили с помощью автоматического биохимического анализатора крови IDEXX Vet Test 8008 (США) (рисунок 10).



Рисунок 10. Автоматический биохимический анализатор крови *Idexx Vet Test 8008* (США)

Работа биохимического автоматического анализатора основана на принципе «сухой химии». Используются отдельные слайды, которые хранятся в

морозильной камере. Данный анализатор позволяет точно измерять биохимические показатели, несмотря на гемолиз плазмы или ее хилез, что особенно важно в биохимическом исследовании плазмы крови при ОАИВСТ. Аппарат выдает чек, на котором фиксируется дата, время проведенного исследования и данные по животному (рисунок 11).

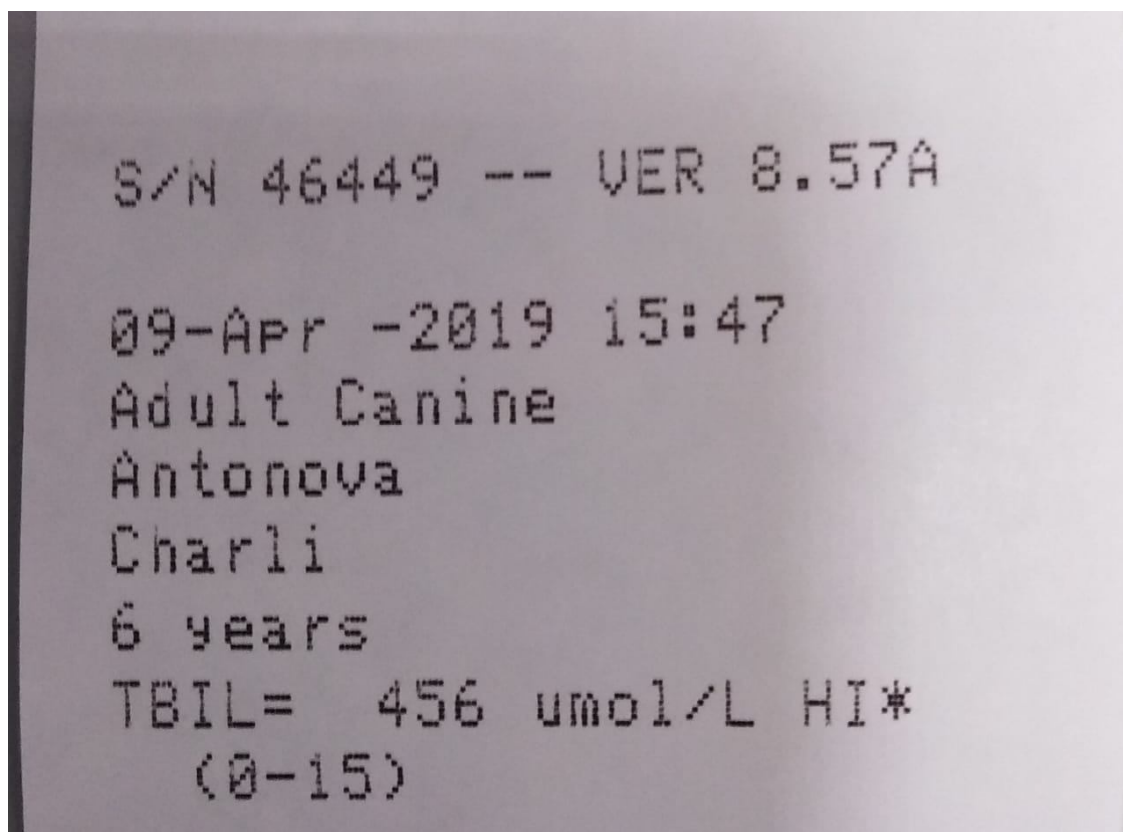


Рисунок 11. Отчетный чек, который выдает автоматический биохимический анализатор крови *Idexx Vet Test 8008*

Эту информацию можно сохранить как в электронном, так и в бумажном виде, что удобно для фиксации данных при проведении эксперимента. На данном анализаторе проводили мониторинг билирубина, лактата, K^+ . Слайды по данным показателям хранились в морозильной камере при $-10\text{ }^\circ\text{C}$.

Лактат – это молочная кислота, которая является конечным продуктом анаэробного метаболизма глюкозы. Она образуется как в нормальных условиях (при физических нагрузках), так и при патологических процессах. При физиологических значениях pH молочная кислота немедленно диссоциирует с образованием лактата и иона водорода. Выделение лактата производится печенью и

почками. Клинически значимое накопление лактата обусловлено снижением перфузии тканей и последующей гипоксией со сдвигом метаболизма в сторону анаэробного гликолиза. Причинами гипоксии тканей могут быть неадекватная перфузия, тяжелая гипоксия, повышение потребности в кислороде, снижение концентрации гемоглобина или комбинация этих факторов [65, 108].

Диапазон нормальных значений лактата у кошек и собак может варьироваться в зависимости от методики анализа. В целом результаты считаются клинически нормальными, если концентрация лактата $\leq 2,5$ ммоль/л [5].

Билирубин – это желтый пигмент, который является продуктом расщепления гемоглобина. Гем – часть молекулы гемоглобина, из которого образуется билирубин. Небольшое количество билирубина также вырабатывается в процессе расщепления цитохромов и миоглобина. Первоначально билирубин вырабатывается в неконъюгированной, нерастворимой в воде форме, затем связывается с альбумином в крови и переносится в печень, где конъюгируется путем глюкуронизации и становится водорастворимым, после чего экскретируется в желчь [1].

Уровень билирубина в крови может повышаться вследствие усиленного распада эритроцитов (надпеченочная желтуха), повышенного поглощения в печени и/или экскреции (печеночная желтуха) или внепечёночного холестаза (подпечёночная желтуха) [5].

При выраженном повышении билирубина у животного наблюдается желтушность склер, непигментированных участков кожи, видимых слизистых оболочек или плазмы крови. При гемолитической болезни билирубинемия проявляется в конъюгированно-неконъюгированной форме. При этом определения значения общего билирубина достаточно для мониторинга патологического процесса [89].

Калий является главным катионом интрацеллюлярного пространства. В сыворотке крови уровень калия у кошек составляет 4,1–5,4 ммоль/л, уровень калия в плазме крови у собак составляет 4,1–5,4 ммоль/л, общее количество

калия в организме – 51 мМоль/кг массы тела. 98 % калия находится в клетках, а 2 % – в экстрацеллюлярном пространстве [89].

2.4. Пульсоксиметрический метод исследования

Пульсоксиметрия – это оценка насыщения гемоглобина артериальной крови кислородом (SpO_2). Когда гемоглобин участвует в химических реакциях, изменяется конфигурация его структуры, каждая конфигурация характеризуется своим типом отражения света [5].

На длине волны 660 нм, которая соответствует красной области видимого спектра, окисленный гемоглобин (HbO_2) отражает свет эффективнее, чем восстановленный гемоглобин (Hb). На длине волны 940 нм (инфракрасная часть спектра) наблюдается обратное соотношение: гемоглобин отражает свет лучше, чем HbO_2 . Таким образом, при пропускании света обеих длин волн через образец крови или через тонкий слой ткани, в котором пульсирует поток крови, интенсивность пропускания света с длиной волны 660 нм будет, главным образом, зависеть от концентрации HbO_2 в данном образце, тогда как пропускание света с длиной волны 940 нм будет определяться концентрацией Hb . Концентрации HbO_2 и Hb выражаются в относительных величинах, т.е. в виде фракции гемоглобина, находящегося в окисленной форме. Этот показатель известен как процент насыщения оксигемоглобина (процент сатурации) и определяется следующим образом:

$$\text{процент сатурации (SpO}_2\text{)} = \frac{HbO_2}{(HbO_2+Hb)} \times 100.$$

Данный метод осуществляется путем прикрепления датчика на ухо животного, язык, носовую перегородку, препуций. Пульсоксиметры снабжены индикатором частоты пульса и силы сигнала. Если частота пульса, регистрируемая пульсоксиметром, не соответствует пальпаторно определяемой частоте пульса, то показания датчика ненадежны. Поэтому достоверность результата пульсоксиметрии подтверждали пальпаторно частотой пульса. Пульсоксиметрия позволяет отслеживать уровень насыщения крови кислородом каждую секунду у

животных в критическом состоянии и может помочь вовремя предотвратить развитие фатальной гипоксии. Диапазон нормальных значений 95–100 %, результат менее чем 95 % можно считать патологическим, результат менее чем 85–90 % у любого животного считается угрожающим жизни [42]. В своей работе мы использовали ветеринарный монитор пациента IM – 10 Mindrey (Китай).

2.5. Перфторуглеродная эмульсия – препарат «Перфторан»

«Перфторан» – субмикронная эмульсия с газотранспортными функциями, содержащая 10 об.% (20%) перфторорганических соединений (ПФОС).

Состав: перфтордекалин (ПФД) – 13 г; перфторметилциклогексилпиперидин (ПМЦП) – 6,5 г; проксанол – 4 г; натрия хлорид – 0,6 г; магния хлорид – 0,019 г; калия хлорид – 0,039 г; натрия гидрокарбонат – 0,065 г; глюкоза – 0,2 г; натрия гидрофосфат – 0,02 г; вода для инъекции – до 100 мл [7].

В первом экспериментальном блоке исследований (3 глава) газотранспортную кровозамещающую эмульсию на основе перфторорганических соединений – «Перфторан» для купирования гипоксии, вызванной острой ПГА, у кошек использовали следующим образом. «Перфторан» вводился в/в в дозе 10 мл/кг один раз в день на 1, 2, 3, 5, 7 день лечения.

Во втором экспериментальном блоке исследований (4 глава) газотранспортную кровозамещающую эмульсию на основе перфторорганических соединений – «Перфторан» для купирования гипоксии, вызванной ОАИВСГ, у собак использовали в/в в дозе 10 мл/кг один раз в день пять дней подряд.

Введение «Перфторана» у кошек и собак начинали с биопробы, заключающейся в постепенном контролируемом введении: 0,1 мл препарата, разведенным 0,9 % NaCl до 5 мл, препарат вводили медленно внутривенно, а затем капельно с паузами по 60 сек. – 3, 5, 10, 30 капель, постепенно увеличивая скорость инфузии до одной капли в секунду.

Согласно инструкции по медицинскому применению препарата, «Перфторан» следует хранить в замороженном состоянии при температуре –18 °С.

Размораживали препарат при комнатной температуре, но не выше +30 °С. Время размораживания при комнатной температуре флаконов с «Перфтораном» по 200 мл составляло 1,5–2 ч. После разморозки препарат осторожно взбалтывали до полной однородности состава, а перед инфузией согревали до +21...23 °С. Допускается пятикратное размораживание/замораживание. В размороженном виде препарат хранить в холодильнике при температуре +4 °С не более 2 недель. «Перфторан» выпускают во флаконах из стекла по 50, 100, 200 и 400 мл.

Производитель – ОАО «Научно-производственная фирма «Перфторан», 142290, Московская область, г. Пущино, Институт теоретической и экспериментальной биофизики (ИТЭБ) РАН, корпус «искусственной крови».

2.6. Эритроцитарная масса

Эритроцитарную массу (ЭМ) получали отделением части плазмы из цельной крови путем центрифугирования цельной крови с консервантом (глюгицир) при скорости вращения – 2500 об/мин в течение 25 мин и торможении – 4 мин, на центрифуге лабораторной универсальной ЦЛУ 6-3.

ЭМ хранили герметично при $t = 4-6$ °С до 10 дней. Перед использованием ЭМ подогревали до $t = 37$ °С, разводили NaCl 0,9 % 1:1 для улучшения реологических свойств [59, 60].

Введение 1 мл ЭМ на кг веса тела повышает Ht реципиента на 1 %.

Показания: гипоксические состояния организма, не усугубленные коагулопатией [89].

Состав используемой ЭМ у собак: Ht 70–80 %, плазма 20–30 %, лейкоциты $2,5-3,0 \times 10^9$ /л клеток.

Состав используемой ЭМ у кошек: Ht 60–70 %, плазма 40–60 %, лейкоциты $2,5-3,0 \times 10^9$ /л клеток [42, 59].

2.7. Кровезамещающий коллоидный раствор – препарат «Стабизол»

Коллоидные инфузионные растворы считаются наиболее эффективными системами для быстрого восполнения внутрисосудистого объема. Данные плазмозамещающие растворы поддерживают артериальное давление на необходимом уровне за счет заполнения кровяного русла [40].

Из инструкции следует, что «Стабизол» – 6 %-ный раствор гидроксиэтилкрахмала с молекулярной массой 450 тыс. и степенью замещения 0,7 (450/0,7) в 0,9 %-м растворе натрия хлорида. Теоретическая осмолярность – 300 мОсм/л, рН – 4,0–7,0. Содержит ионы натрия – 154 мМоль/л и хлора – 154 мМоль/л. Волемический эффект и его длительность в инструкции не указаны, однако ГЭК этой фармакологической группы более длительно удерживаются в кровеносном русле, чем пентакрахмалы, по некоторым данным 6–8 ч [51].

Перед переливанием обязательно проведение биологической пробы. «Стабизол» вводят внутривенно капельно. Суточная доза и скорость введения раствора зависят от уровня кровопотери или показателя гематокрита. Длительность и объем лечения зависят от продолжительности и уровня гиповолемии. Максимальная суточная доза – до 20 мл/кг массы тела с максимальной скоростью 20 мл/кг массы тела в час [51]. В первом экспериментальном исследовании «Стабизол» кошкам вводили в/в в дозе 20 мл/кг один раз в день, на 1, 2, 3, 5, 7-й день.

Выпускают препарат во флаконах по 500 мл. Срок годности – 60 мес. Хранят при температуре не выше 25 °С, защищать от замораживания [40]. Производитель «Берлин-Хеми АГ/Менарини Групп», Германия.

2.8. Кристаллоидный препарат – раствор хлорида натрия 0,9 %

Натрийсодержащие кристаллоидные растворы используются именно для увеличения объема интерстициального пространства. В сосудистом русле остается 1/5 0,9 % раствора натрия хлорида после в/в введения [47].

Из инструкции следует, что раствор NaCl 0,9 % содержит ионы натрия (154 мМоль/л) и ионы хлора (154 мМоль/л). Теоретическая осмолярность 308 мОсм/л. Несколько гипертоничен по отношению к плазме крови. Имеет слабокислую реакцию. Ионы натрия и хлора считаются важнейшими неорганическими компонентами внеклеточной жидкости, поддерживающими соответствующее осмотическое давление плазмы и внеклеточной жидкости. Раствор восполняет дефицит жидкости в организме при дегидратации. Данный препарат выпускают во флаконах по 50, 100, 200 и 400 мл [40].

В первом и втором эксперименте изотонический раствор натрия хлорида применялся животным в дозе 10 мл/кг, а также использовался для разбавления донорской ЭМ 1:1.

Производитель – ООО «Производственная фармацевтическая компания «Алиум», Россия, 143442, Московская область, Красногорский район, дер. Ангелово, завод по производству инфузионных растворов и кровезаменителей.

2.9. Статистическая обработка экспериментальных данных

Статистическую обработку данных проводили в программе Excel (Microsoft corp.) и с помощью языка статистического программирования «R». В ходе анализа рассчитывали средние арифметические значения и стандартные отклонения от среднего. Группы проверялись на нормальность распределения тестом Шапиро–Уилка. Равенство дисперсий в группах проверялось F-тестом. Гипотезу о равенстве средних значений в двух группах проверяли с помощью двустороннего критерия Стьюдента для независимых выборок. В случае неравенства дисперсий проверяли гипотезу о равенстве средних значений в двух группах с помощью непараметрического критерия Уилкоксона [35, 55]. Достоверными считались отличия с уровнем доверительной вероятности $p < 0,05$.

Глава 3. Исследования острой кровопотери и постгеморрагической анемии у животных (кошка)

3.1. Результаты исследований по коррекции острой кровопотери и постгеморрагической анемии у животных с помощью перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы

Первый блок исследований

С целью изучения эффективности перфторуглеродной эмульсии препарата «Перфторан» в сравнении с донорской эритроцитарной массой для купирования острой гипоксии при ПГА провели исследования на кошках, которые были рандомизированы на три группы: первая – контрольная; вторая – экспериментальная, с использованием газотранспортной кровозамещающей эмульсии препарата «Перфторан»; третья – с использованием донорской ЭМ.

С целью оценки изменений в организме больных животных при используемых методах лечения проводили измерения следующих показателей: гематокрит, лактат, билирубин, калий, SpO₂.

Наиболее частой причиной острой и тяжелой гипоксии организма являются острые ПГА [82, 95].

Основным методом терапии при кровопотере свыше 60 % ОЦК является трансфузия цельной крови или ЭМ, т.к. в данном случае необходимо обеспечить перенос кислорода от легких к тканям [51].

Вопрос о трансфузиях крови и ее компонентов при лечении острой ПГА в настоящее время решен неоднозначно. При проявлении анемического синдрома значение имеет не только количество Эр в ОЦК и концентрация гемоглобина, но и темпы снижения этих показателей, индивидуальная адаптационная способность организма к анемии, возраст, пол больного, сопутствующие заболевания, причина и местонахождение участка кровотечения. Данные положения связаны с

возможностью обезопасить организм больного от необоснованных гемотрансфузий и возможных серьезных осложнений [51, 89].

Существуют реципиенты с редкими группами крови. В таких случаях к вопросу использования эритроцитсодержащих сред при острой кровопотере нужно подходить, ориентируясь не только на уровень гемоглобина, уровень оксигенации тканей, но и на иммунологические особенности больного. Часто трансфузию таким реципиентам проводить опасно, тогда активно используются кислородопереносящие среды, такие как «Перфторан».

Как модель, в качестве иммунносложного реципиента, можно рассматривать кошку, т.к. использование донорских эритроцитов у данного вида животных иммунно ограничено и может представлять серьезную опасность для реципиента [89, 59].

Следовательно, встает вопрос о целесообразности использования у кошек при тяжелой анемии перфторуглеродного кровезаменителя – препарата «Перфторан», обладающего хорошей газотранспортной функцией.

Целью данных исследований является установление клинического эффекта от применения перфторуглеродного кровезаменителя – препарата «Перфторан» при острой постгеморрагической анемии у животных.

В проведенных исследованиях животным контрольной группы проводили традиционную инфузионную терапию, включающую коллоидный раствор «Стабизол» в дозе 20 мл/кг веса с дополнительной оксигенацией животных кислородом. Данный инфузионный раствор обладает выраженным вolemическим действием и поддерживает объем циркулирующей крови на физиологическом уровне, несмотря на кровопотерю [40].

В первый день у животных контрольной группы в клинической картине преобладали симптомы, характеризующие уменьшение общего объема циркулирующей крови: резкое падение артериального давления, бледность кожных покровов и видимых слизистых оболочек, тахикардия и тахипноэ. Гематологические и клинические признаки соответствовали первой стадии постгеморрагической анемии (стадия коллапса). При этом гематокрит и лактат находились в пределах нормы, а пропорциональная потеря плазмы и форменных

элементов крови не отразилась на уровне гематокрита. После внутривенной инфузии «Стабизола» в дозе 20 мл/кг животным было проведено оперативное вмешательство для устранения внутреннего кровотечения. При этом периферическая кислородная сатурация – SpO₂ у животных в наркозе составляла 81,1±4,3 %, что говорит об острой гипоксии. Здесь и далее указано среднее значение в группе и стандартное отклонение. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах. Животные тяжело выходили из наркоза, и состояние трех кошек было критическим. Таким образом, у животных контрольной группы постгеморрагическая анемия в стадии коллапса характеризуется достаточно четкой клинической картиной, не имея в то же время характерных гематологических изменений.

На второй день после кровопотери у животных контрольной группы проявлялись ярко выраженные гематологические признаки анемии: гематокрит снизился до 16,2±1,8 %, лактат повысился до 6±0,9 % ммоль/л. Периферическая кислородная сатурация – SpO₂ составляла 79,2±4 %, что говорит об острой гипоксии. Клиническая картина проявлялась в виде «фарфоровых» слизистых, одышки, угнетения, отказа от корма и тахикардии. Данные гематологические изменения характеризовали вторую стадию постгеморрагической анемии (гидремическую). Животным проводили инфузию «Стабизола» 20 мл/кг и интенсивную кислородную ингаляцию. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах.

На третий день после кровотечения у животных контрольной группы продолжались тахикардия, тахипноэ, дыхание грудобрюшного типа, анемичные слизистые, повышенная жажда, слабый аппетит. Животным проводили очередную инфузию «Стабизола» в дозе 20 мл/кг и интенсивную кислородную ингаляцию. Гематокрит находился на уровне 20±1,5 %. Лактат вырос до критического значения 7±0,8 ммоль/л. Сатурация была на уровне 80,2±4,1 %. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах.

На пятый день наблюдения за животными контрольной группы была заметна стабилизация общего состояния: улучшился аппетит, гематокрит повысился до

25,2±2,2 %, что отразилось на увеличении активности, слизистые стали бледно-розовые, исчезла тахикардия. SpO₂ повысилась 84,7±3,8 %. Лактат снизился до 5,7±0,9 ммоль/л, но при увеличении активности у животных наблюдалась одышка. Клиническая картина соответствует третьей стадии постгеморрагической анемии (стадия ретикулоцитарного криза). Животным проводили очередную инфузию «Стабизола» в дозе 20 мл/кг и интенсивную кислородную ингаляцию. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах.

На седьмой день наблюдения за животными контрольной группы гематокрит повысился до 30,8±2,9 %, лактат снизился до 2,8±0,4 ммоль/л, SpO₂ повысилась до 94,3±2,1 %. При увеличении активности одышки не было, аппетит улучшился, слизистые бледно-розовые. Животным проводили очередную инфузию Стабизола в дозе 20 мл/кг и интенсивную кислородную ингаляцию. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах.

При лечении животных второй группы с использованием «Перфторана», помимо традиционной инфузионной терапии, для уменьшения гипоксии травмированного организма вводили газотранспортный гемокорректор на основе ПФУ. «Перфторан» вводился в дозе 10 мл/кг. Введение начинали с биопробы, заключающейся в постепенном контролируемом введении: 0,1 мл препарата, разведенным 0,9 % NaCl до 5 мл, препарат вводили медленно внутривенно, а затем капельно с паузами по 60 сек. – 3, 5, 10, 30 капель, постепенно увеличивая скорость инфузии до одной капли в секунду.

Как показали исследования, на первый день у животных основной группы с «Перфтораном» гематологические показатели не изменились: гематокрит 38±4,1 %, лактат 2,6 ммоль/л, сатурация была снижена и составляла 82,7±4,3 %. Гипоксия тканей организма не успела развиваться, а пропорциональная потеря плазмы и форменных элементов крови не отразилась на уровне гематокрита. В клинической картине преобладали симптомы, связанные с уменьшением общего объема циркулирующей крови: резкое падение артериального давления, бледность кожных покровов и видимых слизистых оболочек, тахикардия и тахипноэ. Гематологические и клинические признаки соответствуют первой стадии

постгеморрагической анемии (стадия коллапса). Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах.

Для восполнения ОЦК был использован «Стабизол» в уменьшенной дозе 10мл/кг по такой же схеме, как и в контрольной группе. Для коррекции газотранспортного состава крови использовали «Перфторан» в дозе 10мл/кг. В процессе инфузии пациентам осуществляли кислородную ингаляцию. Затем животным проводили оперативное вмешательство для устранения внутреннего кровотечения. Животные удовлетворительно выходили из наркоза, их состояние было стабильным.

На второй день после кровопотери у животных основной группы с «Перфтораном», несмотря на понижающийся уровень гематокрита $15,9 \pm 1,6$ %, уровень лактата был незначительно повышен $2,7 \pm 0,3$ ммоль/л, а SpO_2 составляла $89,1 \pm 3$ % и проявляющиеся ярко выраженные признаки анемии в виде анемичных слизистых, одышки, угнетении, отказа от корма и тахикардии, уровень лактата оставались в рамках референтных значений. Для восполнения ОЦК и газотранспортного состава крови животным повторно проводили инфузию «Стабизола» в дозе 10 мл/кг и «Перфторана» в дозе 10 мл/кг, сочетая с ингаляцией кислорода. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах.

На третий день после кровотечения животные основной группы находились в удовлетворительном состоянии. Уровень лактата понизился до $2,6 \pm 0,4$ ммоль/л, несмотря на низкий уровень гематокрита $18 \pm 2,2$ %, а SpO_2 составляла $90 \pm 3,3$ %. Были заметны признаки гипоксии: тахикардия, тахипноэ, дыхание грудобрюшного типа, анемичные слизистые, повышенная жажда, слабый аппетит. В качестве лечебной помощи животным проводили инфузию «Стабизола» и «Перфторана» в той же дозе, сочетая с ингаляцией кислорода. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах.

На пятый день наблюдения за животными основной группы была заметна стабилизация состояния: улучшился аппетит, SpO_2 составляла $94,1 \pm 2,5$ %, гематокрит повысился до $21,6 \pm 2,2$ %, что отразилось на увеличении активности,

слизистые стали бледно-розовые, исчезла тахикардия. Лактат не имел тенденцию к росту и составлял $2\pm 0,3$ ммоль/л. Для закрепления положительной клинической картины животным проводили инфузию «Стабизола» и «Перфторана» в той же дозе, сочетая с ингаляцией кислорода. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах.

