

На правах рукописи

Вотрин Сергей Владимирович

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРФТОРУГЛЕРОДНОЙ КРОВЕЗАМЕЩАЮЩЕЙ
ЭМУЛЬСИИ ПРИ АНЕМИИ У ЖИВОТНЫХ,
ВЫЗВАННОЙ ОСТРЫМ ВНУТРИСОСУДИСТЫМ
ГЕМОЛИЗОМ

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пущино – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Воробьев Сергей Иванович

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Болевич Сергей Бранкович

Оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Козлов Сергей Анатольевич
*(профессор кафедры частной зоотехнии
МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина)*

кандидат биологических наук
Склифас Алла Николаевна
*(в.н.с. лаборатории культуры клеток
и клеточной инженерии ИБК РАН)*

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «**Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова**»

Защита состоится «___» _____ 2021 г. в ___ часов ___ минут на заседании совета Д 002.093.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <http://iteb.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физ.-мат. наук

Ланина Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы 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 [Bermejo F., Garcia-Lopez S., 2009].

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 %, другое – 17 % [Bermejo F., Garcia-Lopez S., 2009; Шиффман Ф.Д., 2017].

При анемии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, помимо лечения основного заболевания, вызвавшего аутоиммунный процесс, для снятия жизненно угрожающей гипоксии применяют донорские эритроциты [Рагимов А.А., 2015]. 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 [Алексеев Н.А., 2004].

Следует отметить, что в большинстве работ по лечению аутоиммунной гемолитической анемии коррекции гипоксии при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе, вызывающем аутоиммунную анемию, не уделяется должного внимания гемокорректору [Алексеев Н.А., 2004, Рукавицын О.А, 2016, Ниманд Х.Г., Сутер П.Ф. 2004].

В настоящее время в биомедицинской практике, по мимо донорской эритроцитарной массы, применяют препараты гемокорректоры на основе газотранспортных эмульсий перфторуглеродов, в том числе для коррекции гипоксии при тяжелой анемии [Bialas C. et.al., 2019; Graham C. et. al., 2019; Spiess V. et. al., 2019].

Вместе с тем актуальные вопросы по коррекции гипоксии при тяжелой аутоиммунной анемии, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, до настоящего времени не были подробно изучены.

Степень разработанности темы исследования

Всестороннему изучению вопросов по применению 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, в основном, были направлены на коррекцию гипоксии при острой кровопотере и ишемии органов и тканей.

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.

Цель и задачи планируемого исследования

Основная цель исследования – коррекция гипоксии, вызванной острой кровопотерей и острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом у животных с помощью перфторуглеродной эмульсии «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

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 – препарата «Перфторан» в качестве гемокорректора при инвазионной трансмиссивной болезни животных – бабезиозе, осложненной 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 источника. Работа иллюстрирована 17 таблицами, 32 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснованы актуальность темы, цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1. В литературном обзоре представлены особенности патогенеза постгеморрагической анемии и аутоиммунной гемолитической анемии, возникшей в результате острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза. Описаны способы коррекции гипоксии при данных патологических состояниях при помощи трансфузии эритроцитарной массы (Эр. массы) и перфторуглеродных эмульсий - препарата «Перфторан».

Глава 2. Материалы и методы исследования. В двух блоках исследований использовались животные (собаки и кошки), общее количество составило 113 особей.

В первом блоке исследований при острой постгеморрагической анемии были отобраны 42 кошки обоих полов.

Животные были рандомизированы по способу лечения на 3 группы:

1-я контрольная группа (n = 10), традиционная терапия – препарат Стабизол в дозе 20 мл/кг веса один раз в день на 1, 2, 3, 5, 7 день исследований. Проводились измерения: гематокрит, лактат, билирубин, калий, SpO₂.

2-я основная группа (n = 10), терапия: препарат Стабизол в дозе 10 мл/кг веса и препарат Перфторан 10 мл/кг веса в 1, 2, 3, 5, 7 день после получения травмы;

3-я основная группа (n = 10), где помимо традиционной терапии – препарат Стабизол в дозе 20 мл/кг веса, на 2 день провели трансфузию донорской Эр. массы в дозе 10 мл/кг веса, однократно.

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 при острым аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе использовали 71 собаку обоих полов.