На седьмой день наблюдения за животными основной группы с «Перфтораном», SpO_2 составляла $95\pm 1,9$ %, гематокрит повысился до $30,8\pm 3,7$ %, лактат составил $2\pm 0,3$ ммоль/л, при увеличении активности у животных не было одышки, аппетит улучшился, слизистые бледно-розовые. Несмотря на явное улучшение клинических и биохимических показателей, животным осуществили очередную инфузию «Стабизола» и «Перфторана» в той же дозе, сочетая с ингаляцией кислорода. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах.

У животных третьей группы с использованием донорской ЭМ для лечения в первый день поступления в клинику применялась традиционная инфузионная терапия, включающая в себя использование коллоидного раствора «Стабизол» в дозе 20 мл/кг веса, а через сутки после получения травмы и кровотечения по показаниям, на основании низкого гематокрита провели трансфузию донорской ЭМ в дозе 10 мл/кг веса.

Гематокрит. В первый день у животных данной группы в клинической картине преобладали симптомы, характеризующие уменьшение общего объема циркулирующей крови. Гематологические и клинические признаки соответствовали первой стадии постгеморрагической анемии (стадия коллапса). При этом гематокрит и лактат находились в пределах нормы, а пропорциональная потеря плазмы и форменных элементов крови не отразилась на уровне гематокрита. После внутривенной инфузии «Стабизола» в дозе 20 мл/кг животным было проведено оперативное вмешательство для устранения внутреннего кровотечения. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах.

На второй день после кровопотери у животных третьей группы с ЭМ, понижающимся уровнем гематокрита до $15,1 \pm 1,3$ % и проявляющимися ярко выраженными признаками анемии, в виде анемичных слизистых, одышки, угнетении, отказа от корма и тахикардии, явилось прямым показанием для трансфузии донорской ЭМ, уровень лактата составлял $5,3 \pm 0,4$ ммоль/л. Сатурация была на низком уровне и составляла $78,7 \pm 3,7$ %. Уровень калия и билирубина в плазме крови находился в референсных пределах. После проведения трансфузии ЭМ в дозе 10 мл/кг веса состояние животных видимо улучшилось, исчезла клиническая картина гипоксии.

На третий, пятый, седьмой дни наблюдений у животных третьей группы с использованием донорской ЭМ, показатели гематокрита, лактата, сатурации стремительно улучшались, о чем свидетельствовало и существенное улучшение клинического состояния животного. Значение гематокрита на третий день составило $26 \pm 1,8$ %, к седьмому дню выросло до $34,7 \pm 0,3$ %. Лактат на третий день имел значение $3 \pm 0,3$ ммоль/л, на седьмой $2,6 \pm 0,3$ ммоль/л. Сатурация SpO_2 также улучшилась: на третий день ее значение было уже $88,7 \pm 3,3$ %, а на седьмой оно достигло $96,5 \pm 1,8$ %. Уровень калия и билирубина в плазме крови на всем протяжении наблюдений находился в референсных пределах.

По результатам исследований, в первый день достоверных отличий в значениях гематокрита между животными трех групп не выявлено.

Во второй день гематокрит у кошек существенно понизился во всех трех группах в результате гидремической стадии ПГА. Достоверных отличий у животных в трех группах не выявлено.

На третий день экспериментальных исследований при ПГА наблюдаются достоверные повышения гематокрита (Ht) у животных в третьей группе после трансфузии донорской ЭМ, $Ht = 25 \pm 1,8$ %, по сравнению с группой контроля, где $Ht = 18 \pm 2,2$ % и со второй группой с «Перфтораном», $Ht = 18 \pm 2,2$ %.

На пятый день экспериментальных исследований продолжаем наблюдать тенденцию достоверного повышения гематокрита у животных в третьей группе с

донорской ЭМ, $Ht = 30,2 \pm 2,2\%$, по сравнению с группой контроля, $Ht = 25,2 \pm 2,2\%$, и со второй группой с «Перфтораном», $Ht = 21,6 \pm 2,2\%$.

На седьмой день экспериментальных исследований достоверных отличий между тремя группами нет. Наблюдаем повышение гематокрита у животных в группе контроля до $30,8 \pm 2,9\%$, во второй группе с «Перфтораном» до $30,8 \pm 3,7\%$ и в третьей группе с донорской ЭМ до $34, \pm 3\%$.

На рисунке 12 приведены графики зависимости средних значений уровня гематокрита от дня терапии и стандартное отклонение в каждой группе ($M \pm SD$). Количество животных в каждой группе равно 10. Геометрическими знаками отмечена достоверность отличия средних значений уровня гематокрита между группами.

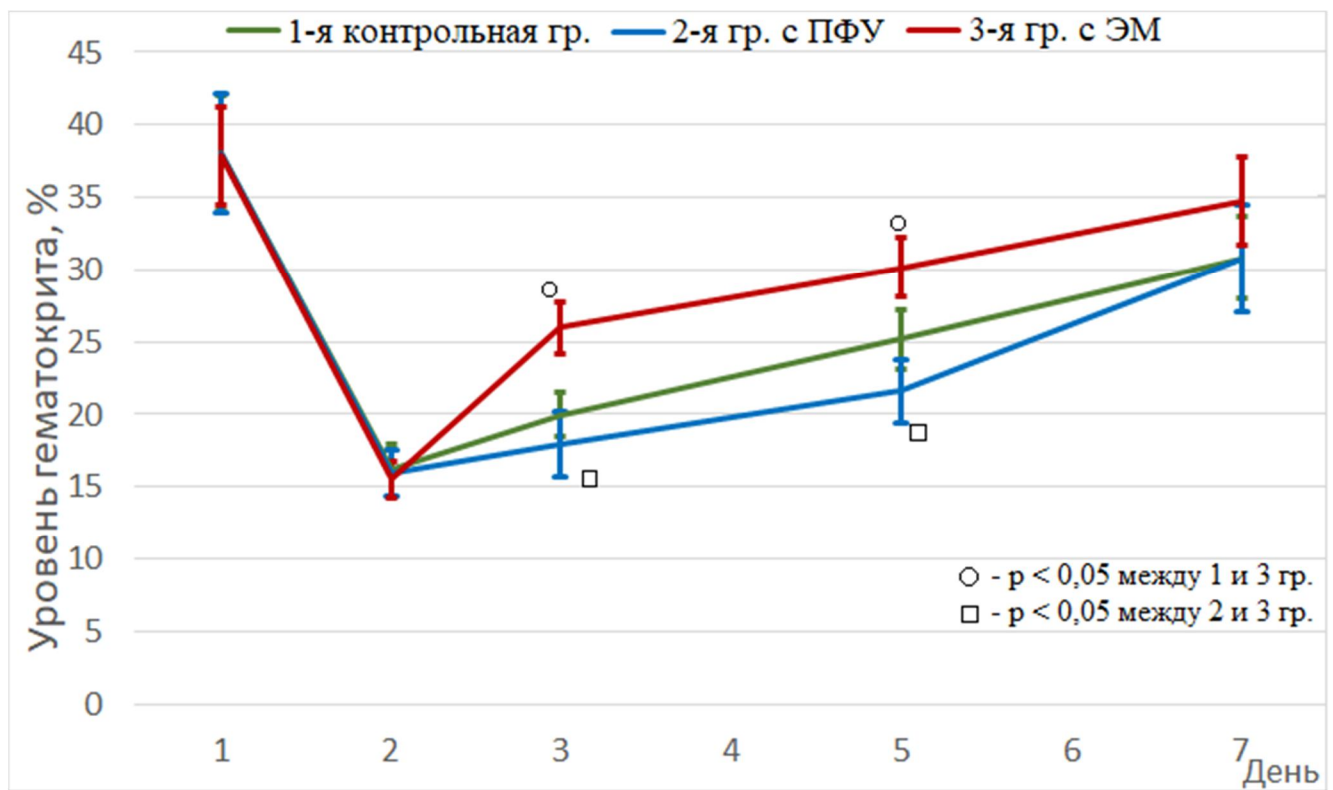


Рисунок 12. Динамика изменения гематокрита у 1-ой контрольной группы, 2-ой группы (основной) с использованием «Перфторана» и 3-й группы животных с донорской ЭМ при постгеморрагической анемии. Во всех группах $n = 10$

Самое низкое значение гематокрита у животных в трех группах при постгеморрагической анемии наблюдается во время гидремической стадии на

второй день наблюдений, при этом компенсаторные механизмы еще не успели отреагировать в должной степени, что усиливает гипоксию. На рисунке 13 представлен фотографический снимок мазка крови кошки из группы контроля при постгеморрагической анемии в гидремическую стадию на второй день после травмы.

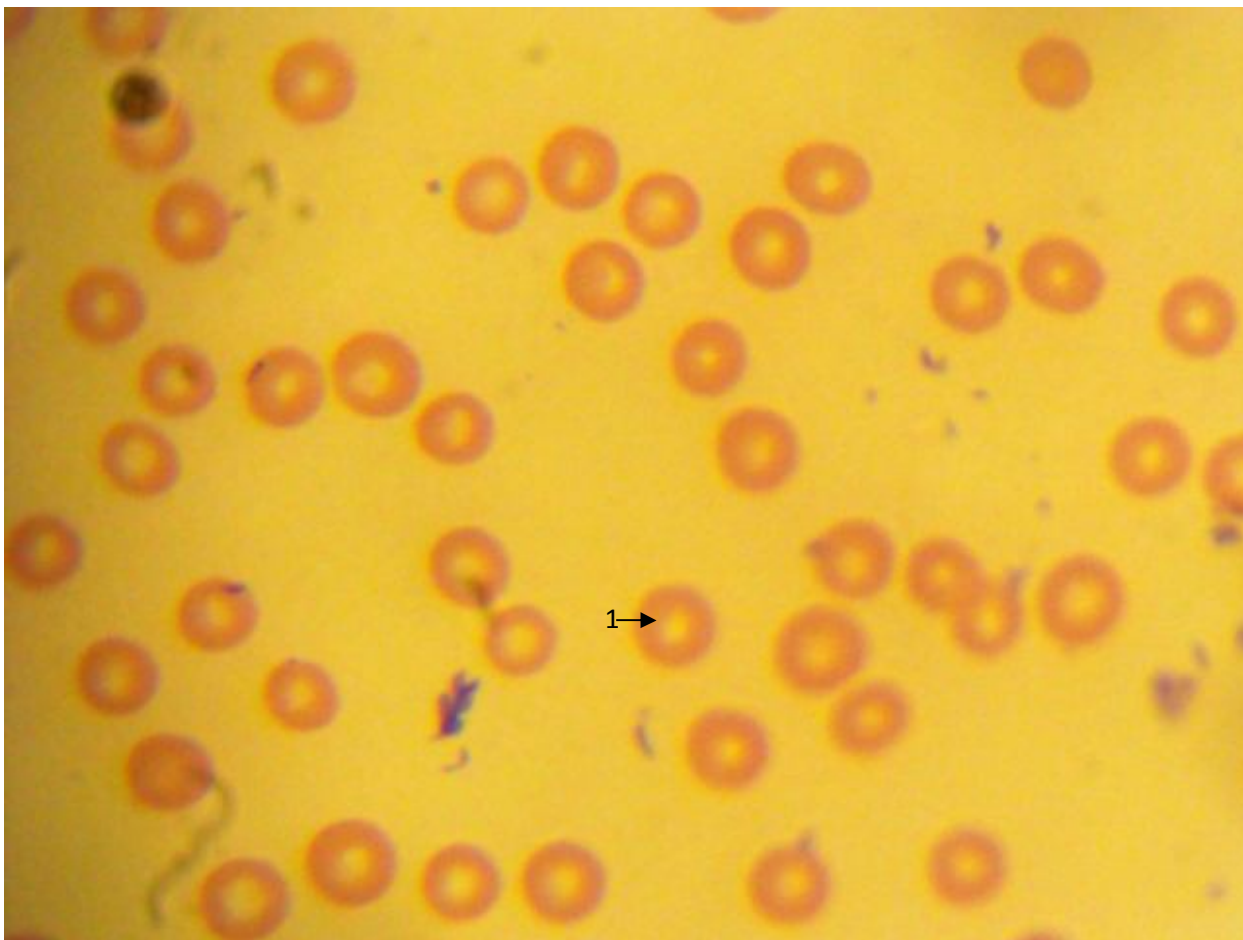


Рисунок 13. Мазок крови кошки из группы контроля при постгеморрагической анемии в гидремическую стадию на 2 день после травмы. В поле наблюдения отмечено низкое содержание эритроцитов и отсутствие ретикулоцитов, что указывает на вторую стадию постгеморрагической анемии. Краситель Дифф-Квик (соответствует методу Папэнхайма). Увеличение $\times 100$. Единицей обозначен эритроцит

К пятому дню исследований образуется большое количество ретикулоцитов, из которых активно образуются эритроциты, тем самым снижая тяжесть анемии. На рисунке 14 представлен фотографический снимок мазка крови кошки из

группы контроля при постгеморрагической анемии в стадии ретикулярного криза на седьмой день после травмы.

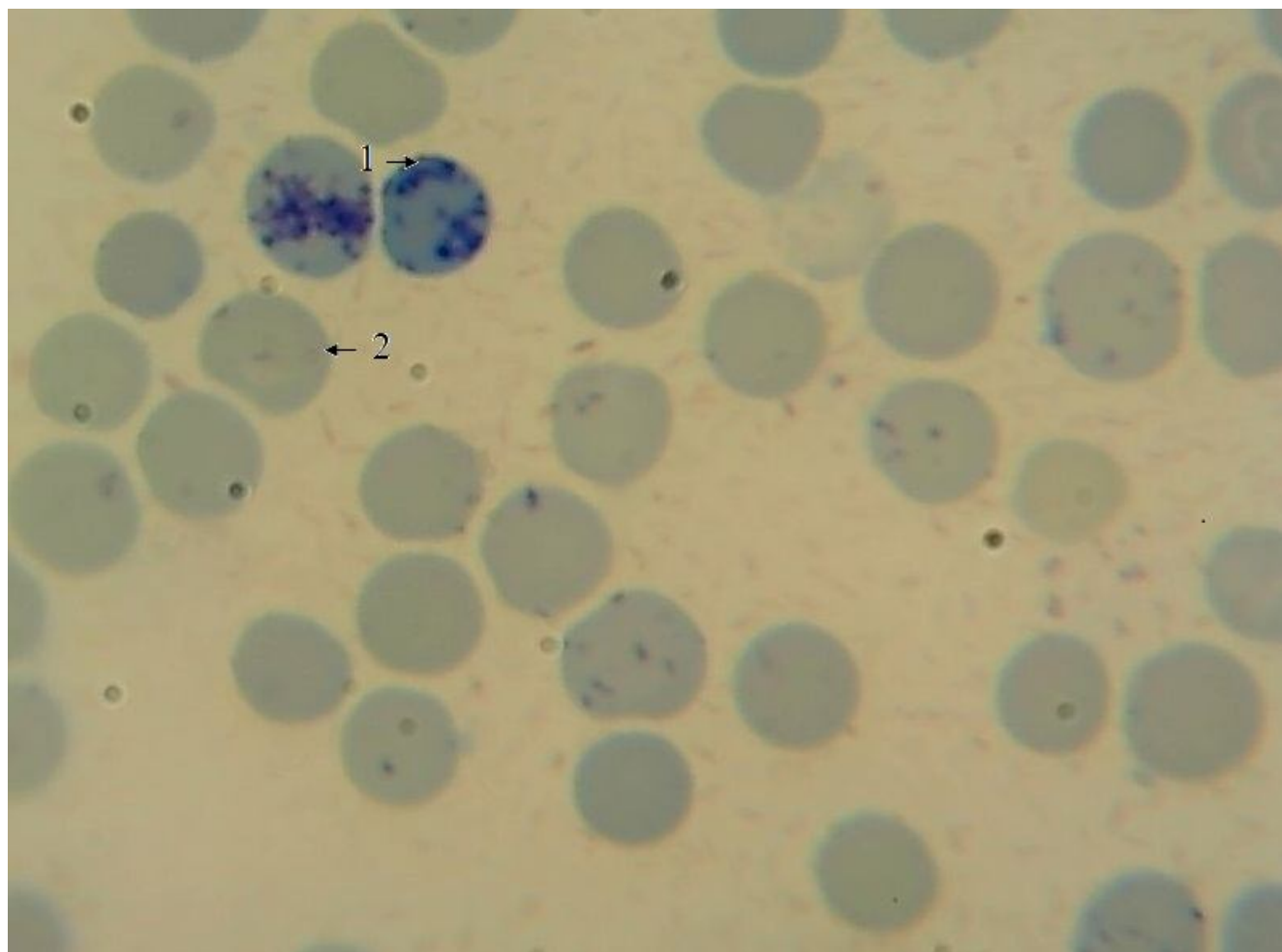


Рисунок 14. Мазок крови кошки из группы контроля при постгеморрагической анемии в стадии ретикулярного криза на 7 день после травмы. В поле наблюдения отмечено увеличение содержания эритроцитов и наличие ретикулоцитов, что указывает на купирование анемического состояния. Краситель «Раствор бриллиантового крезилового синего для окраски ретикулоцитов в крови». Увеличение $\times 100$. Обозначения: 1 – ретикулоцит, 2 – эритроцит

Лактат. По результатам исследований, в первый день достоверных отличий в значениях лактата у исследуемых животных в течение двух часов после травмы не отмечено.

Во второй день лактат у кошек во второй группе с «Перфтораном» остался в рамках референсных границ $2,7 \pm 0,3$ ммоль/л и достоверно был ниже значений лактата у группы контроля $6 \pm 0,9$ ммоль/л и третьей группы с ЭМ

$5,3 \pm 0,4$ мМоль/л. Это связано с использованием «Перфторана» с первого дня лечения животным второй группы и, несмотря на тяжелую анемию, гипоксия у кошек второй группы не отмечалась.

На третий день терапии значение лактата во второй группе на фоне «Перфторана» оставалось в рамках референсных значений и составило $2,6 \pm 0,4$ мМоль/л, что достоверно ниже значений лактата в группе контроля $7 \pm 0,8$ мМоль/л. В третьей группе животных после использования донорской ЭМ гипоксия у травмированных кошек с ПГА видимо уменьшилась, и значения лактата $3 \pm 0,3$ мМоль/л стали достоверно меньше значений лактата в группе контроля.

На пятый день терапии значение лактата во второй группе на фоне «Перфторана» оставалось в рамках референсных значений $2 \pm 0,3$ мМоль/л и достоверно было ниже значений лактата в группе контроля $5,7 \pm 0,9$ мМоль/л. В третьей группе животных с трансфузией ЭМ значения лактата $2,6 \pm 0,4$ мМоль/л достоверно меньше значений лактата в группе контроля.

На седьмой день терапии значение лактата во второй группе на фоне «Перфторана» оставалось в рамках референсных значений $1,9 \pm 0,5$ мМоль/л и достоверно было ниже значений лактата в группе контроля $2,8 \pm 0,4$ мМоль/л. В третьей группе животных с донорской ЭМ значения лактата $2,6 \pm 0,3$ мМоль/л, как в группе контроля, достигли референсных границ.

На рисунке 15 приведены графики зависимости средних значений уровня лактата от дня терапии и стандартное отклонение в каждой группе ($M \pm SD$). Геометрическими знаками отмечена достоверность отличия средних значений уровня лактата между группами. Количество животных во всех группах равно 10.

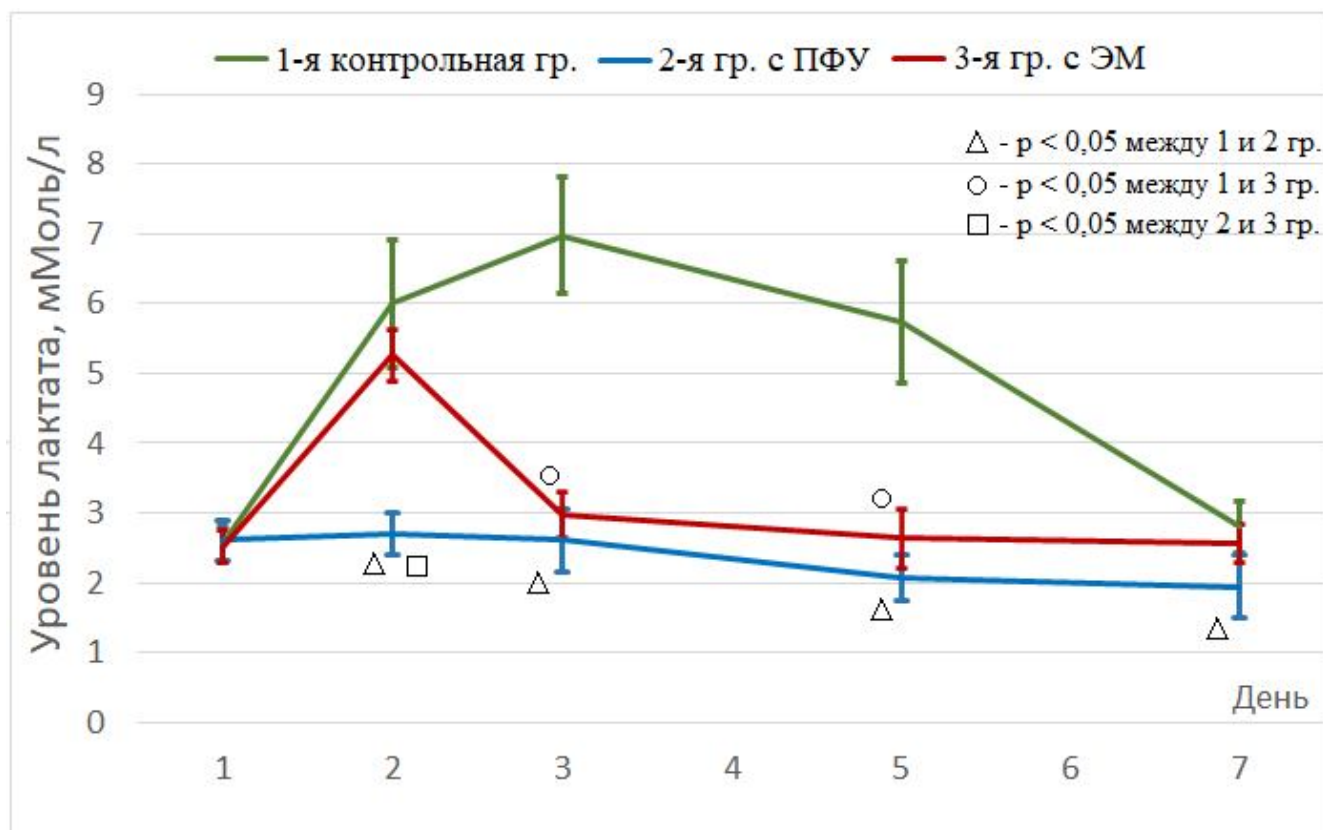


Рисунок 15. Динамика изменения лактата у 1-ой контрольной группы, 2-ой группы (основной) с использованием «Перфторана» и 3-й группы животных с донорской ЭМ при постгеморрагической анемии. Во всех группах $n = 10$

Сатурация. По результатам исследований в первый день достоверных отличий в значениях SpO_2 у поступивших животных в трех группах не отмечено. Значения SpO_2 у животных в трех группах было ниже референсных границ (рисунок 16).

Во второй день у кошек во второй группе с «Перфтораном» значения $SpO_2 = 89,1 \pm 3 \%$, что достоверно выше значений группы контроля $SpO_2 = 79,2 \pm 4 \%$ и третьей группы с ЭМ, где $SpO_2 = 78,7 \pm 3,7 \%$. Это связано с использованием «Перфторана» для животных второй группы и, несмотря на тяжелую анемию, сатурация у животных второй группы достоверно выше значений в двух других группах.

На третий день исследований при ПГА видим достоверные повышение SpO_2 у животных в третьей группе после трансфузии донорской ЭМ $88,7 \pm 3,3 \%$, по сравнению с группой контроля $80,2 \pm 4,1 \%$. Во второй группе с «Перфтораном» значение $SpO_2 = 90 \pm 3,3 \%$ достоверно выше значений SpO_2 у животных группы

контроля. Это обусловлено заместительной терапией при гипоксии в результате тяжелой ПГА у животных второй и третьей группы.

На пятый день исследований видим достоверные повышение SpO_2 у животных в третьей группе с трансфузией донорской ЭМ, $SpO_2 = 93,8 \pm 2,9 \%$, по сравнению с группой контроля, где $SpO_2 = 84,7 \pm 3,8 \%$. Во второй группе с «Перфтораном» значение $SpO_2 = 94,1 \pm 2,5 \%$ достоверно выше значений SpO_2 у животных группы контроля и не отличается от третьей группы.

На седьмой день исследований при ПГА видим, что значения SpO_2 у животных в третьей группе после трансфузии донорской ЭМ во второй группе с «Перфтораном» и значения SpO_2 у животных группы контроля равномерно повышаются при отсутствии достоверных отличий, что обусловлено активным регенераторным ответом.

На рисунке 16 приведены графики зависимости средних значений уровня SpO_2 от дня терапии и стандартное отклонение в каждой группе ($M \pm SD$). Количество животных во всех группах равно 10. Геометрическими знаками отмечена достоверность отличия средних значений уровня SpO_2 между группами.