В данном исследовании животные были рандомизированы на 3 группы:

1-я контрольная группа (n = 10), базовая терапия – Преднизолон в дозе 4 мг на кг, в/в NaCl 0,9 % – 10 мл/кг. Введение осуществляли один раз в день на протяжении 5 дней. Антипротозойную терапию для уничтожения бабезий осуществили однократным подкожным введением препарата Пиро-Стоп;

2-я основная группа (n = 10), где помимо базовой терапии, проводилась коррекция гипоксии при АИ-анемии, в 1-й день использовалась однократно Эр. масса;

3-я основная группа (n = 10), к базовой терапии добавили введение препарата Перфторан в дозе 10 мл/кг для уменьшения гипоксии и осуществили введение один раз в день на протяжении 5 дней.

У исследуемых собак один раз в день, на протяжении 5 дней проводился мониторинг следующих показателей: гематокрит, лактат, билирубин, калий, SpO₂.

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.

Степень достоверности результатов диссертационного исследования обусловлена применением современных научных методов исследования. 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.

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

Исследования направлены на устранение гипоксии, вызванной тяжелой анемией в результате острой кровопотери и постгеморрагической анемии у животных с использованием препарата «Перфторан» в сравнении с донорской эритроцитарной массой.

Глава 4. Исследования острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза у животных (собака).

Исследования направлены на устранение гипоксии, вызванной тяжелой анемией в результате острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза у животных с использованием препарата «Перфторан» в сравнении с донорской эритроцитарной массой.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Первый блок исследований

Исследования направлены на устранение гипоксии при тяжелой анемии в результате острой кровопотери и постгеморрагической анемии у животных с помощью препарата «Перфторан» в сравнении с эритроцитарной массой. В качестве иммунносложного реципиента рассматривали кошку, т.к. использование донорских эритроцитов у данного вида животных иммунноограничено и может предоставлять серьезную опасность для данного реципиента.

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 наступление гидремической стадии ПГА, при которой гематокрит сильно снижается (рис. 1).

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

В третьей группе после трансфузии донорских эритроцитов наблюдалась более активная динамика по восстановлению красных клеток крови.