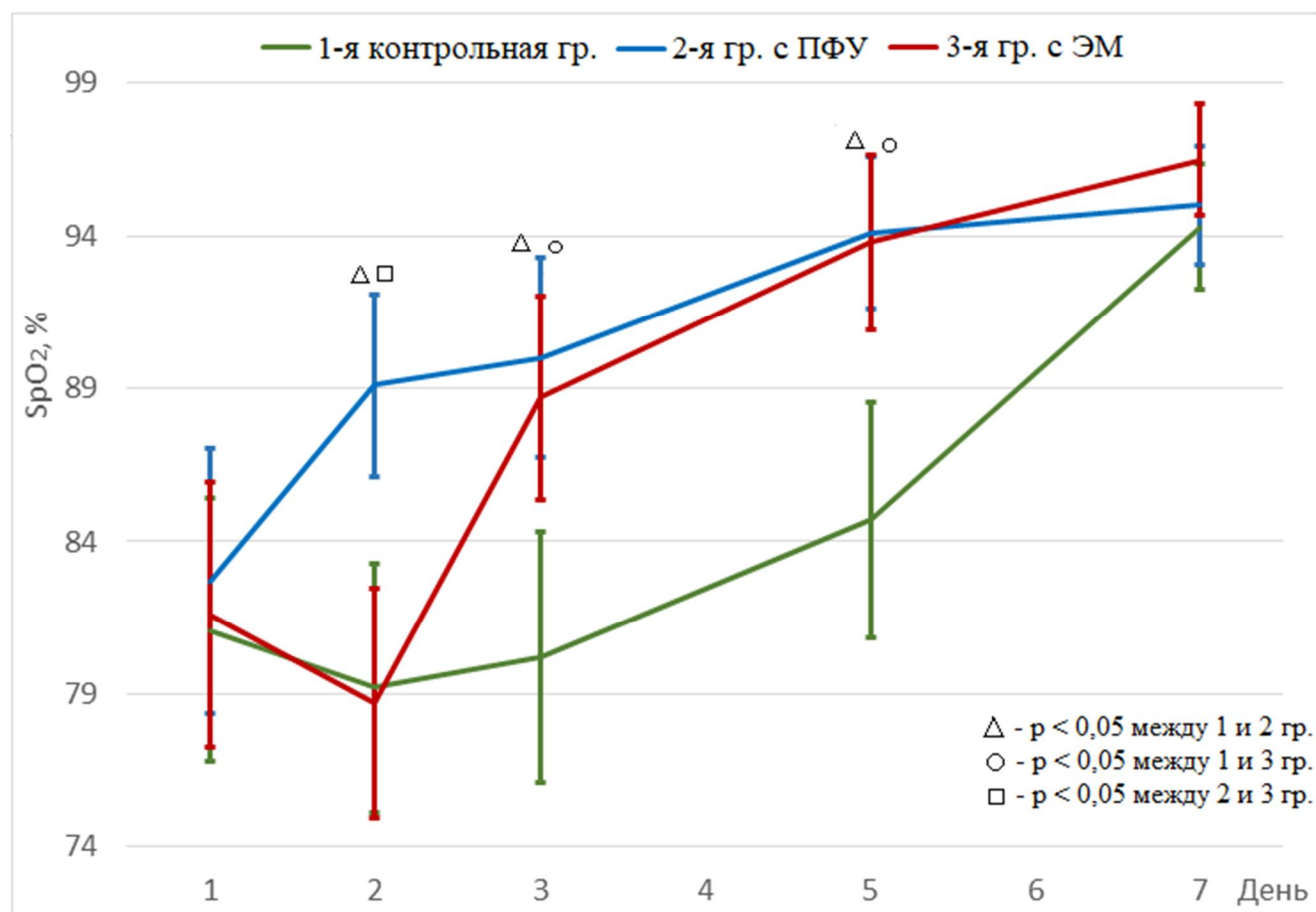


Рисунок 16. Динамика изменения сатурации SpO₂ у 1-ой контрольной группы, 2-ой группы (основной) с использованием «Перфторана» и 3-й группы животных с донорской ЭМ при постгеморрагической анемии. Во всех группах n = 10

Калий. По результатам исследований, на протяжении семи дней лечения животных при ПГА достоверных отличий в значениях калия в первой контрольной группе, во второй с использованием газотранспортной кровозамещающей эмульсии препарата «Перфторан» и в третьей группе кошек с трансфузией донорской ЭМ не отмечено. Значения калия у животных в трех группах на протяжении семи дней экспериментальных исследований находилось в рамках референсных границ.

На рисунке 17 приведены графики зависимости средних значений уровня калия от дня терапии и стандартное отклонение в каждой группе (M±SD). Количество животных во всех группах равно 10. Достоверных отличий не наблюдалось.

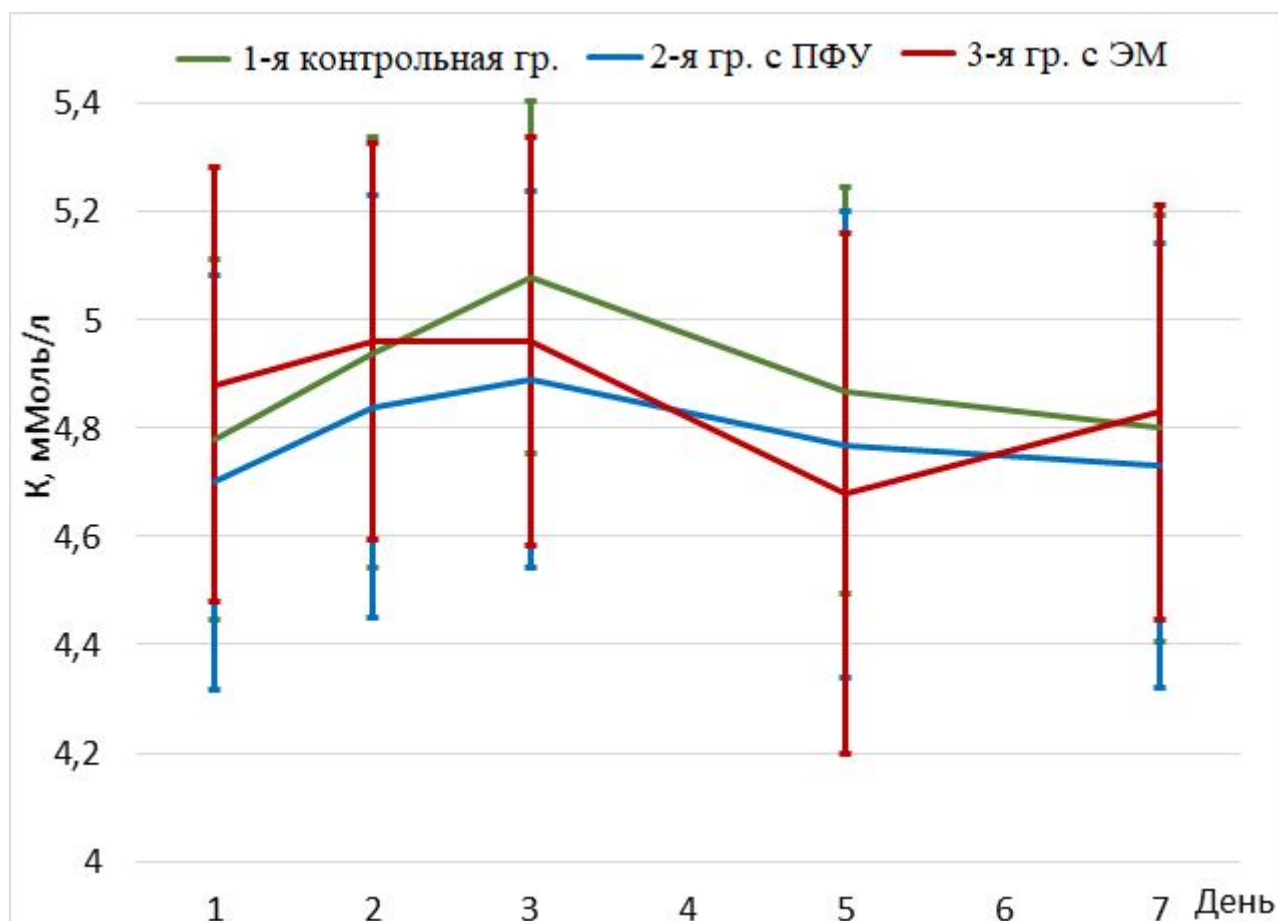


Рисунок 17. Динамика изменения калия у 1-ой контрольной группы, 2-ой группы (основной) с использованием «Перфторана» и 3-й группы животных с донорской ЭМ при постгеморрагической анемии. Во всех группах $n = 10$. Достоверных отличий нет

Билирубин. По результатам исследований, на протяжении семи дней лечения животных при ПГА достоверных отличий в значениях билирубина в первой контрольной группе, во второй с использованием газотранспортной кровозамещающей эмульсии препарата Перфторан, и в третьей группе кошек с трансфузией донорской ЭМ не отмечено. Значения билирубина у животных в трех группах на протяжении семи дней исследований находилось в рамках референсных границ.

На рисунке 18 приведены графики зависимости средних значений уровня билирубина от дня терапии и стандартное отклонение в каждой группе ($M \pm SD$). Количество животных во всех группах равно 10.

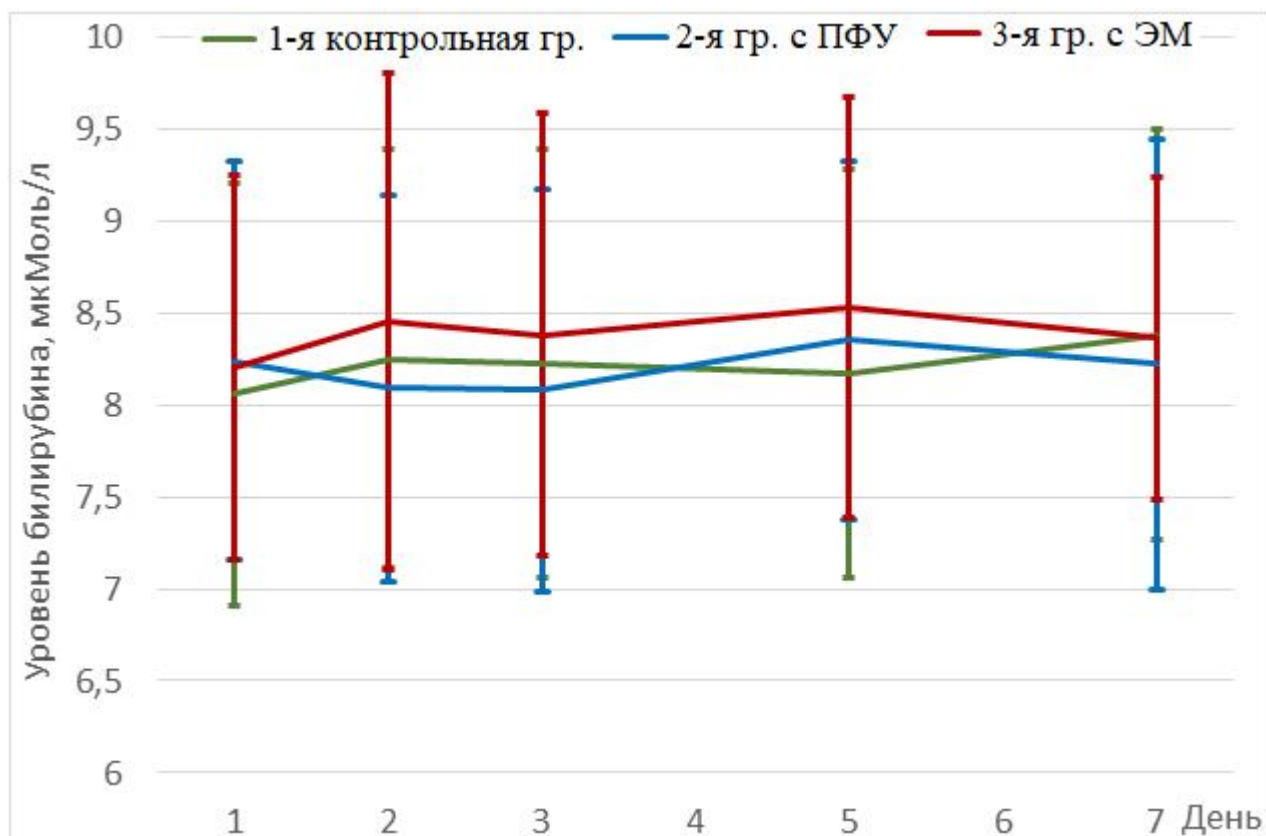


Рисунок 18. Динамика изменения билирубина у 1-ой контрольной группы, 2-ой группы (основной) с использованием «Перфторана» и 3-й группы животных с донорской ЭМ при постгеморрагической анемии. Во всех группах $n = 10$. Достоверных отличий нет

3.2. Обсуждения результатов исследований по острой кровопотере и постгеморрагической анемии у животных с использованием перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы

В данном разделе обсуждаются результаты исследований в динамике у контрольной группы животных, основной группы с использованием «Перфторана» и группы животных с использованием донорской ЭМ по следующим показателям: гематокриту, лактату, билирубину, калию и SpO_2 .

Гематокрит. Как показали исследования, пропорциональная потеря плазмы и форменных элементов крови в результате кровотечения не отразилась на уровне гематокрита в первый день наблюдений. Во второй день в трех группах животных наблюдали сильное падение гематокрита, что связано с увеличением жидкой части крови, с целью поддержания давления в сосудистом русле и наступления гидремической стадии ПГА, при которой гематокрит сильно снижается (рисунок 12).

В последующие дни наблюдений гематокрит изменялся в зависимости от стадии постгеморрагической анемии и имел тенденцию к постепенному росту в группе контроля и во второй группе с «Перфтораном».

В третьей группе после трансфузии донорских эритроцитов наблюдается более активная динамика по восстановлению красных клеток крови. На седьмой день лечения уровень гематокрита поднимается к референсным границам у всех трех групп, что говорит о сильных компенсаторных силах организма животных при ПГА, т.к. к седьмому дню лечения после острой кровопотери идет активное образование молодых Эр из ретикулоцитов (таблица 6).

Таблица 6. Динамика изменения гематокрита у 1-ой контрольной группы, 2-й группы – основной с «Перфтораном» и 3-й группы животных с донорской эритроцитарной массой при постгеморрагической анемии

Показатель	Группа	1 день	2 день	3 день	5 день	7 день
Ht (%)	1 группа (контроль)	38,1 ± 4	16,2 ± 1,8	20 ± 1,5	25,2 ± 2,0	30,8 ± 2,9
M±SD n = 10	2 группа (Перфторан)	38 ± 4,1	15,9 ± 1,6	18 ± 2,2 [□]	21,6 ± 2,2 [□]	30,8 ± 3,7
	3 группа (ЭМ)	37,9 ± 3,4	15,1 ± 1,3	26 ± 1,8 [○]	30,2 ± 2 [○]	34,7 ± 3

Прим. В таблице используются следующие условные обозначения: ○ – достоверное отличие 3-й группы от контрольной при $p < 0,05$; □ – достоверное отличие 2-й группы от 3-й при $p < 0,05$

Лактат. Лактат является основным критерием оценки степени гипоксии клеток как *in vitro*, так и *in vivo* [5, 79]. Уровень лактата в гидремической стадии, т.е. через 48 ч после кровопотери, возрастал выше референтных значений и имел тенденцию к росту в первой контрольной группе, что свидетельствует о нарастающей гипоксии тканей травмированного животного, и только через семь дней после получения травмы уровень лактата понижался до референсных значений, что связано с увеличением эритроцитов и уменьшением гипоксии тканей. В результате развития постгеморрагической анемии у травмированных животных включаются собственные эндогенные механизмы компенсации, что позволяет организму восстановить утраченный объем эритроцитов и сохранить жизнеспособность. Но в гидремическую стадию животные группы контроля находились в тяжелом состоянии с ярко выраженными признаками гипоксии. Именно в эту стадию наблюдается высокая летальность (таблица 7).

Животным третьей группы на второй день терапии после установленного низкого значения гематокрита провели трансфузию донорской ЭМ, после чего гипоксия видимо уменьшилась и значения лактата были в рамках референсных границ.

Как показали проведенные исследования, при введении «Перфторана» значения уровня лактата в основной группе были достоверно ниже с первого

дня терапии. Это связано с газотранспортными свойствами перфторэмульсии – основы препарата «Перфторан».

Таким образом, в основной группе животных, т.е. в группе, где, помимо традиционной инфузионной терапии, вводили «Перфторан», уровень лактата на протяжении семи дней оставался в пределах референсных значений, несмотря на низкий уровень эритроцитов, что указывало на отсутствие тканевой гипоксии. Тогда как в группе контроля, где проводили только традиционную инфузионную терапию, включающую коллоидный раствор «Стабизол», уровень лактата достигал критических значений, при которых животные находились в тяжелом состоянии с ярко выраженными признаками гипоксии. В таблице 7 приведены результаты исследований лактата в трех группах животных.

Таблица 7. Динамика изменения лактата у 1-ой контрольной группы, 2-й группы – основной с «Перфтораном» и 3-й группы животных с донорской эритроцитарной массой при постгеморрагической анемии

Показатель	Группа	1 день	2 день	3 день	5 день	7 день
Лактат, ммоль/л, M±SD n = 10	1 группа (контроль)	2,6± 0,3	6± 0,9	7± 0,8	5,7± 0,9	2,8± 0,4
	2 группа (Перфторан)	2,6± 0,3	2,7± 0,3 ^{Δ□}	2,6± 0,4 ^Δ	2± 0,3 ^Δ	1,9± 0,5 ^Δ
	3 группа (ЭМ)	2,5± 0,2	5,3± 0,4	3± 0,3 [○]	2,6± 0,4 [○]	2,6± 0,3

Прим. В таблице используются следующие условные обозначения: Δ – достоверное отличие 2-й группы от контрольной при $p < 0,05$; ○ – достоверное отличие 3-й группы от контрольной при $p < 0,05$; □ – достоверное отличие 2-й группы от 3-й при $p < 0,05$

Сатурация. В результате изменений SpO_2 у животных в трех группах мы видим возрастающие значения сатурации на протяжении 7 дней лечения, при этом в результате коррекции гипоксии у животных второй группы с «Перфтораном» и третьей группы с трансфузией донорской ЭМ значение SpO_2 достоверно возрастают, по сравнению с группой контроля, и гипоксия перестает быть угрожающей, так как кислородопереносящие субстанции существенно снижают гипоксию организма [99]. После проведения трансфузии донорской ЭМ значение сатурации у животных во второй и третьей группах достоверных отличий не имеет, при этом достоверно отличается от группы контроля, что указывает на тяжелую гипоксию у животных

при постгеморрагической анемии без использования кислородопереносящих препаратов (таблица 8).

Таблица 8. Динамика изменения SpO₂ у 1-ой контрольной группы, 2-й группы – основной с «Перфтораном» и 3-й группы животных с донорской эритроцитарной массой при постгеморрагической анемии

Показатель	Группа	1 день	2 день	3 день	5 день	7 день
SpO ₂ , %	1 группа (контроль)	81,1 ± 4,3	79,2 ± 4	80,2 ± 4,1	84,7 ± 3,8	94,3 ± 2,1
M ± SD	2 группа (Перфторан)	82,7 ± 4,3	89,1 ± 3 ^{Δ□}	90 ± 3,3 ^Δ	94,1 ± 2,5 ^Δ	95 ± 1,9
n = 10	3 группа (ЭМ)	81,6 ± 4,3	78,7 ± 3,7	88,7 ± 3,3 [○]	93,8 ± 2,9 [○]	96,5 ± 1,8

Прим. В таблице используются следующие условные обозначения: Δ – достоверное отличие 2-й группы от контрольной при $p < 0,05$; ○ – достоверное отличие 3-й группы от контрольной при $p < 0,05$; □ – достоверное отличие 2-й группы от 3-й при $p < 0,05$

Калий. По результатам исследований, на протяжении семи дней лечения животных при ПГА достоверных отличий в значениях калия в первой контрольной группе, во второй с использованием газотранспортной кровозамещающей эмульсии препарата «Перфторан» и в третьей группе кошек с трансфузией донорской ЭМ не отмечено. Значения калия у животных в трех группах на протяжении семи дней экспериментальных исследований находились в рамках референсных границ (таблица 9). Это обусловлено тем, что калий, являясь внутриклеточным микроэлементом, содержится в клетках, в том числе и в Эр, и когда происходит внешнее или внутреннее кровотечение, калий не выходит из эритроцитов в плазму крови, т.к. они не разрушаются в большом количестве, как это бывает при внутрисосудистом гемолизе.

Таблица 9. Динамика изменения калия у 1-ой контрольной группы, 2-й группы – основной с «Перфтораном» и 3-й группы животных с донорской эритроцитарной массой при постгеморрагической анемии (достоверный отличий нет)

Показатель	Группа	1 день	2 день	3 день	5 день	7 день
Калий, ммоль/л, M±SD n = 10	1 группа (контроль)	4,8 ± 0,3	4,9 ± 0,4	5 ± 0,3	4,9 ± 0,4	4,8 ± 0,4
	2 группа (Перфторан)	4,7 ± 0,4	4,8 ± 0,4	4,9 ± 0,3	4,8 ± 0,4	4,7 ± 0,4
	3 группа (ЭМ)	4,9 ± 0,4	5 ± 0,4	5 ± 0,4	4,7 ± 0,5	4,8 ± 0,4

Билирубин. По результатам исследований, на протяжении семи дней лечения животных при ПГА достоверных отличий в значениях билирубина в первой контрольной группе, во второй с использованием газотранспортной кровозамещающей эмульсии препарата «Перфторан» и в третьей группе кошек с трансфузией донорской ЭМ не отмечено. Значения билирубина у животных в трех группах на протяжении семи дней экспериментальных исследований находилось в рамках референсных границ (таблица 10). Это обусловлено тем, что в экспериментальном исследовании в группы не включались кошки с травмами печени, а при внешнем или внутреннем кровотечении эритроциты не разрушаются в большом количестве в организме больного, и свободный гемоглобин, из которого образуется непрямой билирубин, не накапливается в плазме крови, как это бывает при аутоиммунном гемолизе.

Таблица 10. Динамика изменения билирубина у 1-ой контрольной группы, 2-й группы – основной с «Перфтораном» и 3-й группы животных с донорской эритроцитарной массой при постгеморрагической анемии

Показатель	Группа	1 день	2 день	3 день	5 день	7 день
Билирубин, мкмоль/л M±SD n = 10	1 группа (контроль)	8,1 ± 1,1	8,3 ± 1,1	8,2 ± 1,2	8,2 ± 1,1	8,4 ± 1,1
	2 группа (Перфторан)	8,2 ± 1,1	8,1 ± 1	8,1 ± 1,1	8,4 ± 1	8,2 ± 1,2
	3 группа (ЭМ)	8,2 ± 1	8,5 ± 1,4	8,4 ± 1,2	8,5 ± 1,14	8,4 ± 0,9

Особого внимания заслуживает тот факт, что при проведении данного исследования проявление побочных реакций на введение «Перфторана» было отмечено у 7% кошек. Клинические признаки проявлялись в виде аллергической реакции: кожный зуд, озноб, удушье, гипертермия, тахикардия. Аллергическая реакция проявилась в виде внезапного, молниеносно развивающегося синдрома. Для профилактики подобных аллергических реакций у животных нами разработана простая схема предварительной премедикации: животным перед введением «Перфторана» внутривенно вводится 10 % раствор глюконата кальция из расчёта 1 мл/10 кг веса и димедрол 1 % раствор из расчета 0,1 мл/кг веса.

Летальность животных в группах при коррекции острой кровопотери и постгеморрагической анемии с помощью препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массой существенно различалась (таблица 11).

Таблица 11. Летальность животных в группах при коррекции острой кровопотери и постгеморрагической анемии с помощью «Перфторана» и донорской эритроцитарной массой в течение 5 дней исследований

Группы	Исходное кол-во животных	Время наблюдения (дни)				Общая летальность
		1	2	3	5	
1 группа Контроль	18	3	2	2	1	8 из 18 (44,4 %)
2 группа (Перфторан)	11	1	–	–	–	1 из 11 (9,9 %)
3 группа (ЭМ)	13	2	1	–	–	3 из 13 (23,1 %)

Полученные данные показывают:

- наиболее высокая летальность у кошек наблюдается без коррекции гипоксии при лечении тяжелой ПГА и составляет 44,4 %, преимущественно гибель наблюдается в стадии сосудистого коллапса и в гидремическую стадию, когда гипоксия наиболее тяжелая;
- у животных, которым для коррекции гипоксии при постгеморрагической анемии использовали донорскую ЭМ или «Перфторан», летальность

наблюдалась ниже (23,1 и 9,9 %, соответственно), преимущественно гибель животных наблюдалась на первый и второй день исследования, в стадии сосудистого коллапса, несмотря на коррекцию гипоксии (рисунок 19).

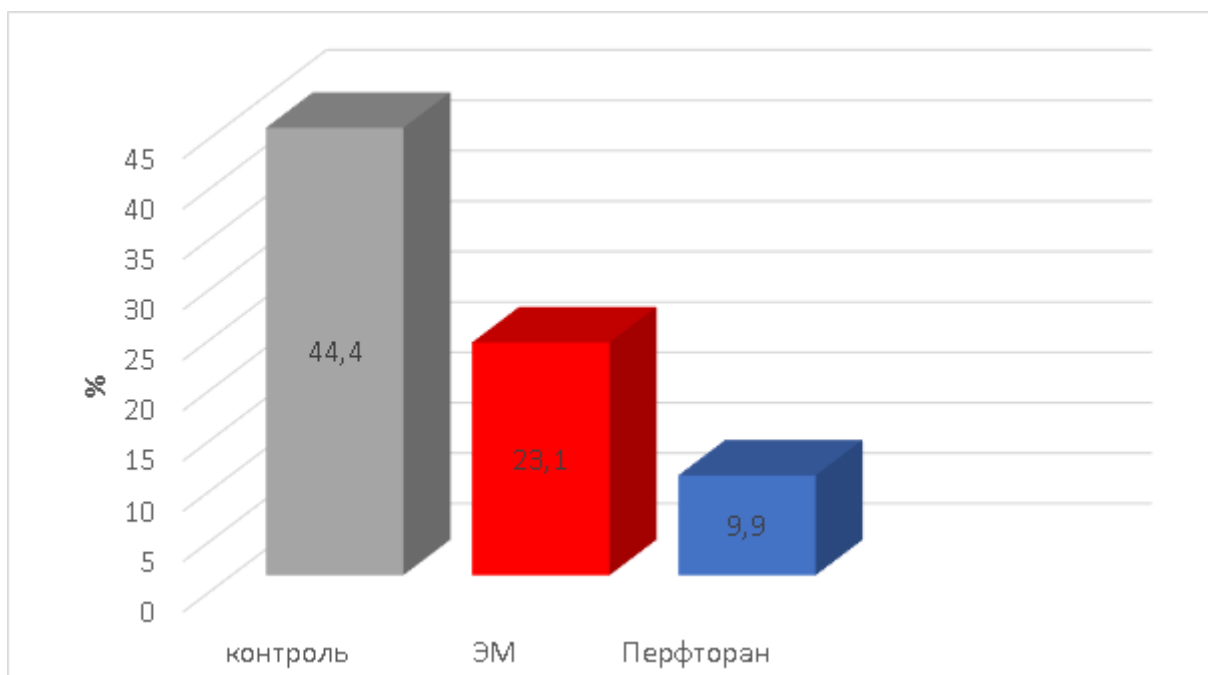


Рисунок 19. Летальность животных (кошка) при коррекции острой кровопотери и постгеморрагической анемии с помощью «Перфторана» и донорской эритроцитарной массой за 5 дней исследований

Данные по летальности показывают, что коррекция гипоксии при тяжелой ПГА необходима и должна быть проведена незамедлительно.

На основании полученных данных по коррекции острой кровопотери и постгеморрагической анемии у животных с помощью газотранспортной кровозамещающей эмульсии – препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы можно сделать следующие выводы:

- 1) показано, что контрольная группа животных с постгеморрагической анемией, возникшей в результате кровопотери, получившая в составе комплексной терапии стандартный раствор препарата «Стабизол» – плазмозаменитель, обладающий коллоидно-осмотическим давлением, но без функции переноса газов, испытывала стойкую гипоксию, сохраняющуюся до 7 дня;
- 2) выявлено, что опытная группа животных с постгеморрагической анемией, возникшей в результате кровопотери, получившая в составе комплексной

терапии ЭМ, несмотря на значительную кровопотерю, имела показатели, характеризующие умеренный уровень гипоксии, достоверно отличающиеся от показателей животных контрольной группы;

- 3) показано, что опытная группа животных с постгеморрагической анемией, возникшей в результате кровопотери, получившая в составе комплексной терапии газотранспортный заменитель донорской крови препарат «Перфторан», несмотря на значительную кровопотерю, имела показатели, характеризующие умеренный уровень гипоксии, достоверно отличающиеся от показателей животных контрольной группы и не отличающиеся от показателей животных группы после трансфузии донорской ЭМ;
- 4) выявлено, что при использовании газотранспортного заменителя донорской крови препарата «Перфторан» при купировании анемии побочные реакции возникли у одного из десяти животных и были благополучно купированы;
- 5) выявлено, что при использовании донорской эритроцитарной массы при купировании анемии побочных реакции не возникало;
- 6) показано, что для коррекции гипоксии при постгеморрагической анемии у животных, которым ввели «Перфторан» или донорскую ЭМ, летальность наблюдалась ниже (9,9 и 23,1 %, соответственно), по сравнению с группой контроля, в которой летальность 44,4 % и гипоксия не компенсировалась.

Как показали данные исследования, инфузия газотранспортного перфторуглеродного кровозамещающего препарата «Перфторан», проведенная животным при постгеморрагической анемии для компенсации гипоксического состояния, обеспечивает кислородный резерв и позволяет травмированному организму, получившему серьезные повреждения, стабильно перенести наркоз, оперативное вмешательство, что в совокупности снижает летальность в послеоперационный период, и препарат может быть рекомендован для использования животным при постгеморрагической анемии.

Глава 4. Исследования при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе у животных (собака)

4.1. Результаты исследований по коррекции анемии у животных, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, с помощью перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы

Второй блок исследований

С целью изучения эффективности перфторуглеродной эмульсии - препарата «Перфторан» в сравнении с донорской эритроцитарной массой, для купирования острой гипоксии при ОАИВСГ провели исследования на собаках, которые были рандомизированы на три группы: первая – контрольная; вторая – с использованием донорской ЭМ; третья – с использованием перфторуглеродной эмульсии препарата «Перфторан».

Для оценки изменений в организме больных животных при используемых методах лечения проводили измерения следующих показателей: гематокрит, лактат, билирубин, калий, SpO₂.

В данном исследовании использовали 30 собак обоих полов с анемией, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, проявившимся в результате бабезиоза.

Диагноз бабезиоз был установлен на основе результатов микроскопии мазков крови [42], где обнаруживали гемопаразитов *Babesia*.

На рисунке 20 представлена микроскопическая картина, полученная нами при бабезиозе собак. Отчетливо видно на фотографическом снимке мазка крови собаки внутриэритроцитарные включения в виде бабезий, окрашенных в синий цвет. Анализ сделан по методу Папэнхайма с использованием красителя Дифф-Квик. На снимке видны эритроциты с включениями внутриэритроцитарных простейших *Babesia canis canis*.



Рисунок 20. Мазок крови собаки при бабезиозе. Краситель Дифф-Квик (соответствует методу Папэнхайма). Увеличение $\times 100$. Единицей обозначены эритроциты с включениями внутриэритроцитарных простейших *Babesia canis canis*

Клиническая картина при бабезиозе собак, осложненном ОАИВСГ, является классической для ОАИВСГ. При развитии данной патологии у больных собак отмечают: гемоглинурию, регенераторную анемию, признаки печеночной, а в тяжелых случаях и почечной недостаточности [52, 89]. Внутрисосудистая паразитемия является причиной как внутрисосудистого, так и внесосудистого гемолиза. Признаки аутоиммунной природы гемолиза можно наблюдать при микроскопии мазков крови – сфероциты, тельца Жолли внутри эритроцитов (рисунок 21).

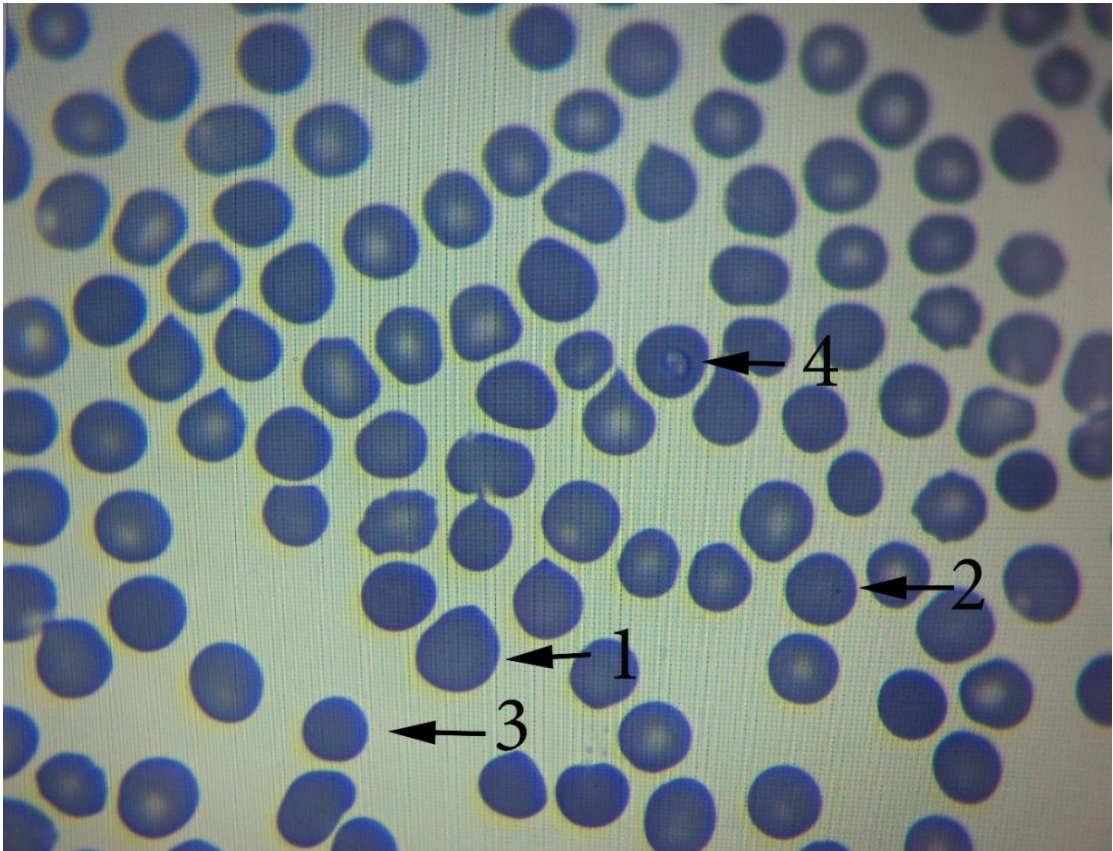


Рисунок 21. Мазок крови собаки с ОАИВСГ. Краситель Дифф-Квик (соответствует методу Папэнхайма). Увеличение $\times 100$. Обозначения: 1 – нормальный эритроцит; 2 – эритроцит с тельцами Жолли; 3 – сфероцит; 4 – эритроцит, пораженный бабезией

На рисунке 21 представлен фотографический снимок мазка крови собаки с диагнозом бабезиоз, в данном случае осложненный АИГА. Препарат также получен методом Папэнхайма с использованием красителя Дифф-Квик. На снимке отчетливо можно видеть эритроциты, пораженные бабезиями, также на данном снимке видны сфероциты и эритроциты с включениями телец Жолли, что свидетельствует о развивающемся АИ гемоллизе Эр.

Спленомегалия при бабезиозе собак появляется как результат гиперплазии системы мононуклеарных фагоцитов. Эритроциты в селезенке повреждаются фагоцитами, в результате чего эритроцит с поврежденной мембраной пытается восстановить свой цитоскелет и приобретает шаровидную форму, так образуются сфероциты [59, 73].

Гемолитический кризис при бабезиозе вызывает анемическую гипоксию и метаболический ацидоз [74, 119]. В результате быстрого разрушения большого

количества эритроцитов и ацидоза происходит повышение концентрации калия в плазме крови, что нарушает трансмембранные потенциалы клеток и может приводить к гибели животных в результате аритмии [42, 109]. Бабезиоз собак может быть классифицирован на неосложненную и осложненную форму. Осложненные формы обычно представлены признаками ОАИВСГ и тяжелой анемией, сопровождающейся агглютинацией эритроцитов, в результате активации системы комплимента и IgM [86, 89]. В результате агглютинации Эр образуются монетные столбики, которые отчетливо видны при микроскопии мазков крови (рисунок 22). Образующиеся конгломераты Эр перекрывают капиллярное русло, что приводит к нарушению работы внутренних органов. Данное патологическое состояние усугубляется при трансфузии донорских Эр реципиенту с АИГА [1, 76].

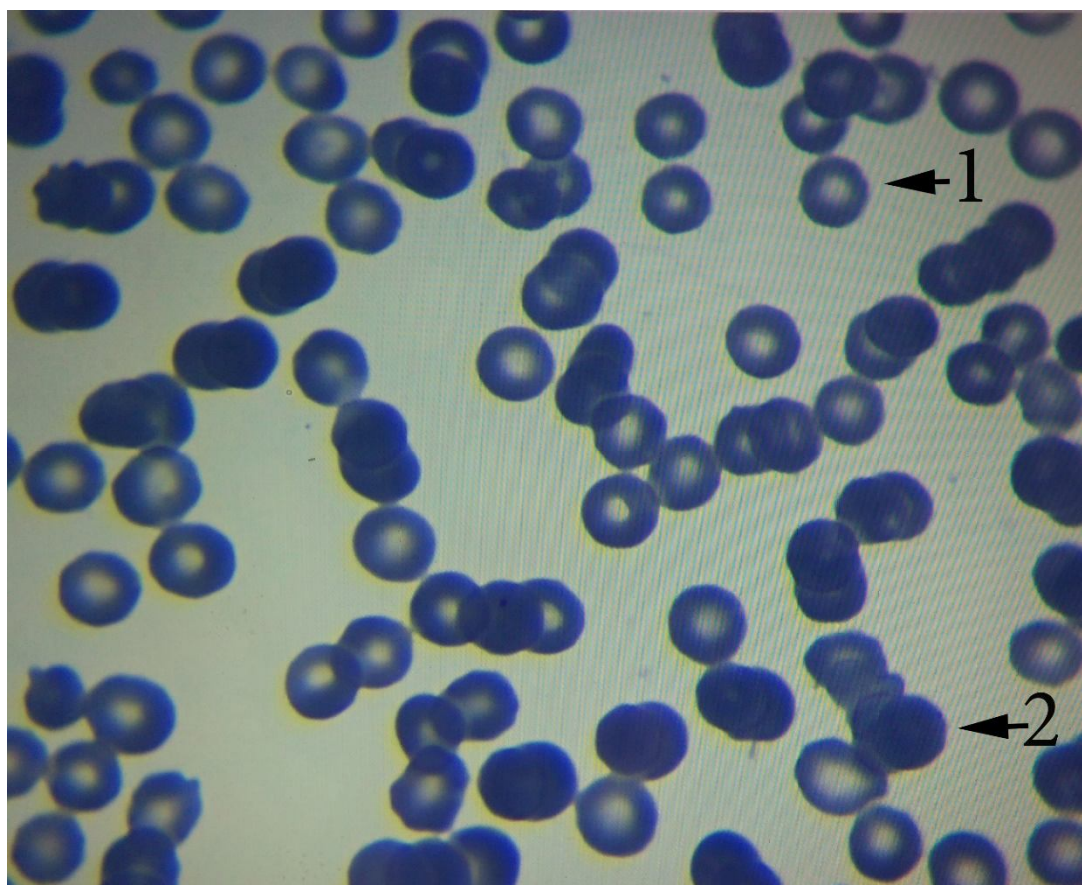


Рисунок 22. Мазок крови собаки с ОАИВСГ. Краситель Дифф-Квик (соответствует методу Папэнхайма). Увеличение $\times 100$. Обозначения: 1 – нормальный эритроцит; 2 – агглютинация эритроцитов в виде монетных столбиков

С целью изучения эффективности газотранспортной кровозамещающей эмульсии препарата «Перфторан», по сравнению с трансфузией донорской ЭМ, в данном экспериментальном исследовании провели сравнение данных методов лечения.

Животным первой контрольной группы, в первый день обращения при обнаружении паразитов в эритроцитах мазка периферической крови был поставлен диагноз бабезиоз и проведен базовый курс терапии, который не включал препараты для коррекции гипоксии. Собакам вводили преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, который используется в качестве иммуносупрессора, в качестве дезинтоксикационного раствора в/в вводили NaCl 0,9 % – 10 мл/кг, противопаразитарную терапию осуществили введением препарата «Пиро-Стоп» п/к 0,5 мл/10 кг, проводили интенсивную кислородную ингаляцию.

В первый день у животных контрольной группы в клинической картине преобладали симптомы, характеризующиеся уменьшением циркулирующих эритроцитов в результате ОАИВСГ: бледность и желтушность кожных покровов, видимых слизистых оболочек, отсутствие аппетита, повышенная жажда, одышка, тахикардия и тахипноэ, гемоглобинурия. При этом гематокрит был критично снижен до $10,7 \pm 1,2$ %, лактат находился выше референтных значений: $6,1 \pm 0,8$ мМоль/л, SpO₂ существенно ниже референтных значений, а именно $80 \pm 4,8$ %, что говорит об острой гипоксемии, а общий билирубин составлял $45 \pm 4,3$ мМоль/л, что свидетельствовало об образовании большого количества свободного гемоглобина и перехода его в несвязанный билирубин. В результате активного разрушения Эр и выхода внутриклеточного калия в плазму крови его уровень был выше референсных значений и составлял $6,1 \pm 0,3$ мМоль/л.

На второй день после лечебных мероприятий у животных первой контрольной группы признаки анемии в результате ОАИВСГ усилились: гематокрит снизился до $9,5 \pm 0,8$ %, лактат остался критично высоким $6 \pm 0,8$ мМоль/л, SpO₂ снизился до $79 \pm 2,3$ %, билирубин вырос до $59 \pm 5,3$ мМоль/л, калий снизился до $5,4 \pm 0,3$ мМоль/л, т. к. интенсивность АИ внутрисосудистого гемолиза под действием иммуносупрессивной терапии уменьшилась. Клиническая картина проявлялась в

виде усиления желтушности кожи и слизистых оболочек, одышки, угнетения, отказа от корма и тахикардии. Животным была проведена терапия, включающая преднизолон в/в в дозе 4мг/кг, который используется в качестве иммуносупрессора. В качестве дезинтоксикационного раствора в/в вводили NaCl 0,9 % – 10 мл/кг и проводили интенсивную кислородную ингаляцию.

На третий день у животных первой, контрольной, группы признаки анемии в результате ОАИВСГ сохранились, но гемоглобинурии уже не было. Гематокрит поднялся до $10 \pm 0,9$ %, лактат поднялся до $6,4 \pm 0,4$ мМоль/л, SpO₂ составлял $76,8 \pm 3$ %, билирубин снизился до $48 \pm 5,6$ мМоль/л, калий пришел в норму $5 \pm 0,4$ мМоль/л. Клиническая картина проявлялась в виде желтушности кожи, слизистых оболочек, одышки, угнетения, отказа от корма и тахикардии. Животным была проведена терапия, включающая преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, в/в вводили NaCl 0,9 % – 10 мл/кг и проводили интенсивную кислородную ингаляцию.

На четвертый день у животных контрольной группы признаки анемии в результате ОАИВСГ присутствовали: гематокрит составлял $10,2 \pm 1,6$ %, лактат снизился до $6,0 \pm 0,4$ мМоль/л, SpO₂ возросла до $79 \pm 3,7$ %, билирубин снизился до $30 \pm 5,6$ мМоль/л, калий оставался в рамках референсных значений $5 \pm 0,3$ мМоль/л. Желтушность кожи и слизистых оболочек видимо уменьшилась, одышка, угнетение, отказ от корма и тахикардия присутствовали. Животным была проведена терапия, включающая преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, в/в вводили NaCl 0,9 % – 10 мл/кг и проводили интенсивную кислородную ингаляцию.

На пятый день у животных контрольной группы признаки анемии в результате ОАИВСГ уменьшились: гематокрит поднялся до $15 \pm 1,2$ %, лактат снизился до $4,0 \pm 0,3$ мМоль/л, SpO₂ возросла до $85 \pm 3,7$ %, билирубин снизился до $25 \pm 3,3$ мМоль/л, калий оставался в рамках референсных значений $4,8 \pm 0,3$ мМоль/л. Желтушность кожи и слизистых оболочек видимо уменьшилась, одышка, угнетение уменьшились. Животные стали потреблять корм. Собакам была проведена терапия, включающая преднизолон в/в в дозе 4

мг/кг, в качестве дезинтоксикационного раствора в/в вводили NaCl 0,9 % – 10 мл/кг и проводили интенсивную кислородную ингаляцию.

У животных второй группы (эритроцитарной) в первый день в клинической картине преобладали симптомы, характеризующиеся уменьшением циркулирующих эритроцитов в результате ОАИВСГ: бледность и желтушность кожных покровов, видимых слизистых оболочек, отсутствие аппетита, повышенная жажда, одышка, тахикардия и тахипноэ, гемоглинурия. При этом гематокрит был критично снижен до $11 \pm 1,3$ %, лактат находился выше референсных значений ($5,6 \pm 0,8$ ммоль/л), SpO₂ существенно ниже референсных значений ($79 \pm 3,8$ %), что говорит об острой гипоксемии, общий билирубин составлял $41 \pm 5,2$ ммоль/л. Уровень калия был выше референсных значений в результате активного разрушения Эр и выхода данного внутриклеточного микроэлемента в плазму крови $6,2 \pm 0,2$ ммоль/л. Помимо базового курса терапии, в первый день обращения больным животным вводилась ЭМ, при помощи которой гематокрит у реципиента поднимали до 18–20 %. ЭМ использовали в разбавлении с NaCl 0,9 % в соотношении 1:1. В целом объем вводимого препарата крови реципиенту с Ht 11 %, составил 20 мл/кг. Также применяли преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, противопаразитарную терапию осуществили введением препарата «Пиро-Стоп» п/к 0,5 мл/10 кг, проводили интенсивную кислородную ингаляцию.

На второй день у собак второй группы общее состояние оставалось тяжелым, бледность слизистых оболочек присутствовала, желтушность кожных покровов и видимых слизистых усилилась, отсутствие аппетита, повышенная жажда, одышка, тахикардия и тахипноэ присутствовали. Усилилась гемоглинурия.

Гематокрит с учетом трансфузии ЭМ и усилившегося ОАИВСГ возрос до $14,7 \pm 1,4$ %, хотя расчетный уровень гематокрита при данной дозе ЭМ должен быть более 20 %. Лактат был повышен до $4 \pm 0,7$ ммоль/л, SpO₂ существенно повысилась до $85 \pm 2,1$ %, а общий билирубин резко возрос до 289 ± 18 ммоль/л. Уровень калия повысился в результате активного разрушения Эр и выхода данного внутриклеточного микроэлемента в плазму крови $6,5 \pm 0,3$ ммоль/л.

Проведен курс терапии: преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, NaCl 0,9 % в/в 10 мл/кг, при интенсивной кислородной ингаляции.

На третий день у животных второй группы в клинической картине преобладали симптомы, характеризующие уменьшение циркулирующих эритроцитов в результате ОАИВСГ: желтушность кожных покровов и видимых слизистых оболочек увеличилась, отсутствие аппетита, повышенная жажда, одышка, тахикардия и тахипноэ свидетельствовали об ухудшающемся состоянии животных, сохранялась гемоглобинурия. При этом гематокрит снизился до $14 \pm 1,2$ %, лактат находился выше референсных интервалов $4,5 \pm 0,36$ ммоль/л, SpO₂ существенно ниже референсных значений $80,1 \pm 2,4$ %, общий билирубин возрос до $308 \pm 25,8$ ммоль/л. Уровень калия оставался выше референсных значений в результате активного разрушения Эр и выхода данного внутриклеточного микроэлемента в плазму крови $6,5 \pm 0,3$ ммоль/л.

Животным второй группы провели курс терапии: преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, NaCl 0,9 % в/в 10 мл/кг, интенсивную кислородную ингаляцию.

На четвертый день у животных второй группы в клинической картине преобладали симптомы, характеризующие уменьшение ОАИВСГ: желтушность кожных покровов и видимых слизистых оболочек уменьшилась, аппетит отсутствовал, повышенная жажда, одышка, тахикардия и тахипноэ видимо уменьшились, гемоглобинурия отсутствовала, моча была окрашена в интенсивно желтый цвет. Гематокрит повысился до $14,8 \pm 1,6$ %, лактат снизился до $4 \pm 0,25$ ммоль/л, SpO₂ повысилась до 90 ± 3 %, общий билирубин снизился до $219 \pm 20,6$ ммоль/л. Уровень калия снизился, но оставался выше референсных значений в результате продолжающегося разрушения Эр и выхода данного внутриклеточного микроэлемента в плазму крови $6 \pm 0,3$ ммоль/л. Животным провели курс терапии: преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, NaCl 0,9 % в/в 10 мл/кг и интенсивную кислородную ингаляцию.

На пятый день у собак второй группы в клинической картине преобладали симптомы, характеризующие уменьшение ОАИВСГ: уменьшилась желтушность кожных покровов и видимых слизистых оболочек, появился слабый аппетит,

повышенная жажда, тахикардия и тахипноэ видимо уменьшились. При этом гематокрит повысился до $17 \pm 1,5$ %, лактат снизился до $3 \pm 0,37$ мМоль/л, SpO_2 возросла до 97 ± 3 %, общий билирубин снизился до $109 \pm 12,6$ мМоль/л. Уровень калия был выше референсных значений $5,5 \pm 0,2$ мМоль/л. Животным провели курс терапии: преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, NaCl 0,9 % в/в 10 мл/кг, интенсивную кислородную ингаляцию.