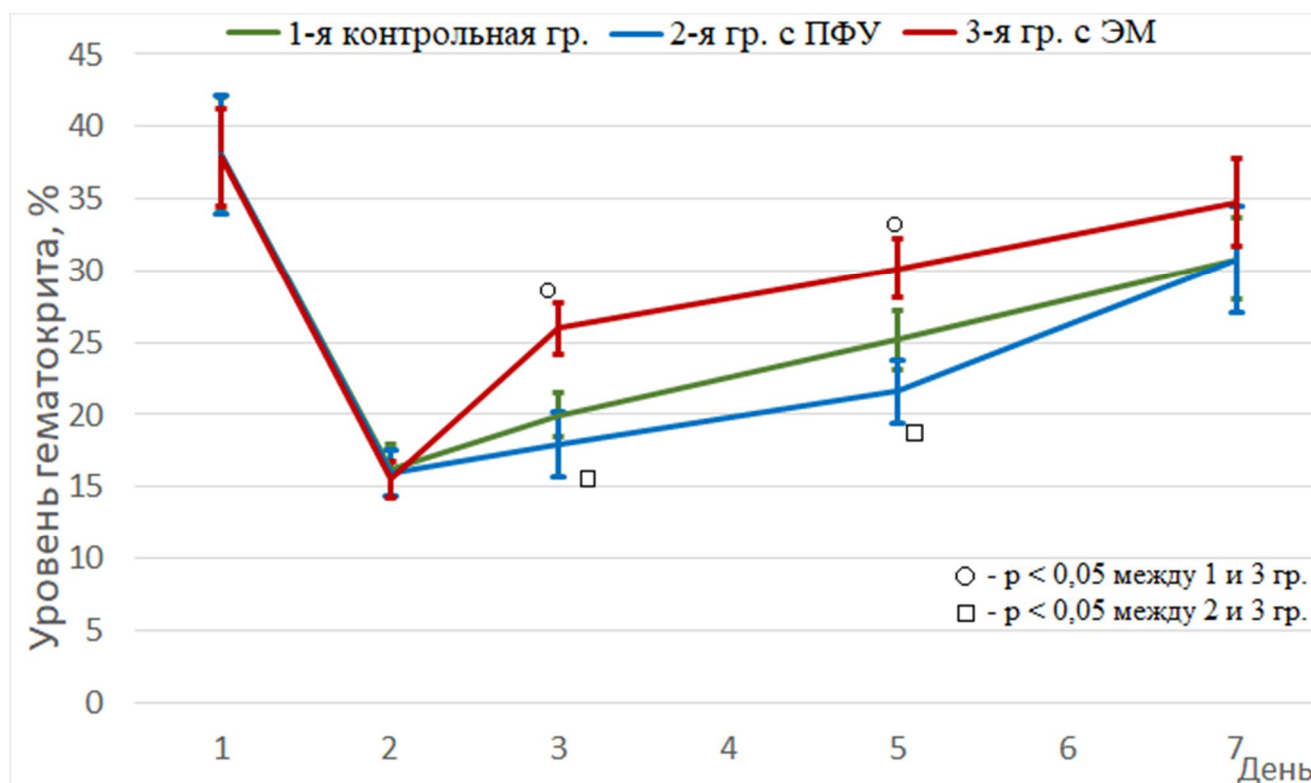


Рисунок 1. Динамика изменения гематокрита в 1 гр. контроль, 2 гр. с ПФУ (Перфторан) и 3 гр. с ЭМ при постгеморрагической анемии (в группах $n = 10$)

Лактат. Необходимо отметить, что во второй основной группе животных, 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 (рис. 2).