У животных третьей экспериментальной группы (с препаратом «Перфторан») в первый день в клинической картине, как и в других двух группах, преобладали симптомы, характеризующие уменьшение циркулирующих эритроцитов в результате ОАИВСГ: бледность, желтушность кожных покровов и видимых слизистых оболочек, отсутствие аппетита, повышенная жажда, одышка, тахикардия и тахипноэ, гемоглинурия. При этом гематокрит был критично снижен до 10 ± 1 %, лактат находился выше референсных интервалов $6 \pm 0,8$ мМоль/л, SpO_2 существенно ниже референтных интервалов $78 \pm 4,4$ %, что говорит об острой гипоксемии, общий билирубин составлял $42 \pm 6,2$ мМоль/л. Уровень калия был выше референсных значений и составлял $6,1 \pm 0,4$ мМоль/л, в результате активного разрушения Эр и выхода данного внутриклеточного микроэлемента в плазму крови. Животным третьей группы, помимо базовой терапии, включающей преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, NaCl 0,9 % в/в 10 мл/кг, «Пиро-Стоп» п/к 0,5 мл/10 кг и интенсивной кислородной ингаляции, использовали эмульсию ПФУ, обладающую функцией газопереноса с целью уменьшения гипоксии. «Перфторан» вводили в дозе 10 мл/кг в/в.

На второй день у собак третьей группы общее состояние незначительно улучшилось, бледность слизистых оболочек присутствовала, желтушность кожных покровов и видимых слизистых была незначительной, отсутствие аппетита, повышенная жажда, одышка, тахикардия и тахипноэ сохранялись, гемоглинурия отсутствовала. При этом гематокрит был снижен до $10,3 \pm 1,2$ %, но лактат находился в референтных интервалах и составлял $2,9 \pm 0,6$ мМоль/л, SpO_2 существенно повысилась до $85,2 \pm 2,7$ %, а общий билирубин снизился до

$40 \pm 4,4$ мМоль/л. Уровень калия был в рамках референсных значений в результате уменьшения ОАИВСГ $5,3 \pm 0,3$ мМоль/л.

Был проведён курс терапии: преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, NaCl 0,9 % в/в 10 мл/кг, интенсивная кислородная ингаляция, в/в вводили «Перфторан» в дозе 10 мл/кг.

На третий день у животных опытной группы признаки анемии в результате ОАИВСГ уменьшились: гематокрит в результате созревания ретикулоцитов поднялся до $12 \pm 0,9$ %, лактат снизился до $2,7 \pm 0,4$ мМоль/л, SpO₂ возросла до $95 \pm 3,3$ %, билирубин снизился до $20 \pm 2,9$ мМоль/л. Уровень калия оставался в рамках референсных значений $5 \pm 0,3$ мМоль/л. Цвет видимых слизистых оболочек бледно-розовый, одышка уменьшилась. Животные стали потреблять корм. Собакам была проведена терапия, включающая преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, в качестве дезинтоксикационного раствора вводили NaCl 0,9 % в/в 10 мл/кг и проводили интенсивную кислородную ингаляцию, в/в вводили «Перфторан» в дозе 10 мл/кг.

На четвертый день у собак третьей группы общее состояние удовлетворительное, слизистые бледно-розовые, аппетит улучшился. При этом гематокрит составлял $15 \pm 2,83$ %, лактат находился в референтных интервалах $2,5 \pm 0,27$ мМоль/л, SpO₂ существенно повысилась до $95 \pm 3,27$ %, общий билирубин снизился до $15 \pm 1,85$ мМоль/л. Собакам была проведена терапия, включающая преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, в качестве дезинтоксикационного раствора вводили NaCl 0,9 % в/в 10 мл/кг и проводили интенсивную кислородную ингаляцию, вводили «Перфторан» в/в в дозе 10 мл/кг.

На пятый день у животных третьей экспериментальной группы клинические признаки анемии в результате ОАИВСГ не обнаруживались. Цвет видимых слизистых оболочек бледно-розовый, одышка отсутствовала, животные стали хорошо потреблять корм, цвет мочи – соломенно-желтый, гематокрит поднялся до $18 \pm 1,5$ %, лактат снизился до $2,0 \pm 0,24$ мМоль/л, SpO₂ возросла до $97 \pm 4,5$ %, билирубин снизился до $12 \pm 1,6$ мМоль/л. Уровень калия был в рамках референсных значений $4,5 \pm 0,2$ мМоль/л. Собакам была проведена терапия,

включающая преднизолон в/в в дозе 4 мг/кг, в качестве дезинтоксикационного раствора вводили NaCl 0,9 % в/в 10 мл/кг и проводили интенсивную кислородную ингаляцию, вводили «Перфторан» в/в в дозе 10 мл/кг.

Гематокрит. По результатам исследований, в первый день достоверных отличий в значениях гематокрита между животными трех групп не выявлено, при этом значение Ht у всех исследуемых животных в первый день наблюдений находилось существенно ниже референсных значений, что свидетельствует о тяжелой анемии.

Во второй день гематокрит у собак второй группы составил $14,7 \pm 1,4$ % и достоверно отличался от значений контрольной группы $9,5 \pm 0,8$ % и значений третьей группы с «Перфтораном» $10,3 \pm 1,2$ %. Данное отличие обусловлено трансфузией животным второй группы донорской ЭМ.

На третий день значение Ht у второй группы животных с ЭМ снизилось до $14,1 \pm 1,2$ %, но достоверно отличалось от контрольной группы $10,1 \pm 0,9$ % и третьей экспериментальной группы $12,1 \pm 0,9$ %. Отличие обусловлено тем, что у всех трех групп животных продолжает происходить гибель Эр в результате АИ гемолиза, несмотря на иммуносупрессивную терапию, при этом во второй группе гематокрит, несмотря на трансфузию донорской ЭМ, снизился по сравнению со вторым днем, а в контрольной и третьей группе с «Перфтораном» значение Ht незначительно увеличилось, т.к. АИГ сопровождается регенераторной анемией и из ретикулоцитов образуются Эр и достоверно значение Ht стало отличаться от первой контрольной группы. Перфторан обладает цитопротективным действием и несмотря на АИГА, гибель Эр не так выражена, как в первой и второй группах.

На четвертый день гематокрит в третьей группе с «Перфтораном» повысился до $15,5 \pm 1,5$ % и достоверно отличался от значений гематокрита группы контроля $10,2 \pm 1,6$ %. Это связано с лучшим выживанием Эр у животных третьей группы с «Перфтораном» при АИГА. Во второй группе гематокрит $14,8 \pm 1,6$ % достоверно отличался от значений Ht первой контрольной группы за счет донорского эритроцитарного запаса, созданного на второй день.

На пятый день значение гематокрита во всех трех группах существенно увеличилось, по сравнению с четвертым днем, за счет активного регенераторного ответа и уменьшения АИГ в результате иммуносупрессивной терапии преднизолоном.

На рисунке 23 приведены графики зависимости средних значений уровня гематокрита от дня терапии и стандартное отклонение в каждой группе ($M \pm SD$). Количество животных во всех группах равно 10. Геометрическими знаками отмечена достоверность отличия средних значений уровня гематокрита между группами.

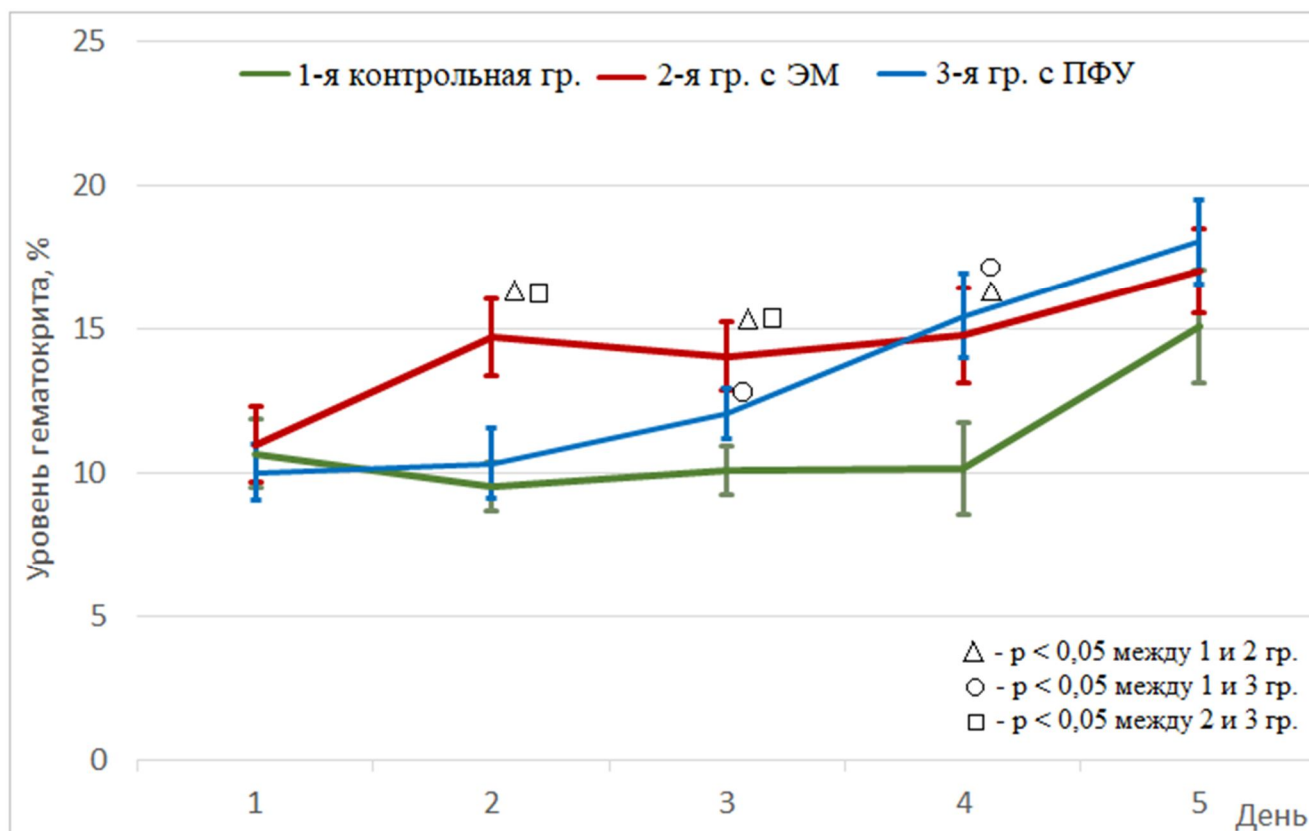


Рисунок 23. Динамика изменения гематокрита у 1-й контрольной группы, 2-й группы с донорской ЭМ и 3-й группы с «Перфтораном» животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом. Во всех группах $n = 10$

Билирубин. Значение билирубина у животных трех групп в первый день исследований было существенно выше референсных значений, и достоверных отличий между группами не было. На второй день значение билирубина у животных второй группы составило 289 ± 18 мкмоль/л, что достоверно выше

значений группы контроля $59 \pm 5,3$ мкМоль/л и значений билирубина у животных третьей группы с «Перфтораном» $40 \pm 6,2$ мкМоль/л, что обусловлено повышенным разрушением Эр у животных второй группы в результате трансфузии донорской ЭМ и тем самым усилением ОАИВСГ. При этом значение билирубина у животных третьей группы достоверно ниже значений билирубина у животных первой контрольной группы, т.к. разрушение эритроцитов при ОАИВСГ в результате цитопротективного действия «Перфторана» уменьшается.

На третий день исследований значение билирубина у животных второй группы ($308 \pm 25,8$ мкМоль/л) повысилось по сравнению со вторым днем и стало достоверно выше значений группы контроля ($48 \pm 5,6$ мкМоль/л) и значений билирубина у животных третьей группы с «Перфтораном» ($21 \pm 3,5$ мкМоль/л), что обусловлено повышенным разрушением Эр у животных второй группы в результате трансфузии донорской ЭМ и тем самым продолжающимся усилением ОАИВСГ. При этом значение билирубина у животных третьей экспериментальной группы достоверно ниже значений билирубина у животных первой контрольной группы, т.к. разрушение эритроцитов при ОАИВСГ в результате цитопротективного действия «Перфторана» существенно уменьшается.

На четвертый день билирубин у животных второй группы уменьшился до $219 \pm 20,6$ мкМоль/л, но также остался достоверно выше значений группы контроля ($30 \pm 5,6$ мкМоль/л) и значений билирубина у животных третьей группы с «Перфтораном» ($17 \pm 3,6$ мкМоль/л), что обусловлено повышенным разрушением Эр у животных второй группы в результате трансфузии донорской ЭМ во второй день лечения. При этом значение билирубина у животных третьей экспериментальной группы достоверно ниже значений билирубина у животных первой контрольной группы и билирубин в этих двух группах понижается существенно, что говорит о видимом уменьшении ОАИВСГ.

На пятый день значение билирубина у животных всех трех групп существенно уменьшилось, у второй группы билирубин составил $109 \pm 12,6$ мкМоль/л, что достоверно выше значений группы контроля $25 \pm 3,3$ мкМоль/л и значений билирубина у животных третьей группы с «Перфтораном» $14 \pm 2,7$ мкМоль/л, что

обусловлено ранее проведенной трансфузией донорской ЭМ. При этом значение билирубина у животных третьей экспериментальной группы достигло референсных границ и осталось достоверно ниже значений билирубина у животных первой контрольной группы.

На рисунке 24 приведены графики зависимости средних значений уровня билирубина и стандартного отклонения в каждой группе ($M \pm SD$) от дня терапии. Количество животных во всех группах равно 10. Геометрическими знаками отмечена достоверность отличия средних значений уровня билирубина между группами.

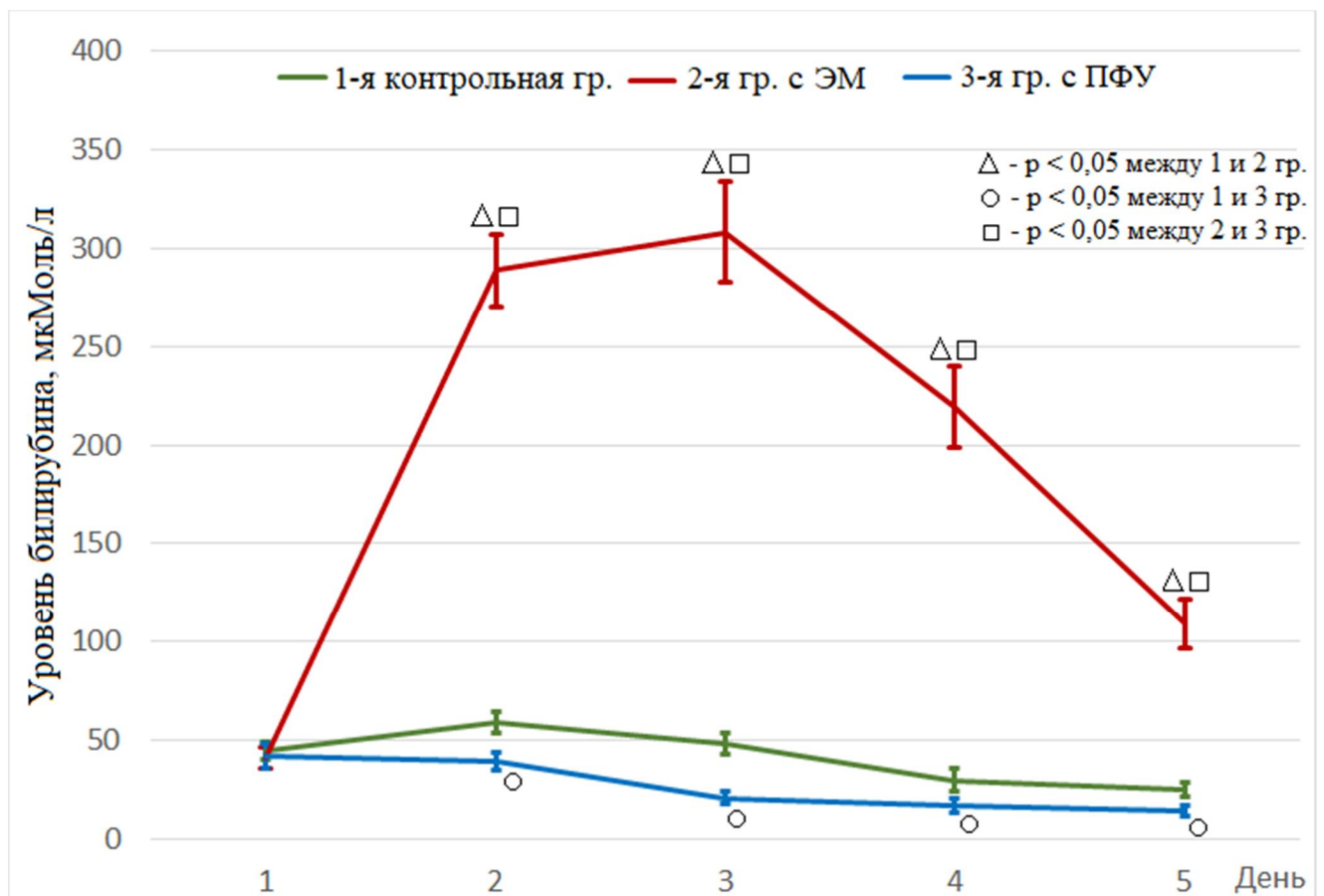


Рисунок 24. Динамика изменения билирубина (в мкмоль/л) у 1-й контрольной группы, 2-й группы с донорской ЭМ и 3-й группы с «Перфтораном» животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом. Во всех группах $n = 10$

Сатурация. Значение SpO_2 у животных трех групп в первый день исследований было существенно ниже референсных границ, достоверных отличий между группами не было.

На второй день средние значения SpO_2 во второй группе с ЭМ и в третьей группе с «Перфтораном» составили $85 \pm 2,1\%$ и $85,2 \pm 2,7\%$, соответственно, и достоверно отличаются от средних значений SpO_2 в контрольной группе животных $79,2 \pm 2,3 \%$. Критично низкое значение сатурации в контрольной группе обусловлено низким уровнем кислородоносителей у больных животных и отсутствием заместительной терапии для коррекции гипоксии, в отличие от второй и третьей группы.

На протяжении третьего, четвертого и пятого дней исследований значения SpO_2 во второй группе с ЭМ и в третьей группе с «Перфтораном» достоверно отличаются от значений SpO_2 в контрольной группе животных. Значение сатурации во всех трех группах постепенно возрастает в результате регенерации Эр. На третий день значение SpO_2 в группе с «Перфтораном» достоверно выше, чем значение сатурации во второй группе животных с использованием донорской ЭМ, т.к. после трансфузии донорских эритроцитов в острую фазу АИ гемолиза разрушение эритроцитов у реципиента возрастает, а следовательно, уменьшается количество кислородоносителей.

На пятый день лечения значения SpO_2 практически приходят в норму во второй группе с использованием донорской ЭМ – $96,5 \pm 2,4 \%$, и в третьей группе с «Перфтораном» – $95,7 \pm 2,7 \%$, что достоверно выше значений SpO_2 в группе контроля – $85 \pm 3,7 \%$.

На рисунке 25 приведены графики зависимости средних значений SpO_2 и стандартного отклонения в каждой группе ($M \pm SD$) от дня терапии. Количество животных во всех группах равно 10. Геометрическими знаками отмечена достоверность отличия средних значений SpO_2 между группами.

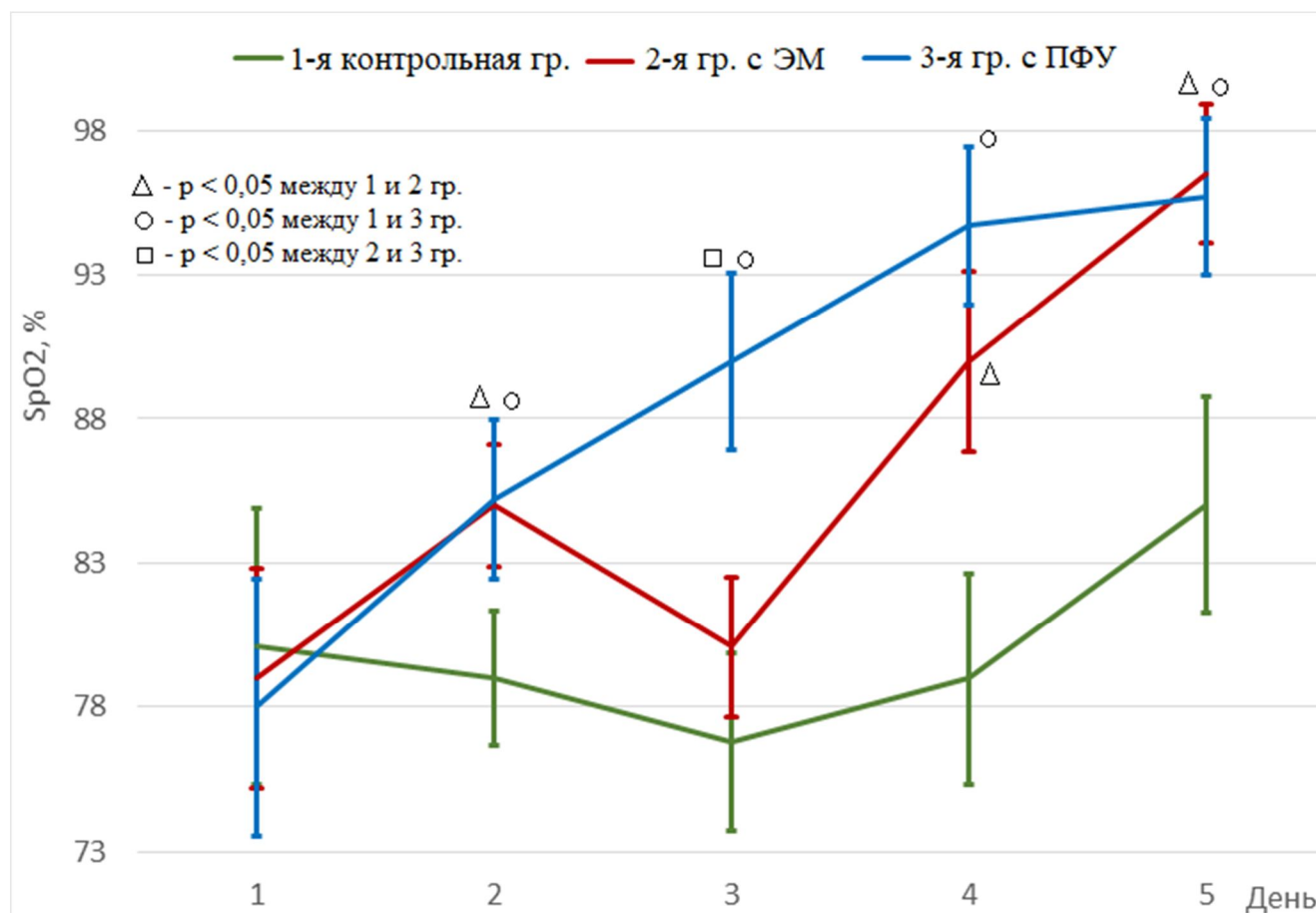


Рисунок 25. Динамика изменения сатурации (SpO_2 в %) у 1-й контрольной группы, 2-й группы с донорской ЭМ и 3-й группы с «Перфтораном» животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом. Во всех группах $n = 10$

Лактат. Значение лактата у животных трех групп в первый день исследований было существенно выше референсных границ, и достоверных отличий между группами не было.

На второй день значение лактата у животных первой контрольной группы составляло $6 \pm 0,8$ мМоль/л, что достоверно выше значений лактата во второй группе – $4 \pm 0,7$ мМоль/л и значений лактата у животных 3 группы с «Перфтораном» – $2,9 \pm 0,6$ мМоль/л, что обусловлено отсутствием заместительной терапии при гипоксии в результате АИГА.

На третий день исследований среднее значение лактата у животных первой контрольной группы было $6,4 \pm 0,4$ мМоль/л, что достоверно выше значений лактата во второй группе $4,5 \pm 0,36$ мМоль/л и выше значений лактата у животных третьей группы с «Перфтораном» – $2,7 \pm 0,4$ мМоль/л, при этом

значение у животных в третьей группе достоверно ниже значений лактата у животных во второй группе с использованием донорской ЭМ, что указывает на повышенный ацидоз в результате трансфузии донорских Эр при ОАИВСГ.

На четвертый день исследований значение лактата у животных первой контрольной группы оставалось высоким, а именно $6 \pm 0,4$ мМоль/л, что достоверно выше значений лактата во второй группе $4 \pm 0,36$ мМоль/л и выше значений лактата у животных третьей группы с «Перфтораном» $2,5 \pm 0,3$ мМоль/л, при этом значение лактата у животных в третьей группе остается достоверно ниже значений лактата у животных во второй группе с использованием донорской ЭМ.

На пятый день исследований значение лактата у животных первой контрольной группы уменьшилось до $4 \pm 0,3$ мМоль/л, но осталось достоверно выше значений лактата у животных второй группы $3 \pm 0,37$ мМоль/л и выше значений лактата у животных третьей группы с «Перфтораном» $2 \pm 0,24$ мМоль/л, при этом значение лактата у животных в третьей группе остается достоверно ниже значений лактата у животных во второй группе с использованием донорской ЭМ. Что подчеркивает хороший антигипоксический эффект в результате применения газотранспортной кровозамещающей эмульсии препарата «Перфторан».

На рисунке 26 приведены графики зависимости средних значений уровня лактата и стандартного отклонения в каждой группе ($M \pm SD$) от дня терапии. Количество животных во всех группах равно 10. Геометрическими знаками отмечена достоверность отличия средних значений уровня лактата между группами.

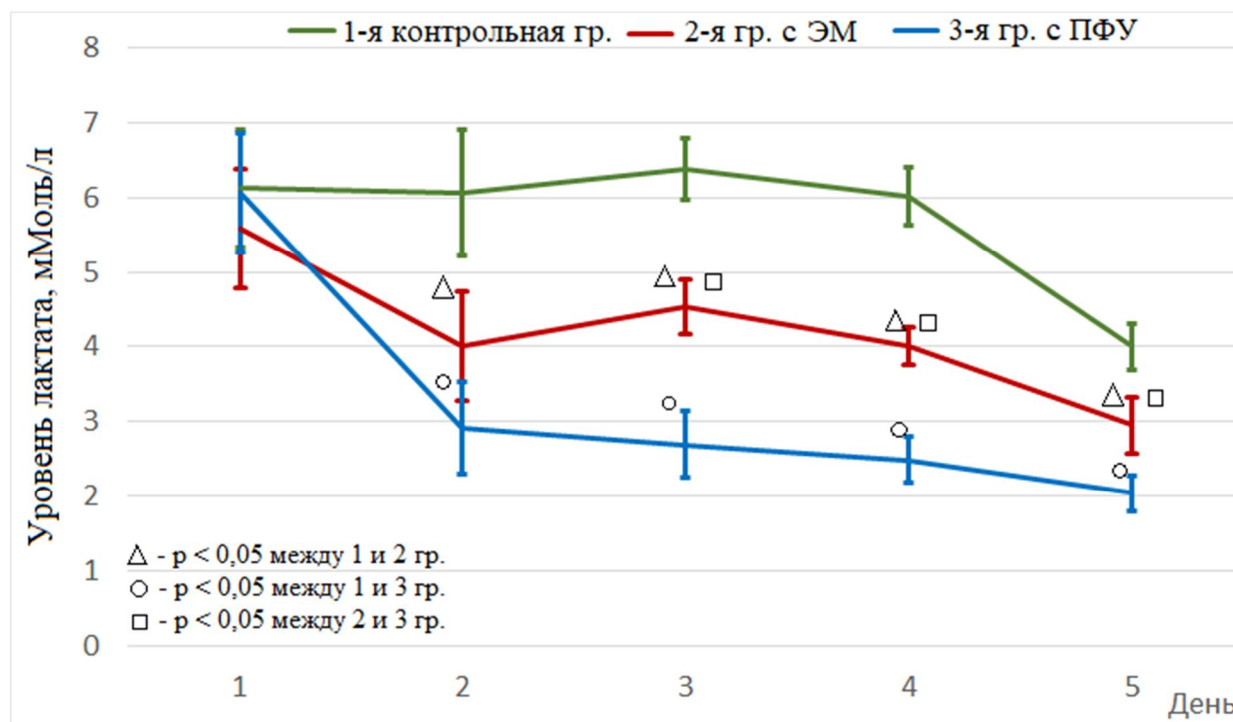


Рисунок 26. Динамика изменения лактата у 1-й контрольной группы, 2-й группы с донорской ЭМ и 3-й группы с «Перфтораном» животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом. Во всех группах $n = 10$

Калий. Значение калия у животных всех трех групп в первый день исследований было существенно выше референсных границ, и достоверных отличий между группами не было. Это обусловлено выходом большого количества калия в плазму крови при разрушении Эр в результате АИ внутрисосудистого гемолиза.

На второй день лечения значение калия было высокое у животных второй группы с введенной донорской ЭМ – $6,5 \pm 0,3$ ммоль/л, что достоверно выше значений калия в контрольной группе, а именно $5,4 \pm 0,7$ ммоль/л, и значений калия у животных третьей группы с «Перфтораном» – $5,3 \pm 0,3$ ммоль/л. Это обусловлено усилением распада Эр при использовании донорской ЭМ с выраженным ОАИВСГ.

На третий день лечения значение калия у животных второй группы с введенной донорской ЭМ оставалось высоким $6,5 \pm 0,3$ ммоль/л, что достоверно выше значений калия в контрольной группе $5,4 \pm 0,7$ ммоль/л и значений калия у животных третьей группы с «Перфтораном» $5,3 \pm 0,3$ ммоль/л.

На четвертый день лечения значение калия у животных второй группы с введенной донорской ЭМ уменьшилось, но оставалось выше референсных границ $6 \pm 0,3$ мМоль/л, что было достоверно выше значений калия в контрольной группе $5 \pm 0,3$ мМоль/л и значений калия у животных третьей группы с «Перфтораном» $4,7 \pm 0,3$ мМоль/л.

На рисунке 27 приведен график средних значений уровня калия и стандартного отклонения в каждой группе ($M \pm SD$) от дня терапии. Количество животных во всех группах равно 10. Геометрическими знаками отмечена достоверность отличия средних значений уровня калия между группами.

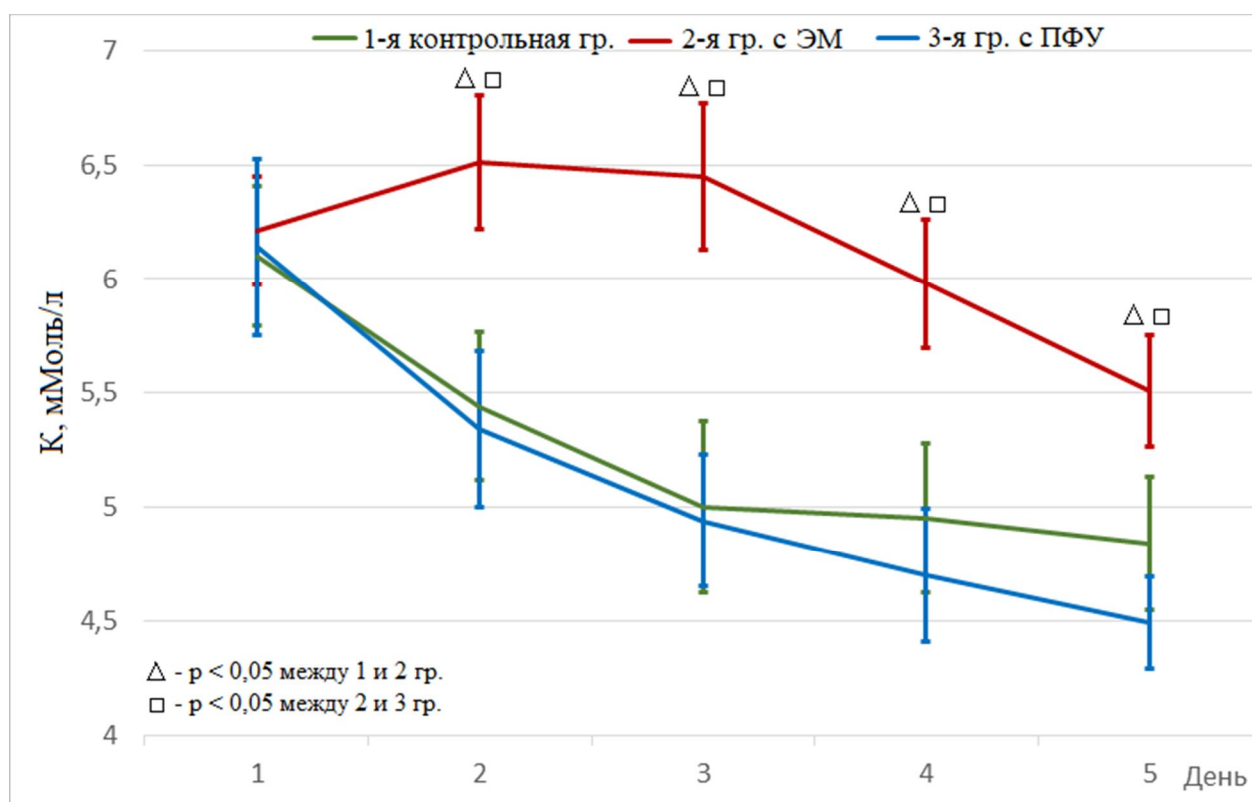


Рисунок 27. Динамика изменения калия у 1-й контрольной группы, 2-й группы с донорской ЭМ и 3-й группы с «Перфтораном» животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом. Во всех группах $n = 10$

На пятый день лечения значение калия у животных второй группы с введенной донорской ЭМ уменьшилось и приблизилось к референсным значениям $5,5 \pm 0,2$ мМоль/л, но оставалось достоверно выше значений калия в контрольной группе $5 \pm 0,3$ мМоль/л и значений калия у животных третьей группы с

«Перфтораном» $4,5 \pm 0,2$ мМоль/л. Уменьшение значения калия во всех трех группах свидетельствует об уменьшении разрушения Эр и, следовательно, об уменьшении гемолиза.

4.2. Обсуждения результатов исследований по анемии у животных при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе с использованием перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы

В этом разделе приведено обсуждение результатов исследований в динамике у контрольной группы животных, группы животных с использованием донорской ЭМ и основной группы с использованием перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» по следующим показателям: гематокриту, лактату, билирубин, калию и SpO_2 .

Гематокрит. На протяжении пяти дней лечения значение Ht у животных всех трех групп возрастало, т.к. при ОАИВСГ развивается регенераторная анемия и на фоне иммуносупрессивной терапии преднизолоном уменьшается иммунная агрессия на эритроциты больного животного. Однако при тяжелой аутоиммунной гемолитической анемии с Ht меньше 15 %, жизненно важные органы страдают от тяжелой гипоксии, и в контрольной группе, по сравнению со второй и третьей, наблюдается критично низкий уровень гематокрита с первого дня, значение $Ht = 10,7 \pm 1,2 \%$, по четвертый день, $Ht = 10,2 \pm 1,6 \%$, что вызывает высокую летальность. Данные наблюдения показывают, что без заместительной терапии (при тяжелой гипоксии в результате ОАИВСГ) эволюционные механизмы регенерации не успевают восстановить минимально необходимый для выживания животного уровень кислородоносителей [13, 51], что отражено в таблице 12, где приведены средние арифметические значения гематокрита в группах с указанием стандартного отклонения ($M \pm SD$) и достоверного отличия групп друг от друга.

Таблица 12. Динамика изменения гематокрита у 1-й контрольной группы, 2-й группы с донорской эритроцитарной массой и 3-й группы с «Перфтораном» животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом

Показатель	Группы	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
Ht, %	1 группа (контроль)	10,7 ± 1,2	9,5 ± 0,8	10,1 ± 0,9	10,2 ± 1,6	15,1 ± 2
M±SD n = 10	2 группа (ЭМ)	11 ± 1,3	14,7 ± 1,4 ^{Δ,□}	14,1 ± 1,2 ^{Δ,□}	14,8 ± 1,6 ^Δ	17 ± 1,5
	3 группа (Перфторан)	10 ± 1	10,3 ± 1,2	12,1±0,9 [○]	15,5 ± 1,5 [○]	18,1 ± 1,5

Прим. В таблице используются следующие условные обозначения: Δ – достоверное отличие 2-й группы от контрольной при $p < 0,05$; ○ – достоверное отличие 3-й группы от контрольной при $p < 0,05$; □ – достоверное отличие 2-й группы от 3-й при $p < 0,05$

Билирубин. На протяжении пяти дней исследования значение билирубина у животных второй группы с ЭМ возрастало до третьего дня и достоверно отличалось от контрольной группы и экспериментальной группы с «Перфтораном», т.к. донорские Эр, введенные животным на второй день лечения, существенно усиливают АИ гемолиз у реципиента, в результате чего образуется большое количество непрямого билирубина, что приводит к высокой летальности. Если больная собака молодая и ее гомеостаз до заболевания был стабильным, то на фоне иммуносупрессивной терапии преднизолоном уменьшается иммунная агрессия на эритроциты больного животного. На четвертый день во второй группе наблюдаем уменьшение уровня билирубина, при этом к пятому дню лечения значение остается высоким, $109 \pm 12,6$ мкМоль/л, и достоверно отличается от контрольной группы $25 \pm 3,3$ мкМоль/л и экспериментальной группы с «Перфтораном» $12 \pm 1,6$ мкМоль/л. Значение билирубина у экспериментальной группы с «Перфтораном» на пятый день снизилось до референсных значений, что существенно уменьшает гибель животных при бабезиозе, осложненном ОАИВСГ. У животных контрольной группы на пятый день лечения значение билирубина составило $25 \pm 3,3$ мкМоль/л, что достоверно ниже значений у животных второй группы с ЭМ – $109 \pm 12,6$ мкМоль/л и доказывает выраженный побочный эффект от применения донорской ЭМ животным с ОАИВСГ. В таблице 13 приведены

средние арифметические значения билирубина в группах с указанием стандартного отклонения ($M \pm SD$) и достоверного отличия групп друг от друга.

Таблица 13. Динамика изменения билирубина у 1-й контрольной группы, 2-й группы с донорской эритроцитарной массой и 3-й группы с «Перфтораном» животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом

Показатель	Группа	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
Билирубин мкМоль/л $M \pm SD$ n = 10	1 группа (контроль)	45 ± 4,3	59 ± 5,3	48 ± 5,6	30 ± 5,6	25 ± 3,3
	2 группа (ЭМ)	41 ± 5,2	289 ± 18 ^Δ □	308 ± 25,8 ^Δ □	219 ± 20,6 ^{Δ,□}	109 ± 12,6 ^{Δ,□}
	3 группа (Перфтран)	42 ± 6,2	40 ± 4,4 [○]	21 ± 3,5 [○]	17 ± 3,6 [○]	14 ± 2,7 [○]

Прим. В таблице используются следующие условные обозначения: Δ – достоверное отличие 2-й группы от контрольной при $p < 0,05$; ○ – достоверное отличие 3-й группы от контрольной при $p < 0,05$; □ – достоверное отличие 2-й группы от 3-й при $p < 0,05$

Метаболизм билирубина при физиологических и патологических состояниях организма существенно отличается, поэтому знание особенностей метаболизма билирубина при внесосудистом и внутрисосудистом гемолизе эритроцитов позволяет правильно скорректировать терапию и даже при очень высокой гипербилирубинемии добиться положительной динамики при лечении животных с осложненной ОАИВСГ формой бабезиоза. На рисунке 28 представлена собака N с осложненной формой бабезиоза. Фотография сделана в первый день лечения. С учетом тяжелой анемии в результате ОАИВСГ и гипербилирубинемии использовали для коррекции гипоксии газотранспортную кровозамещающую эмульсию – препарат «Перфторан» в составе комплексной терапии.

При подобной клинической картине уровень билирубина возрастает до 400 мкМоль/л. Такое состояние больного организма очень нестабильное, и гибель может наступить в любой момент [5, 90]. Ежедневный мониторинг уровня билирубина и степени развития анемии позволяет контролировать патологическое состояние и вовремя обоснованно использовать терапевтические средства и методы для коррекции гипоксии.

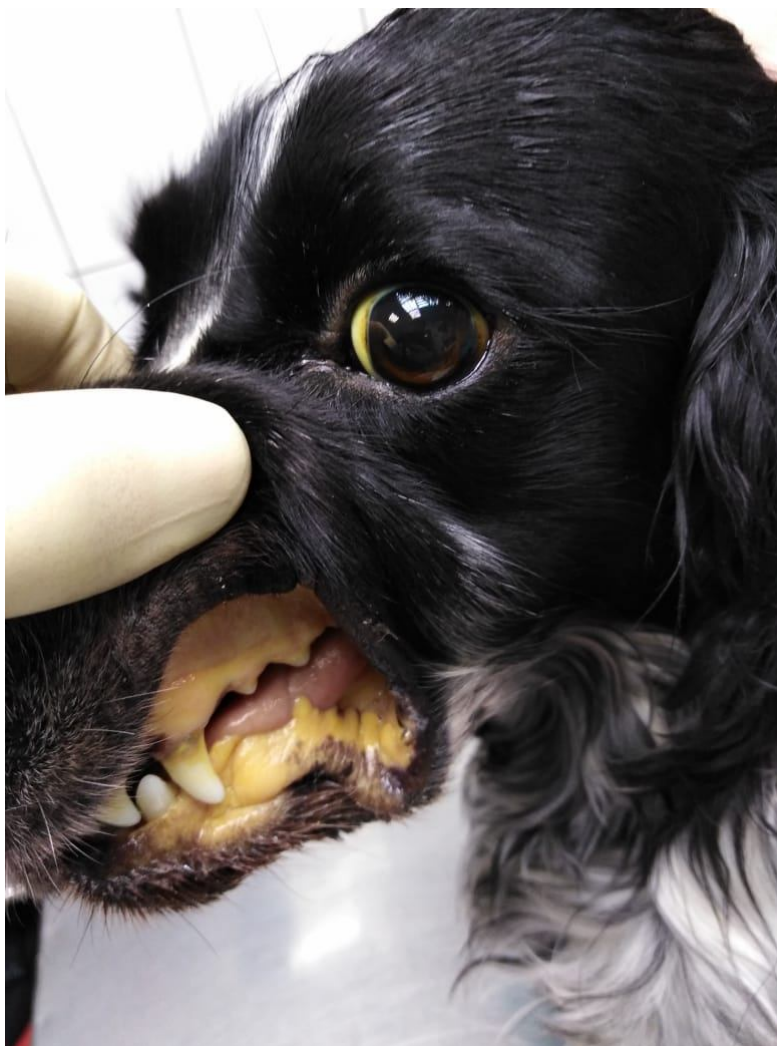


Рисунок 28. Собака N с желтушностью слизистых оболочек и кожи при ОАИВСГ, возникшем в результате бабезиоза. Первый день лечения, в качестве заместительной терапии при гипоксии использовался препарат «Перфторан»

На рисунке 29 показана собака N на 5-й день терапии бабезиоза, осложненного ОАИВСГ. В результате ежедневного мониторинга уровня билирубина и степени развития анемии терапию удалось вовремя скорректировать. Для коррекции гипоксии в составе комплексной терапии использовали газотранспортную кровозамещающую эмульсию – препарат «Перфторан». При восстановлении Эр и понижении уровня билирубина желтушность слизистых оболочек видимо уменьшается. Общее состояние животного нормализуется, появляется активность и аппетит. После пяти дней комплексной терапии, описанной в эксперименте, к животным применяют

глюкокортикостероиды длительно, в постепенно уменьшающихся дозах, под контролем значений гематокрита.



Рисунок 29. Собака N на 5-й день терапии бабезиоза, осложненного ОАИВСГ. В составе комплексной терапии для коррекции гипоксии использовался препарат «Перфторан»

Сатурация. На протяжении пяти дней лечения мы наблюдали увеличение значений SpO_2 во всех трех группах за счет продукции Эр из ретикулоцитов, т.к. анемия при ОАИВСГ регенераторная. При этом значение сатурации в группе контроля достоверно было ниже значений SpO_2 во второй группе с использованием ЭМ и в третьей с использованием «Перфторана», и, несмотря на рост значений сатурации, уровень SpO_2 на протяжении пяти дней в первой группе был критично низкий, что способствует большой летальности у собак при лечении тяжелой АИГА без коррекции гипоксии. В таблице 14 приведены

средние арифметические значения SpO₂ в группах с указанием стандартного отклонения (M±SD) и достоверного отличия групп друг от друга.

Таблица 14. Динамика изменения SpO₂ у 1-й контрольной группы, 2-й группы с донорской эритроцитарной массой и 3-й группы с «Перфтораном» животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом

Показатель	Группа	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
SpO ₂ , %	1 группа (контроль)	80,1 ± 4,8	79 ± 2,3	76,8 ± 3	79 ± 3,7	85 ± 3,7
M±SD	2 группа (кровь)	79 ± 3,8	85 ± 2,1 ^Δ	80,1 ± 2,4 [□]	90 ± 3 ^Δ	96,5 ± 2,4 ^Δ
n = 10	3 группа (Перфторан)	78 ± 4,4	85,2 ± 2,7 [○]	90 ± 3 [○]	95 ± 3,3 [○]	95,7 ± 2,7 [○]

Прим. В таблице используются следующие условные обозначения: Δ – достоверное отличие 2-й группы от контрольной при p < 0,05; ○ – достоверное отличие 3-й группы от контрольной при p < 0,05; □ – достоверное отличие 2-й группы от 3-й при p < 0,05

Лактат. Известно, что лактат в организме у животных образуется в результате анаэробного метаболизма. Его уровень возрастает из-за плохого кровоснабжения и гипоксии тканей [106,108].

Как показали проведенные исследования, при введении газотранспортного кровезаменителя – препарата «Перфторан» – уровень лактата в третьей экспериментальной группе был достоверно ниже, по сравнению с первой и второй группой на протяжении пяти дней лечения. Это связано, как показали наши ранние исследования, с газотранспортными свойствами перфторэмульсии – основы препарата «Перфторан», которая увеличивает массоперенос кислорода, улучшает показатели газового состава и кислотно-основного состояния крови, уменьшая тем самым ацидоз [39, 62].

Животные в первой контрольной группе на всем протяжении исследования имели критично высокое значение лактата, что вызывало повышенную летальность при отсутствии заместительной терапии при гипоксии в результате АИГА.

Животные второй группы с использованием донорской ЭМ на протяжении пяти дней лечения имели уровень лактата выше референсных значений, что показывает повышенный уровень ацидоза у собак, для лечения которых в

качестве заместительной терапии при ОАИВСГ использовали донорские Эр. В таблице 15 приведены средние арифметические значения уровня лактата в группах с указанием стандартного отклонения ($M \pm SD$) и достоверного отличия групп друг от друга.

Таблица 15. Динамика изменения лактата у 1-й контрольной группы, 2-й группы с донорской эритроцитарной массой и 3-й группы с «Перфтораном» животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом

Показатель	Группа	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
Лактат, ммоль/л, $M \pm SD$ $n = 10$	1 группа (контроль)	$6,1 \pm 0,8$	$6 \pm 0,8$	$6,4 \pm 0,4$	$6 \pm 0,4$	$4 \pm 0,3$
	2 группа (кровь)	$5,6 \pm 0,8$	$4 \pm 0,7^{\Delta}$	$4,5 \pm 0,36^{\Delta, \square}$	$4 \pm 0,25^{\Delta, \square}$	$3 \pm 0,37^{\Delta, \square}$
	3 группа (Перфторан)	$6 \pm 0,8$	$2,9 \pm 0,6^{\circ}$	$2,7 \pm 0,4^{\circ}$	$2,5 \pm 0,3^{\circ}$	$2 \pm 0,24^{\circ}$

Прим. В таблице используются следующие условные обозначения: Δ – достоверное отличие 2-й группы от контрольной при $p < 0,05$; \circ – достоверное отличие 3-й группы от контрольной при $p < 0,05$; \square – достоверное отличие 2-й группы от 3-й при $p < 0,05$

Калий. Калий является внутриклеточным микроэлементом и при разрушении клеток активно переходит в плазму крови. У собак при ОАИВСГ за короткий промежуток времени в кровеносном русле разрушается большое количество Эр, и калий попадает в плазму крови. При этом из-за остроты АИ внутрисосудистого гемолиза компенсаторные силы больного организма не успевают развиваться в должной степени. Высокое содержание калия в плазме крови вызывает нарушение трансмембранных потенциалов, что приводит к нарушению сердечной деятельности и усугублению гипоксии тканей [83]. На протяжении пяти дней лечения мы видели, как значение калия во всех трех группах уменьшается в зависимости от уменьшения гемолиза Эр. Во второй группе с использованием донорской ЭМ значения калия на протяжении всего исследования достоверно выше значений калия в других двух группах, что свидетельствует об усилении АИ внутрисосудистого гемолиза в результате трансфузии донорской ЭМ. В таблице 16 приведены средние арифметические значения уровня калия в группах.

Таблица 16. Динамика изменения калия у 1-й контрольной группы, 2-й группы с донорской эритроцитарной массой и 3-й группы с «Перфтораном» животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом

Показатель	Группа	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
Калий, мМоль/л, M±SD n = 10	1 группа (контроль)	6,1 ± 0,3	5,4 ± 0,3	5 ± 0,4	5 ± 0,3	4,8 ± 0,3
	2 группа (кровь)	6,2 ± 0,2	6,5 ± 0,3 ^{Δ□}	6,5 ± 0,3 ^{Δ□}	6 ± 0,3 ^{Δ□}	5,5 ± 0,2 ^{Δ□}
	3 группа (Перфторан)	6,1 ± 0,4	5,3 ± 0,3	5 ± 0,3	4,7 ± 0,3	4,5 ± 0,2

Прим. В таблице используются следующие условные обозначения: Δ – достоверное отличие 2-й группы от контрольной при $p < 0,05$; ○ – достоверное отличие 3-й группы от контрольной при $p < 0,05$; □ – достоверное отличие 2-й группы от 3-й при $p < 0,05$

При изучении побочных реакций на введение «Перфторана» было отмечено, что у 8% животных проявлялись признаки аллергических реакций: кожный зуд, озноб, удушье, гипертермия, тахикардия, которые проявились в виде внезапного, молниеносно развивающегося синдрома. Как показали ранние исследования [9, 110], это связано с активацией системы комплемента плазмы крови. Аллергические реакции, которые наблюдались в наших исследованиях у собак, был купированы введением мочегонных препаратов (фуросемид), аналептических препаратов (кордиамин), кортикостероидных гормонов (преднизолон), М-холиноблокаторов (атропин) в дозах, адекватных массе животного и тяжести состояния.

ОАИВСГ, возникающий при бабезиозе, – это процесс разрушения эритроцитов в кровяном русле в результате действия антител и комплемента на эритроцитарную мембрану. Токсины, а также продукты, выделяемые гемопаразитами, могут вызвать поражение эритроцитарной мембраны с последующей активизацией аутоиммунных реакций [73, 76]. При бабезиозе собак, осложненном АИГА, АИ гемолиз развивается даже после уничтожения возбудителя, что определяет высокую летальность в результате развивающейся тяжелой гипоксии. Большое количество патологических форм эритроцитов, в частности сфероцитов, образующихся в результате АИ гемолиза, уменьшает

газотранспортную функцию крови (рисунок 30) [1, 77]. Совокупность клинических и биохимических критериев оценки состояния больного животного при ОАИВСГ позволяет своевременно использовать наиболее эффективные терапевтические средства.