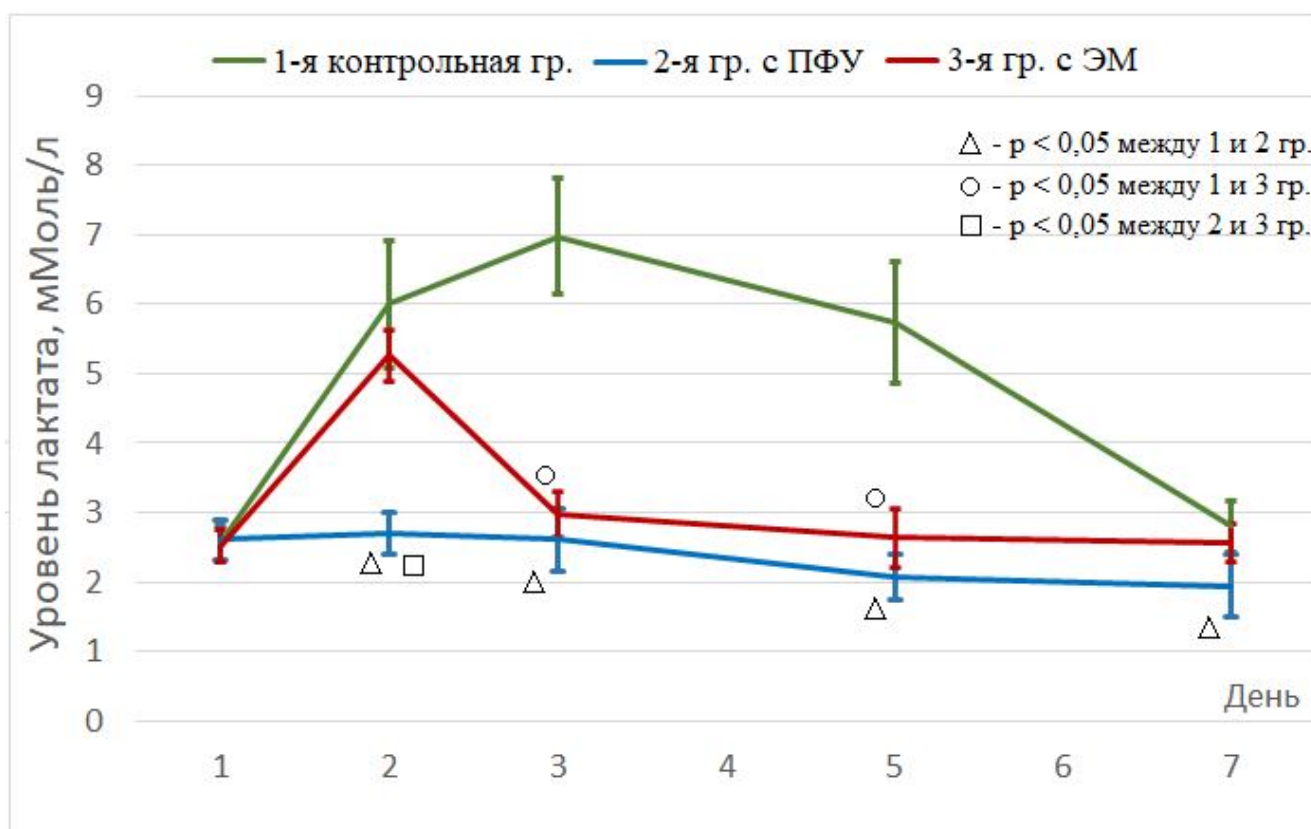


Рисунок 2. Динамика изменения лактата в 1 гр. контроль, 2 гр. с ПФУ (Перфторан) и 3 гр. с ЭМ при постгеморрагической анемии (в группах $n = 10$)

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 были ниже референсных границ.

В результате изменений SpO_2 у животных в трех группах мы видим возрастающие значения на протяжении 7 дней лечения, при этом в результате заместительной терапии при гипоксии у животных второй группы с Перфтораном и третьей группы с трансфузией донорской ЭМ значения SpO_2 достоверно возрастают, по сравнению с группой контроля, где гипоксия не корректировалась (рис. 3).