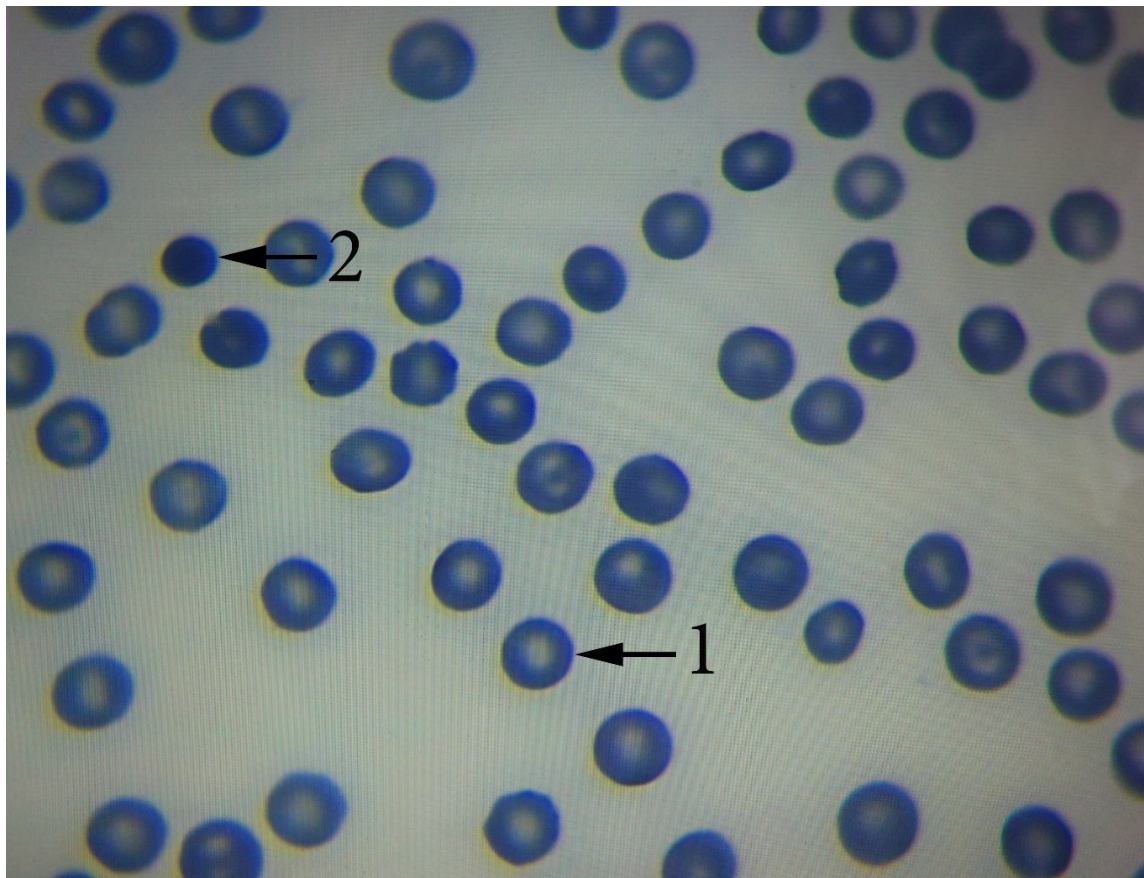


Рисунок 30. Мазок крови собаки при бабезиозе, осложненном АИГА. Краситель Дифф-Квик (соответствует методу Папэнхайма). Увеличение $\times 100$. Обозначения: 1 – нормальный эритроцит; 2 – сфероцит

На основании анализа исследований можно выявить летальность у животных в каждой группе после девяти дней наблюдения, что дает информацию о результативности выбранного вида терапии и позволяет оценить летальность у животных на более длительном промежутке времени (таблица 17).

Несмотря на различные методы коррекции гипоксии, при анемии в результате аутоиммунного гемолиза происходит гибель отдельных животных, т.к. при анемии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, помимо

гипоксии, клиническое значение имеют гипербилирубинемия, гиперкалиемия и ацидоз. Так, исследования показали, что:

- в 1-й контрольной группе без коррекции гипоксии наблюдается высокая летальность до 56 % в результате нарастающей гипоксии;
- во 2-й группе, основной, где животным использовали ЭМ при коррекции гипоксии, наблюдалась самая высокая летальность до 60 %, это обусловлено возрастающим уровнем билирубина;
- в 3-й группе, основной, где при коррекции гипоксии использовался «Перфторан», летальность самая низкая, не более 13 %, ниже в 4,3–4,6 раза, чем в 1-й контрольной группе и 2-й группе с ЭМ (рисунок 31).

Таблица 17. Летальность животных (собак) при коррекции гипоксии, вызванной аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, с помощью препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы в течение 9-и дней наблюдений

Группы	Исходное кол-во животных	Время наблюдения (дни)							Общая летальность
		1	3	5	6	7	8	9	
1-группа Контроль	23	2	6	1	–	2	1	1	13 из 23 (56 %)
2-группа ЭМ	25	1	6	1	2	–	3	2	15 из 25 (60 %)
3-группа Перфторан	23	1	-	1	1	–	–	–	3 из 23 (13 %)

Данные по летальности показывают, что коррекция гипоксии при тяжелой АИГА необходима, но для этого нужно использовать препараты, не обладающие иммунной агрессией.

Таким образом, можно обобщить, что наиболее перспективным и эффективным способом устранения гипоксии при тяжелой аутоиммунной анемии, вызванной ОАИВСГ, является применение отечественных газотранспортных перфторуглеродных кровозамещающих эмульсий типа «Перфторан».

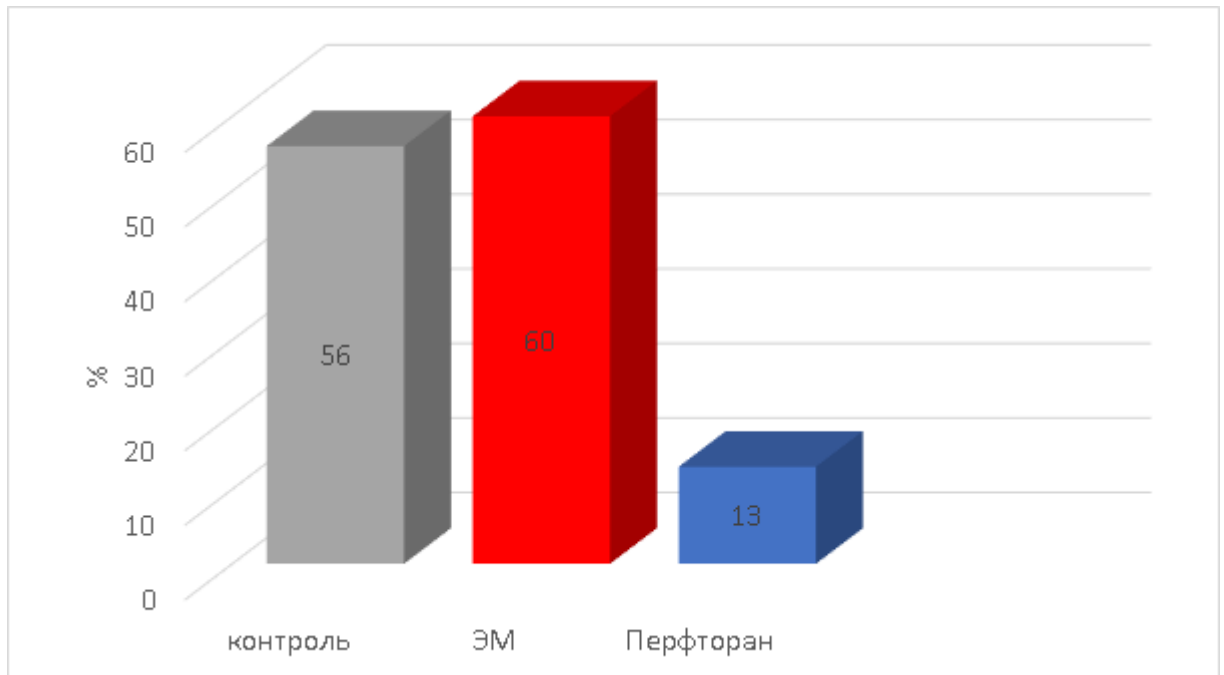


Рисунок 31. Летальность животных (собак) при коррекции гипоксии, вызванной аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, с помощью препарата «Перфторан» и донорской ЭМ за 9 дней наблюдений

На основании полученных данных по коррекции анемии у животных, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что гипоксия при лечении аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза в группе контроля достоверно выше в сравнении с эритроцитарной группой и опытной группой с «Перфтораном».
2. Выявлено, что в опытной группе у животных с анемией, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, которые получили в составе комплексной терапии донорскую ЭМ, уровень гипоксии был достоверно ниже, чем в контрольной группе, но при этом была отмечена гипербилирубинемия в результате усиления аутоиммунного гемолиза, вследствие чего уровень билирубина был достоверно выше, чем в группе контроля и в группе с «Перфтораном».

3. Выявлено, что в группе животных с анемией, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, которые получали в составе комплексной терапии препарат «Перфторан», уровень гипоксии был достоверно ниже, чем в контрольной группе, но при этом уровень билирубина был достоверно ниже, чем в группе с ЭМ, что доказывает отсутствие усиления аутоиммунного гемолиза.
4. Выявлено, что при использовании газотранспортного заменителя донорской крови – препарата «Перфторан» при купировании анемии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, побочные реакции в виде аллергических возникли у одного из десяти животных и были благополучно купированы.
5. Выявлено, что при использовании донорской эритроцитарной массы при купировании анемии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, побочные реакции в виде аллергических не наблюдались.
6. Установлено, что наиболее высокая летальность у собак наблюдалась во второй группе (60 %), где проводили коррекцию гипоксии животным с использованием донорской ЭМ. У животных первой группы, которым не использовались препараты для коррекции гипоксии, при АИА, летальность существенно не отличалась от 2 группы с ЭМ, но была ниже и составила 56%. Самая низкая летальность наблюдалась в третьей группе с препаратом «Перфторан» и составила (13 %).
7. Установлена высокая эффективность применения газотранспортной кровозамещающей эмульсии – препарата «Перфторан» – при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе как альтернативного заменителя донорских эритроцитов у животных.

Как показало данное исследование, инфузия газотранспортного перфторуглеродного препарата «Перфторан», проведенная животным при бабезиозе, осложненном тяжелой аутоиммунной анемией, которая вызвана острым аутоиммунным внутрисосудистом гемолизом, для компенсации гипоксического состояния обеспечивает необходимый кислородный баланс без

усиления аутоиммунного гемолиза, и препарат «Перфторан» может быть рекомендован для использования при тяжелых аутоиммунных анемиях.

Заключение

В комплексной терапии анемии успех лечения определяется быстрым устранением гипоксии, а также скорейшим устранением кислородной недостаточности жизненно важных органов. Следовательно, понятен интерес, который проявляют исследователи разных стран к созданию и изучению эмульсий перфторуглеродов, являющихся основой инфузионных сред, обладающих газотранспортной функцией [25, 75]. Большая часть исследований препаратов, содержащих эмульгированные ПФУ, касается молекулярных и физико-химических механизмов их действия, а клинико-биологические аспекты их применения мало изучены. Основное внимание в данной диссертационной работе уделено детальному исследованию и логическому обобщению сведений, характеризующих особенности поведения эмульсий ПФУ в организме животных с учетом их клинико-биологических аспектов.

Современные методы лечения АИГА обусловили острую необходимость использования искусственных кислородпереносящих сред, которые хотя бы частично могли выполнять функцию Эр и быть относительно последних иммуноинертными [13, 80]. Сегодня существуют два направления данных препаратов. Одно из них связано с модификацией гемоглобина и свойствами, близкими к нативному гемоглобину в Эр [82, 90]. Второе направление – это плазмозаменитель с функцией переноса кислорода, содержащий эмульсии перфторорганических соединений, что способствует растворению в единице объема большего количества кислорода по сравнению с любым водным раствором [113, 120].

В данном диссертационном исследовании для коррекции гипоксии у животных, возникшей в результате анемии как травматического, так и аутоиммунного генеза, использовали отечественный плазмозаменитель с функцией переноса кислорода «Перфторан». Эмульсия ПФУ показала хороший терапевтический эффект, как при анемиях, связанных с кровопотерей, так и при АИ анемии в результате ОАИВСГ.

Одной из главных патофизиологических задач при тяжелой анемии является устранение гипоксии и доставка кислорода к жизненно важным органам и тканям. Возмещение кровопотери с помощью гемодилюции традиционными плазмозаменителями без газотранспортной функции приводит к уменьшению кислородной емкости полученной смеси, что ухудшает кислородтранспортные свойства крови. Понижение кислородной емкости крови не всегда может компенсироваться увеличением скорости кровотока и другими механизмами адаптации. Поэтому создание и применение полноценных гемодилютантов на основе газотранспортных кровезамещающих препаратов, способных при возмещении кровопотери не уменьшать кислородную емкость крови и ее реологические свойства, в настоящее время актуальны [14, 78].

Таковыми препаратами – гемодилютантами – кровезаменителями с функцией переноса кислорода – являются перфторуглеродные эмульсии, переносящие любой газ, в том числе кислород и углекислый газ. Отечественные перфторуглеродные кровезаменители типа «Перфторана» (разрешенный к клиническому применению) и «ФТОРэмульсия III» (проходящий клинические испытания) состоят из смеси перфторорганических соединений [12].

Транспорт O_2 различными компонентами крови после инфузии 10 мл/кг эмульсии ПФОС, согласно расчетам, составляет: эритроциты несут 98,3 % общего O_2 крови, плазма – 1,29 %, эмульсия ПФОС – 0,5 % [6, 62]. При этом необходимо учитывать, что антигипоксический эффект препарата «Перфторан» обусловлен следующими биофизическими механизмами:

- 1) непосредственный обмен газов между клетками, окружающей их средой и кровью осуществляется свободными молекулами O_2 и CO_2 , следовательно, циркуляция в сосудистом русле частиц эмульсии существенным образом увеличивает кислородную емкость плазмы физически растворенным кислородом (на 38 %), особенно ее буферную емкость по отношению к потребляемому O_2 [39, 57];

- 2) эмульсия ПФОС улучшает кислородное снабжение тканей путем усиления экстракции кислорода частицами эмульсии из эритроцитарного гемоглобина [2, 102];
- 3) увеличение массопереноса O_2 в плазме в присутствии ПФОС становится намного выше за счет ускоренной диффузии O_2 в ПФОС. Это связано с тем, что константа диффузии Крота для O_2 и CO_2 на порядок больше в ПФОС, чем в плазме [38];
- 4) увеличение массопереноса O_2 в присутствии ПФОС происходит за счет большей скорости насыщения кислородом ПФОС, т.к. скорость оксигенации ПФОС на порядок больше, чем оксигенация эритроцитов [11];
- 5) увеличение массопереноса O_2 при введении эмульсии ПФОС связано с большой поверхностью газообмена у субмикронных частиц данной эмульсии. Известно, что при уменьшении напряжения кислорода суммарная величина диффузии сохраняется за счёт увеличения поверхности газообмена. В эмульсии ПФОС при относительно высоком напряжении кислорода (pO_2 до 100 мм рт. ст.) суммарная поверхность частиц эмульсии ПФОС, например, в 700 мл составляет 8400 м², что позволяет сохранять необходимую величину диффузии [34, 111].

На основании опубликованных данных и собственных исследований установлено, что гипоксия, развивающаяся при острой ПГА, и гипоксия, развивающаяся при ОАИВСГ, нуждаются в коррекции, путем введения в организм донорских Эр или искусственных кислородоносителей. При тяжелых анемиях, когда кровопотеря превышает 60 % ОЦК или гематокрит при ОАИВСГ падает до 12 %, возникает острый дефицит кислорода в тканях. В этом случае пациенту необходимо незамедлительно провести заместительную терапию ЭМ. Но если при постгеморрагической анемии это даст быстрый и хороший клинический результат, без повышения билирубина, то при ОАИВСГ может привести к необратимым негативным последствиям для реципиента [13, 14, 51].

Наши исследования установили, что при введении ЭМ собакам с ОАИВСГ появляется критическая гипербилирубинемия вследствие усиления ОАИВСГ, что вызывает высокую летальность (рисунок 32).

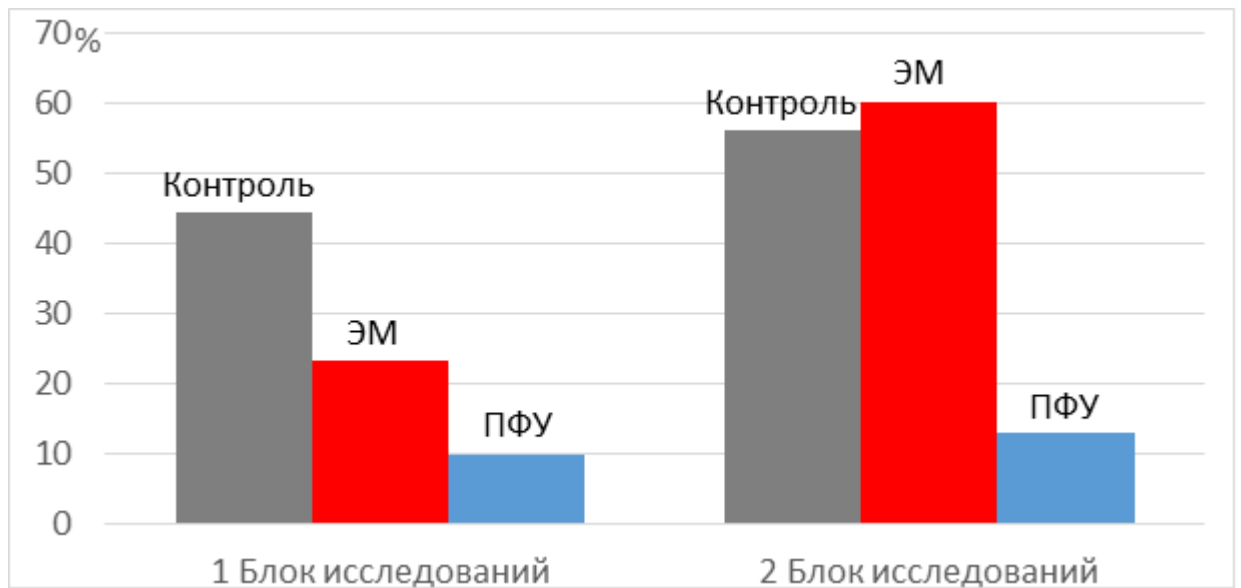


Рисунок 32. Летальность животных между двумя блоками исследований при коррекции гипоксии, вызванной постгеморрагической анемией (1 блок исследований) и аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом (второй блок исследований)

При использовании в таких случаях перфторуглеродной эмульсии – препарата «Перфторан» аутоиммунный гемолиз не усиливается и, как следствие, показатель билирубина не возрастает, что существенно повышает выживаемость больных собак при тяжелой АИГА. ПФУ иммуно неагрессивны по сравнению с донорскими Эр и достоверно не приводят к усилению ОАИВСГ, а следовательно, и к увеличению гипербилирубинемии.

В результате развития аутоиммунного гемолиза и вызванного им внутрисосудистого гемолиза как собственных Эр, так и донорских, образуется большое количество свободного Нв и, как следствие, происходит резкое повышение в крови несвязанного билирубина. Это приводит к дополнительной интоксикации и гибели ослабленного анемией организма больного. Эмульсия ПФУ, в отличие от донорской ЭМ, введенная таким животным экстренно, достоверно уменьшает гипоксемию и не повышает уровень билирубина. По нашим данным, выживаемость животных при ОАИВСГ, возникшем в результате бабезиоза, повышается, если своевременно купировать гипоксию и снять интоксикацию, где применение газотранспортной кровозамещающей эмульсии –

препарата «Перфторан» достоверно показало наилучший результат по сравнению с донорской ЭМ [13, 14].

В данной работе сделан акцент на изучение непосредственно особенностей ОАИВСГ и возникающей в результате данного патологического процесса тяжелой анемии. Если при внесосудистом АИ гемолизе развитие регенераторной анемии характеризуется преимущественно хроническим течением и, как правило, не нуждается в экстренной заместительной терапии, то при ОАИВСГ механизмы компенсации не успевают развиться, и пациент гибнет от гипоксии в результате некомпенсированной тяжелой анемии. Следовательно, пациенту с тяжелой анемией, которая развивается в результате ОАИВСГ, необходимо проводить заместительную терапию по устранению гипоксии, как правило, немедленно, учитывая при этом побочные действия используемых средств.

Таким образом, применение газотранспортной кровозамещающей эмульсии – препарата «Перфторан», при анемии, вызванной ОАИВСГ, актуально, особенно на фоне противопоказаний к использованию донорских эритроцитов. Применение искусственных кислородоносителей позволяет обеспечить органы и ткани кислородом, не вызывая усугубления аутоиммунного процесса. У животных с тяжелой анемией (Ht 10–12 %) эмульсия ПФУ в течение 48 ч поддерживает обеспечение жизненно важных органов кислородом, в то время как активный ретикулярный ответ, возникающий при АИГА, способствует образованию новых Эр из ретикулоцитов. Это приводит к восстановлению эритроцитарного пула без использования донорских эритроцитов, что позволяет отсрочить трансфузию донорской ЭМ или избежать ее полностью, тем самым нивелируя осложнения от применения донорской ЭМ при АИГА.

По результатам проведенных исследований в рамках данной диссертационной работы, выявлены особенности использования газотранспортной кровозамещающей эмульсии – препарата «Перфторан» у животных.

Установлено, что при гематологических нарушениях, сопровождающихся гиповолемией и гипоксией, «Перфторан» вводят в/в в дозе 1,5–30 мл/кг массы тела животного. Максимального эффекта от введения можно добиться, используя

высокие дозы на фоне ингаляции обогащенной кислородом воздушной смесью (60–70 %) в момент и в течение суток после введения. Растворение газов в перфторуглеродах и их высвобождение при изменениях парциального давления происходит чрезвычайно быстро, почти мгновенно. Это одна из наиболее ценных характеристик перфторуглеродов. Дыхание чистым кислородом повышает парциальное давление кислорода в альвеолярном воздухе и прямо пропорционально коррелирует со способностью «Перфторана» его растворять [34, 58].

«Перфторан» обладает высокой способностью растворять двуокись углерода, величина которой минимум в 4 раза выше, чем кислорода, и может достигать 50 об.%. После переливания это может проявляться некоторым увеличением парциального напряжения двуокиси углерода в капиллярной и венозной крови. Наиболее эффективно газотранспортная кровозамещающая эмульсия – препарат «Перфторан» реализует свои свойства в первые 6 ч после введения [41].

Следует остановиться на возможных аллергических реакциях (крапивница, кожный зуд, озноб, удушье, гипертермия, тахикардия, снижение артериального давления) и анафилактикоидных реакциях.

По результатам наших исследований, аллергические реакции у собак протекают в виде внезапного молниеносно развивающегося анафилактикоидного коллапса. Животные впадают в состояние ступора, теряют способность сохранять естественное положение тела, развивается тетраплегия; слизистые конъюнктивы в ротовой полости становятся фарфорово-бледными, скорость наполнения капилляров около 3 сек., зрачки сужаются, пропадает их реакция на свет, дыхание становится поверхностным. Возможны непроизвольные акты мочеиспускания, дефекации и рвота. Из ротовой полости выделяется густая клейкая пена, развивается отек легких, отчетливо различимый при аускультации.

Приступ купируется введением мочегонных препаратов (фуросемид), аналептических препаратов (кордиамин), глюкокортикостероидов (преднизолон), М - холиноблокаторов (атропин) в дозах, адекватных массе животного и тяжести состояния. Необходима интенсивная оксигенация (как

правило, введение «Перфторана» проводится на ее фоне). При проведении инфузии «Перфторана» необходимо держать набранные и подписанные шприцы с указанными веществами, поскольку незначительное промедление при купировании криза может стать причиной гибели животного [115].

Введение «Перфторана» животным всегда необходимо начинать с биопробы, заключающейся в постепенном контролируемом введении микродоз вещества, получаемых растворением 0,1 мл суспензии в 20 мл физиологического раствора. После введения 0,5 мл полученного раствора стоит подождать 2–3 мин и посмотреть на реакцию, при ее отсутствии дробно вводится еще около 10 мл. Далее поэтапно с 1, 3, 5 капель с промежутками в две минуты начинается введение чистого препарата постепенным увеличением объема и скорости инфузии до одной капли в три секунды [12].

Скорость введения определяется с учетом состояния животного, в среднем около 20–30 капель в минуту. При появлениистораживающих симптомов необходимо прекратить инфузию, дать возможность «адаптироваться» организму и после некоторого промежутка времени, определяемого эмпирически, продолжить введение препарата. У животных с выявленными шоковыми реакциями при повторном введении эмульсии ПФУ через несколько часов анафилактикоидных реакций не проявлялось. В большинстве случаев подобного рода осложнения были следствием слишком быстрого введения препарата «Перфторан».

По результатам наших экспериментальных исследований было выявлено, что использование «Перфторана» при анемиях у животных сопровождается минимальными побочными реакциями. Не более 8% животных реагировали на введение газотранспортной кровозамещающей эмульсии – препарата «Перфторан» в виде анафилактикоидной реакции, которая быстро купировалась заранее подготовленными препаратами. Отсюда следует, что при соблюдении правил применения лекарственного препарата использование газотранспортной кровозамещающей эмульсии – препарата «Перфторан» животным безопасно.

Выводы

1. Выявлено, что при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе, в отличие от острой кровопотери, применение донорской эритроцитарной массы вызывает сильный побочный эффект в виде усиления внутрисосудистого гемолиза и гипербилирубинемии, являющихся важным звеном патогенеза, приводящих к дополнительному поражению печени и почек у животных, что резко увеличивает летальность, несмотря на проведенное этиотропное лечение.
2. Показано, что коррекция гипоксии при острой кровопотере с помощью газотранспортных препаратов: перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы более эффективна по сравнению с традиционным лечением гипоксии препаратами без газотранспортной функции, при которых летальность достигала 44,4%.
3. Коррекция гипоксии, вызванной острой кровопотерей с помощью перфторуглеродной эмульсией «Перфторан» показала высокую газотранспортную и клиническую эффективность эмульсии: несмотря на низкий уровень гематокрита организм не испытывал тканевой гипоксии, что отразилось в низкой степени летальности 9,9%, в отличие от донорской эритроцитарной массы при которой летальность достигала 23%.
4. Коррекция гипоксии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, с помощью перфторуглеродной эмульсией «Перфторан» показала высокую клиническую и газотранспортную эффективность эмульсии, что отразилось на низкой степени летальности 13%, в отличие от донорской эритроцитарной массы, которая усиливает аутоиммунный внутрисосудистый гемолиз у реципиентов и не обеспечивает необходимое лечебное действие, что приводит к резкому повышению летальности до 60%.

5. Выявлены побочные реакции у 8-10% животных при коррекции гипоксии с использованием перфторуглеродной эмульсии «Перфторан», но при своевременном купировании опасности для организма не представляющие. Однако, количество побочных реакций при коррекции гипоксии с использованием донорских эритроцитов у иммуносложных реципиентов значительно выше, в несколько раз.

Список сокращений и условных обозначений

2,3 БФГ – 2,3 бисфосфолипид

2,3ДФГ – 2,3 дисфосфолипид

АА – апластическая анемия

АГ – антиген

АИ – аутоиммунный

АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АТ – антитело

в/в – внутривенно

в/м – внутримышечно

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГА – гемолитическая анемия

ГГТ – гамма-глутамилтрансфераза

ГКС – глюкокортикостероиды

ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови

ИТТ – инфузионно-трансфузионная терапия

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛС – лекарственные средства

ОАИВСГ – острый аутоиммунный внутрисосудистый гемолиз

ОПН – острая почечная недостаточность

ОЦК – объем циркулирующей крови

п/к – подкожно

ПГА – постгеморрагическая анемия

ПАВ – поверхностно-активные вещества (эмульгаторы)

ПФД – перфтордекалин (газотранспортное соединение)

ПМЦП – перфторметилциклогексилпиперидин (газотранспортное соединение)

ПФОС – перфторорганические соединения

ПФУ – перфторуглероды

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СМФ – система мононуклеарных фагоцитов

ХПН – хроническая почечная недостаточность

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭМ – эритроцитарная масса

Эпо – эритропоэтин

Эр – эритроцит

СО₂ – содержание углекислого газа в выдыхаемом воздухе

DEA – дог эритроцитарный антиген

Ig – иммуноглобулин

Ht – гематокрит

Hb – гемоглобин

МСН – относительное содержание гемоглобина в эритроците

МСНС – посредством средней концентрации гемоглобина в эритроците

SpO₂ – сатурация кислородом

Список литературы

1. Алексеев Н.А. Анемии. // СПб., 2004. 512 с.
2. Афонин Н.И., Доронина Н.Н. Фторуглероды как возможные кровезаменители переносчика кислорода // Проблемы гематологии и переливания крови. 1981. Т. 4, № 1. С. 41–45.
3. Белоярцев Ф.Ф. Перфторированные углероды в биологии и медицине // Сб. Пущино. 1980. С. 5-21.
4. Белоярцев Ф.Ф. Фторуглеродные газопереносящие среды // Сб. Пущино. 1984. 168 с.
5. Ваден Ш., Нолл Д., Смит Ф. Полное руководство по лабораторным и инструментальным исследованиям у собак и кошек. М.: Аквариум Принт, 2013. 1120 с.
6. Воробьев С.И. Электрофизиологический анализ эмульсии перфторуглеродов при коронарной перфузии сердца. // Фторуглеродные газопереносящие среды: Сб. Пущино. 1984. С. 134-141.
7. Воробьев С.И. Перфторан синтетический кровезаменитель с газотранспортной функцией // Уч. пособие. М., 2013. 73 с.
8. Воробьев С.И. Перфторуглеродные эмульсии I и II поколения // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43, № 4. С. 30–40.
9. Воробьев С.И., Вотрин С.В., Болевич С.Б. и др. Биологические и физико-химические действия синтетической эмульсии перфторуглеродного заменителя крови. // Нетрадиционные природные ресурсы. Инновационные технологии и продукты, 2016, №24, С. 220-229.
10. Воробьев С.И., Вотрин С.В., Болевич С.Б. и др. Перфторуглеродные кровезаменители - термодинамически неустойчивые лиофобные коллоидные системы. // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты, 2016, № 24, С. 59-68.

11. Воробьев С.И. Использование субмикронных перфторуглеродных эмульсий, стабилизированных проксанолом в биологии и медицине: дисс. док. биол. наук. 1994. 276 с.
12. Воробьев С.И., Моисеенко О.М. Коллоидно-химические и медико-биологические свойства перфторуглеродного препарата «Фторэмульсия III» // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43, № 5. С. 21–30.
13. Вотрин С.И., Болевич С.Б., Воробьев С.И. и др. Устранение гипоксии при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе эритроцитов с помощью перфторуглеродной кровезамещающей эмульсии в эксперименте. // Сеченовский вестник. 2018. (2). С. 5-13.
14. Вотрин С.В., Воробьев С.И. Применение перфторуглеродного кровезаменителя при лечении острой постгеморрагической анемии у кошек // Российский ветеринарный журнал. 2017. № 8. С. 16–21.
15. Гительзон И.И., Терсков И.А. Состав красной крови в норме и патологии. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1960. 200 с.
16. Гласко Е.Н., Логинова Л.Н., Хохлова М.П. Сравнительные гистологические исследования в эксперименте действия различных перфторорганических соединений // Гематология и трансфузиология. 1983. Т. 28, № 4. С. 49–52.
17. Гончарова Е.И., Пинаев Г.П. Белки цитоскелета эритроцитов // Цитология. 1988. Т. 30, № 1. С. 5–18.
18. Гулевский А.К. Влияние низкотемпературного воздействия на проницаемость мембран эритроцитов, реконструированных в средах разного ионного состава // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1981. Т. 91, № 5, С. 551–552.
19. Дроздова М.В. Заболевания крови. Киев: Свет. Звезда, 2009. 632 с.
20. Есауленко Е.Е., Бачко С.С., Ладутько А.А. Сравнительная биохимическая характеристика липидного спектра мембран эритроцитов при различных видах токсического поражения печени // Успехи современного естествознания. 2011. № 7. С. 54–56.

21. Жибурт Е.Б. Правила переливания плазмы. М.: Изд-во «Медицина», 2008. 240 с.
22. Зверко В.Д., Ракуть В.С., Зинчук В.В. Патогенетическое значение деформируемости эритроцитов в механизмах развития гестоза. // Медицинские новости. 1999. № 7. С. 51–52.
23. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Роль кислородсвязывающих свойств крови в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма. // Успехи физиологических наук. 1999. Т. 30, № 3. С. 38–48.
24. Иваницкий Г.Р. О развитии фундаментальных и прикладных исследований по проблеме «Перфторуглероды в биологии и медицине» в СССР. Препринт. Пущино, 1983. 32 с.
25. Иваницкий Г.Р., Воробьев С.И. Физико - химические и клинические исследования перфторорганических соединений // Пущино. - 1994. С.118.
26. Иоффе Л.А., Смирнова Л.А. Динамика объема циркулирующей крови при локальной декомпрессии. // Теория и практика физ. культуры. 1977. № 7. С.27–31.
27. Иржак Л.И. Состав и функции крови. // Соросовский образовательный журнал. 2001. № 2. С. 11–19.
28. Исламов Б.И. Противоишемическая защита миокарда эмульсией перфторуглеродов // Автореф. дисс. док. мед. наук. Москва. 1987. 42 с.
29. Карпенко Л.Ю., Вахта А.А. Особенности состояния антиоксидантной системы собак, больных сахарным диабетом. // Материалы научн. междунар. конф. профессорско-преподавательского состава, научн. сотрудников и аспирантов. СПб.: Изд-во СПбГАВМ, 2005. С. 41–43.
30. Карр Я. Макрофаги. М.: Медицина, 1978. 190 с.
31. Катюхин Л.Н. Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 1995. Т. 81, № 6. С. 122–129.
32. Киселёва Р.Е., Трофимов В.А. Мембранотропные эндотоксины в оценке патологических процессов. // Сб. материалов Всерос. научно-практич. конф.

- «Лабораторное дело, организация и методы исследования». Пенза, 2001. С. 5–7.
33. Конопля А.И. Взаимосвязь структуры и функции эритроцитов с иммунным гомеостазом. Курск: КГМУ, 2008. 40 с.
 34. Кузнецова И.Н., Функциональная активность и стабильность эмульсий перфторуглеродов // Автореф. дис. д-ра биол. наук. Пушкино.1999. 38 с.
 35. Кучеренко В.З. Применение методов статистического анализа для изучения общественного здоровья и здравоохранения. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 256 с.
 36. Лесникова Л.Н. Стрессорные изменения физиологических свойств эритроцитов и их коррекция с помощью экстракта из туники асцидии пурпурной. Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток: ДВОР АН, 2006. 22 с.
 37. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы гипоксии. // Вестник РАМН. 2000. № 9. С. 3–12.
 38. Маевский Е.И. Биологические эффекты фторуглеродов и проксанолов. // Перфторированные углеводы в биологии и медицине. Сб. Пушкино, 1980. С. 76–81.
 39. Маевский Е.И. Коррекция гипоксических состояний путём поддержания функций митохондрий // Автореф. дис. д-ра мед. наук. 1998. 36 с.
 40. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2002. 208 с.
 41. Мороз В.В., Герасимов Л.В., Васильев С.А., Остапченко Д.А., Молчанова Л.В. Влияние перфторана на гемостаз у больных с тяжелой травмой и кровопотерей. // Общая реаниматология. М., 2007. № 3/1. 38-42с.
 42. Ниманд Х.Г., Сутер П.Ф. Болезни собак: Практическое руководство для ветеринарных врачей. М.: Аквариум Принт, 2004. 816 с.
 43. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: ТГУ, 2004. 202 с.
 44. Ольшанская А.Я., Одинокова В.А., Квитко Н.Н. Эритроциты в тканевом и иммунном гомеостазе. // Советская медицина. 1984. № 11. С. 43–48.

45. Панченкова О.А. Защитное действие нового антидота на основе карбоксима при отравлении фосфорорганическими соединениями. Автореф. дис. канд. биол. наук: 03. 00. 13. СПб, 2009. 19 с.
46. Петров И.Р., Филатов А.Н. Плазмозаменяющие растворы. Л.: Медгиз, 1963.
47. Пламб Д.К. Фармакологические препараты в ветеринарной медицине. М.: «Аквариум ЛТД», 2002. 856 с.
48. Полещук О.И., Авшалумов А.С., Марковский В.Б. Изменение реологических свойств крови у больных метаболическим синдромом. // Российский медицинский журнал, 2008. Т. 16, № 4. С. 35–39.
49. Прозоровский В.Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентраций биологически активных веществ. Байкальск: Изд-во Общества духовной и психической литературы, 1994. 46 с.
50. Пшеничная Л.Н., Гудкин Л.Р., Харченко М.Ф. Изучение некоторых физико-химических свойств комплексного соединения гемоглобина с модифицированным альбумином. // Проблемы гематологии и переливания крови. 1980. Т. 25, № 9. С. 8–12.
51. Рагимов А.А. Трансфузиология: национальное руководство. // под ред. проф. А.А. Рагимова. М.: ГЕОТАР- Медиа, 2015. 1184 с.
52. Резван С.Г., Стародубцева Н.А., Жданова О.А., Артюхов В.Г. Структурные нарушения мембран эритроцитов крови больных различными формами нефропатий. // сб. трудов II Российской конф. «Физика в биологии и медицине». Воронеж: ВГУ, 2001. 543 с.
53. Розенберг Г.Я. Искусственный переносчик кислорода на основе химически модифицированного гемоглобина. // Парентеральное белковое питание и новые кровезаменители: сб. М., 1977. С. 91–92.
54. Рукавицын О.А. Анемии. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР- Медиа, 2016. 256 с.
55. Савельев В.А. Статистика. М.: АСТ, 2019. 192 с.
56. Селезнев С.А., Назаренко Г.И., Зайцев В.С. Клинические аспекты микрогемодиализации. Л.: Медицина, 1985. 208 с.

57. Симанов В.А. Фторуглероды в экстракорпоральной оксигенации крови. // Перфторированные углероды в биологии и медицине: сб. Пущино, 1980. С. 138–150.
58. Склифас А.Н. Исследование механизмов аккумуляции и выведения перфторорганических соединений в организме животных // Автореф. дис. канд. биол. наук. Пущино. 2000. 15 с.
59. Стародубцева М.Н., Кузнецова Т.Г., Егоренков Н.И. АСМ исследование эритроцитов, кренированных активными формами азота. // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии. VII Международный семинар: сб. докладов. Минск: Институт тепло- и массообмена им.А.В. Лыкова НАН Беларуси. 2006. С. 148–152.
60. Сторожок С.А., Санников А.Г., Белкин А.В. Зависимость стабильности деформабильности мембран эритроцитов от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета. // Научный вестник ТГУ. 2000. Т. 3. С. 34–76.
61. Сторожок С.А., Санников А.Г., Захаров Ю.М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. Тюмень: ТГУ, 1997. 140 с.
62. Терешина Е.В. Взаимодействие эмульсий перфторорганических соединений с дисперсной системой крови. // Автореф. дис. д-ра биол. наук. Пущино. 2003. 38 с.
63. Токарев Ю.Н., Кочетков Н.И., Германов В.А. Разработка современных проблем гематологии и трансфузиологии в США. // Проблемы гематологии и переливания крови. 1981. Т. 26, № 11. С. 56–60.
64. Тухватулин Р.Т. Адаптивные изменения обратимой агрегации эритроцитов. // Автореф. дис. д-ра биол. наук. Томск, 1996. 29 с.
65. Уилсон Д.Т. Молекулярная биология клетки. М.: Мир. 1994. 319 с.
66. Федоров Н.А., Недошивина Р.В. Изучение функционального состояния РЭС при трансфузионной терапии острой кровопотери. // Трансфузионная терапия в клинике и эксперименте: сб. М., 1982. С. 73–74.

67. Федосеев Г.Б. Механизмы обструкции бронхов. СПб.: Медицинское информационное агентство, 1995. 336 с.
68. Фомин Н.А. Физиология человека. М.: Просвещение, 1995. 19 с.
69. Черников В.С. Легочное дыхание в жидких средах. // Перфторированные углероды в биологии и медицине: сб. Пущино, 1980. С. 129–135.
70. Шахламов В.А. Капилляры. М.: Колос, 1971. 234 с.
71. Шеппард У., Шартс К. Органическая химия фтора. М.: Мир, 1972. 480 с.
72. Шibaев Н.В. Получение и фармакологическая характеристика плазмозаменителя с газотранспортной функцией на основе эмульсии перфторуглеродов: дис. канд. мед. наук. Пущино: Институт биологической физики АН СССР, 1984. 147 с.
73. Шиффман Д.Ф. Патопфизиология крови. М.: БИНОМ, 2017. 397 с.
74. Яворская В.А., Белоус А.М., Мохаммед А.Н. Исследование уровня молекул средней массы и процессов перекисного окисления липидов в крови больных с разными формами инсульта. // Журнал неврологии и психиатрии. 2000. № 1. С. 48–51.
75. Ярочкин В.С., Козинер В.Б. Проблема создания «искусственной крови» на основе фторорганических соединений. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1981. № 3. С. 78–87.
76. Adrill B., Fentem P., Finley R. Some effects on the blood vessels of the human forearm of local exposure to pressure below sub atmospherica. // Journal of Physiology. 1969. Vol. 80. P. 31.
77. Anderson J.W. Physiological and metabolic effects of dietary fiber // Federation proceedings. 1985. Vol. 44, № 14. P. 2902–2906.
78. Aono M., Gollan F. Oxygen transport by colloidal fluorocarbon suspensions in bloodless animals. // Federation proceedings. 1974. Vol. 33, № 3. P. 455.
79. Auerbach A. International Fanconi anemia registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity // Blood. 1989. Vol. 73. P. 391

80. Baba S. The intraluminal administration of perfluorochemicals to the ischaemic gastrointestinal tract. // Green cross corporation tech. Information. 1981. № 7. P.75-79.
81. Bermejo F., Garcia-Lopez S. A guide to diagnosis of iron deficiency and iron deficiency anemia in digestive diseases. World J Gastroenterol., 2009. 7. 15(37). P. 4638-4643.
82. Bialas C., Moser C., Sims C.A. Artificial oxygen carriers and red blood cell substitutes: A historic overview and recent developments toward military and clinical relevance. // Trauma and Acute Care Surgery. 2019. Vol. 87, № 1. P. 48-58.
83. Bonhard K. Acute oxygen supply by infusion of hemoglobin solutions. // Federation proceedings. 1975. Vol. 34, № 6. P. 1466–1467.
84. Borghi N., Brochard-Wyart F. Tether extrusion from red blood cells: Integral proteins unbinding from cytoskeleton. // Biophysical Journal. 2007. № 93. P. 1369–1379.
85. Bunn H.F. Sickle hemoglobin and other hemoglobin mutants. The molecular basis of blood diseases. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. P. 207–256.
86. Chang T.M. Artificial red blood cells. // Transactions – American Society for Artificial Internal Organs. 1980. Vol. 26. P. 354–357.
87. Cowin P.M., Burke B. Cytoskeletal-membrane interactions. // Current Opinion in Cell Biology Cell Biology. 1996. Vol. 8. P. 56–65.
88. Daleke D.L. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. // Current Opinion in Hematology. 2008. № 15. P. 191–195.
89. Day M., Mackin A., Littlewood J., eds. Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. // Dorset: Lookers. 2000. P. 320.
90. Eloit S., Torremans A. Kinetic behavior of urea is different from that of other water-soluble compounds: the case of the compounds. // Kidney International. 2005. № 67. P. 1566–1575.
91. Eriksson L.C., Elhammer A., Torndal U.B. The study of biogenic pathways using a perfusion technique containing perfluorochemicals. // British journal of experimental pathology. 1979. № 60 (2). P. 193–200.

92. Gartner L.P, Hiatt J.M. Color Textbook of Histology. Philadelphia: W. B. Saunders. Comp. 2006. 592 p.
93. Gould S.A., Rosen A.L., Schgal L. Hemoglobin solutions as red cell substitutes. // Transactions – American Society for Artificial Internal Organs. 1980. Vol. 26. P. 350–353.
94. Glorieux G., Dhondt A., Jacobs P. In vitro study of the potential role of guanidines in leucocyte function related atherogenesis and infection. // Kidney International. 2004. № 65. P. 2184–2192.
95. Graham C., Paula F. Emulsion dodekaptortorgena (DDFPE) as a resuscitation fluid for the treatment of hemorrhagic shock and traumatic brain injury: review. // Journal SHOCK. 2019. Vol. 52. № 1. P. 50-54.
96. Ipsaro J.J., Huang L., Mondragon A. Structures of the spectrin-ankyrin interaction binding domains. // Blood. 2009. № 113. P. 5385–5393.
97. Kaoui B., Biroş G., Misbah C. Why Do Red Blood Cells Have Asymmetric Shapes Even in a Symmetric Flow? // Physical Review Letters. 2009. № 103. P. 188.
98. Kavanaugh M.J., Decker C.F. Babesiosis // Dis Mon. 2012. № 58 (6). P. 355–360.
99. Kylstra J.A. Breathing fluid. // Experientia. 1962. V. 18. № 2. P. 68.
100. Lempereur L., De Cat A. First molecular evidence of potentially zoonotic Babesia microti and Babesia sp.EU1 in Ixodes ricinus ticks in Belgium. // Vektor Borne Zoonotik Dis. 2011. № 11. P. 125–130.
101. Liillmann H., Mohr K., Wehling M. Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart : Thieme, 2003. P. 624.
102. Lutz J., Barthel U., Metrenaner P. Increased susceptibility to endotoxin shock following treatment with perfluorochemicals: its time course and modification by drugs. // Pflügers Archiv: European Journal of Physiology. 1980. Vol. 384. № 24. P. 153–159.
103. Mescher A. Edition of Junqueira's Basic Histology // The McGraw – Hill Companies, 2009. 480 p.

104. Mohandas N., Chasis J.A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. // *Seminars in Hematology*. 1993. Vol. 30. P. 171–192.
105. Mok W., Chen D., Mazur A. Cross-linked hemoglobins as potential plasma protein extenders. // *Federation proceedings*. 1975. Vol. 34. № 6. P. 1458–1460.
106. Nakache M., Caprani A., Dimicoli J.L., Schepers E., Meert N., Glorieux G. P-cresylsulfate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. // *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2007. № 22. P. 592–596.
107. Parthasarathi K., Lipowsky H. Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability. // *Journal of Physiology*. 1999. Vol. 277. № 6. P. 2145–2157.
108. Pogorelov A.G., Rusakov A.V., Pogorelova V.N. Cytoplasmic Potassium–Sodium Balance in the Cardiac Muscle Cell of Young and Old Rats in Oxygen–Substrate Deficiency. // *Biofizika*. 2006. Vol. 51. №5. P. 852–858.
109. Sloviter H.A. Perfluoro compounds as artificial erythrocytes. // *Federation proceedings*. 1975. Vol. 34, № 6. P. 1484–1487.
110. Spiess B.D. Military Supplement: Perfluorocarbon Emulsions, Platelet Counts and Inflammation // *Journal Shock*. 2019. Vol. 52, Issue 1S. P. 13–18.
111. Okumura S., Ohyanagi H., Sekita M. Studies of administered perfluorochemical emulsions on the endocrine system. // *Proc. of the 10th Intern. Symp. on perfluorochemical artificial blood*, Kyoto. 1975. P. 271–277.
112. Van-Gelder J.M., Nair C.H., Dhall D.P. Erythrocyte aggregation and erythrocyte deformability modify the permeability of erythrocyte enriched fibrin network. // *Thrombosis Research*. 1996. Vol. 1, № 82. P. 33–42.
113. Vorobyev S.I., Kutysenko V.P., Bolevich S.B., Votrin S.V. Gas transport characteristics of hemocorrectors and perfusates based on perfluor-carbon blood-substituting emulsion // *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 2020, vol. 21 (2), pp. 147-155.

114. Vorobyev S.I., Votrin S.V., Bolevich S.B. Pathophysiological basis for the use of perfluorocarbon blood substitutes with gas transport function. 8 th International Congress off Pathophisiology, Septembr 03, 2018, P. 18.
115. Votrin S.V., Vorobyev S.I., Bolevich S.B. Use of perfluorocarbon based blod substitute Perftoran in correction of hypoxia dyring acute anemia in animals. // Serbian Journal of Experimental and Clinical Research. 2019. Vol. 20 (3). P. 245–250.
116. White R.A., Peters L.L., Adkison L.R. The murine pallid mutation is a platelet storage pool disease associated with the protein 4.2 (pallidin) gene. // Nature Genetics. 1992. № 2. P. 80– 83.
117. Willcox M.L., Newman M.M., Paton B.C. A study of labeled pluronic F-68 after intravenous injection into the dog. // Journal of Surgical Research. 1978. Vol. 25, № 4. P. 349–356.
118. Williamson R.C., Toye A.M. Glycophorin A: Band 3 aid // Blood Cells Molecules and Diseases. 2008. Vol. 41 (1). P. 35–43.
119. Wilson P.W., Grandy S.M. The metabolic syndrome: practical guide to origins and treatment: part I. // Circulation. 2003. Vol. 108. P. 1422–1425.
120. Yokoyama K., Yamanouchi K., Ohyanagi H. Fate of perfluorochemicals in animals after intravenous injection or hemodilution with their emulsions. // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1978. Vol. 26, № 3. P. 956–966.
121. Riess J., Cornelus C., Krafft M. et al. Fluorocarbon emulsion stabilisation and particle size control usiding mixed fluorocarbon. // Физиологическая активность фторсодержащих соединений: Сб. Пущино. 1995. С. 67-73.
122. Riess J., Flaim S., Rlein D., Weers J. The relative physiocochemical and biological attributes of perflubrom emulsion. // Физиологическая активность фторсодержащих соединений: Сб. Пущино. 1995. С. 73-90.
123. Ren X.P., Orlova E.V., Maevsky E.I., Bonicalzi V., Canavero S., Brain protection during cephalosomatic anastomosis // SURGERY. 2016. Vol. 160. Iss.1. P. 5-10.