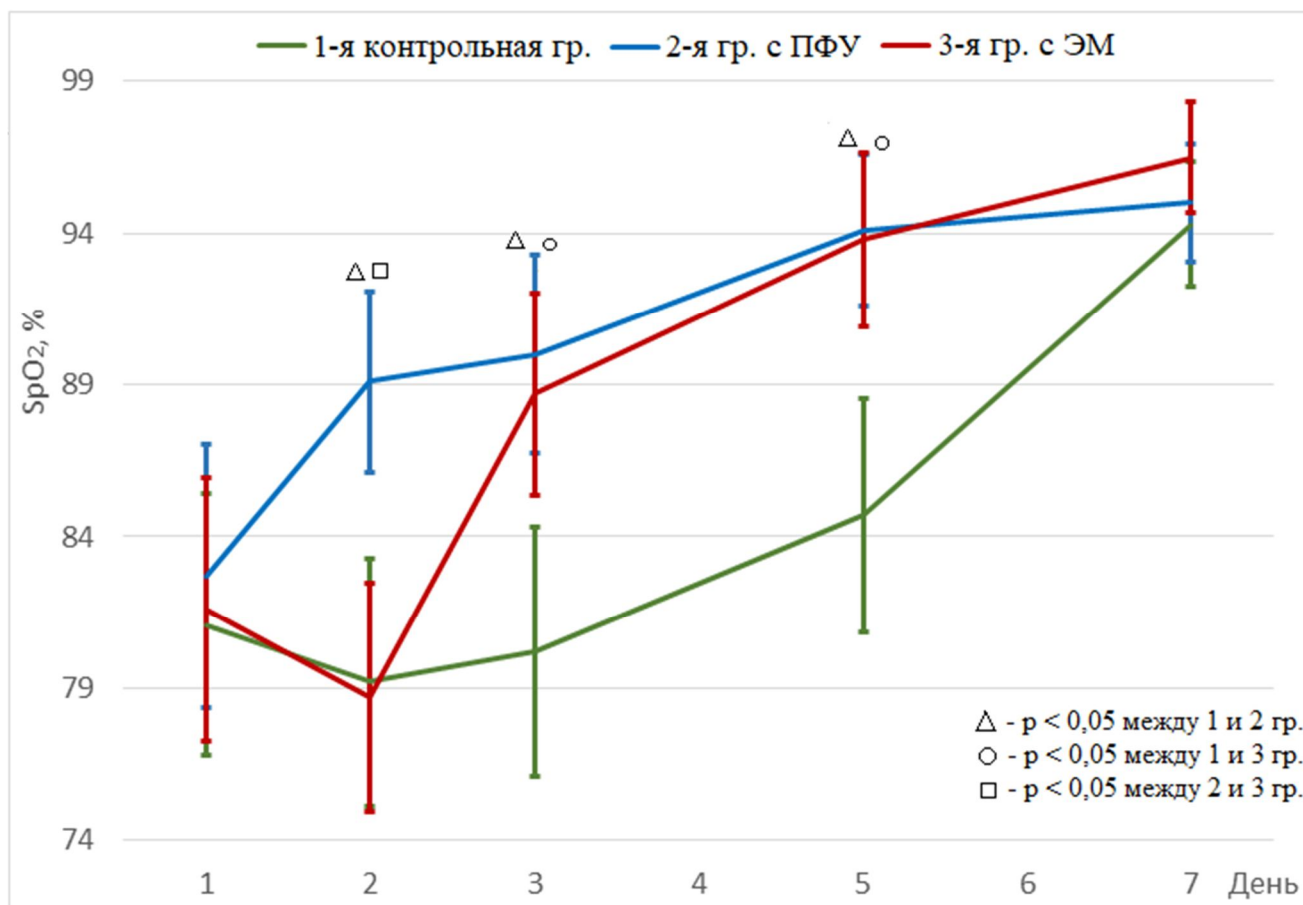


Рисунок 3. Динамика изменения SpO_2 в 1 гр. контроль, 2 гр. с ПФУ (Перфторан) и 3 гр. с ЭМ при постгеморрагической анемии (в группах $n = 10$)

При мониторинге калия и билирубина у исследуемых животных на протяжении всего срока исследования достоверных отличий для животных в трех группах не выявлено.

Летальность. Данные летальности показывают (табл. 1), что коррекция гипоксии при острой, тяжелой постгеморрагической анемии необходима и должна быть проведена незамедлительно. Так, исследования показали:

- в первой контрольной группе без коррекции гипоксии наиболее высокая летальность – 44,4 %;
- во второй основной группе с использованием препарата Перфторан наблюдалась самая низкая летальность – около 9,9 %;
- в третьей основной группе с применением ЭМ летальность наблюдалась в 2 раза выше, чем во 2 гр. с Перфтораном – 23,1 %.

Таблица 1. Летальность животных (кошка), вызванная острой кровопотерей и постгеморрагической анемией при коррекции с помощью препарата Перфторан и донорской эритроцитарной массой в течение всего периода наблюдений

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%)

По первому блоку исследований выявлено, что коррекция гипоксии у иммуносложных животных с постгеморрагической анемией, получавших в составе комплексной терапии препарат «Перфторан», высоко эффективна: несмотря на низкий уровень гематокрита животные не испытывали тканевой гипоксии, что отразилось в низкой степени летальности – 9,9 % по сравнению с донорской эритроцитарной массой, при которой летальность составляла 23,1 % и плазмозаменителем – препаратом Стабизол, где летальность составляла 44,4 %.

Глава 4. Исследования острого аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза у животных (собака)

Второй блок исследований

В данном исследовании по коррекции гипоксии у собак при анемии в результате инвазионной трансмиссивной болезни животных - бабезиозе, осложненном острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, проводилась с использованием препарата «Перфторан» в сравнении с донорской эритроцитарной массой.

В результате бабезиоза происходит поражение эритроцитов собак простейшими с последующим разрушением красных клеток крови и выделением кровепаразитами растворимого паразитарного антигена, в результате чего

возникает острый внутрисосудистый аутоиммунный гемолиз с последующим развитием аутоиммунной гемолитической анемии.

Гематокрит. Как показали исследования, у собак при гипоксии в результате бабезиоза, осложненного острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, на протяжении пяти дней лечения гематокрит (Ht) у всех трех групп возрастал, так как при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе развивается регенераторная анемия и на фоне иммуносупрессивной терапии Преднизолоном уменьшается иммунная агрессия на эритроциты больного животного. Но при тяжелой аутоиммунной гемолитической анемии с Ht меньше 15 % жизненно важные органы страдают от тяжелой гипоксии. Данные наблюдений показывают, что без заместительной терапии (при тяжелой гипоксии в результате аутоиммунного гемолиза) эволюционные механизмы регенерации не успевают восстановить минимально необходимый для выживания животного уровень эритроцитов (рис. 4).

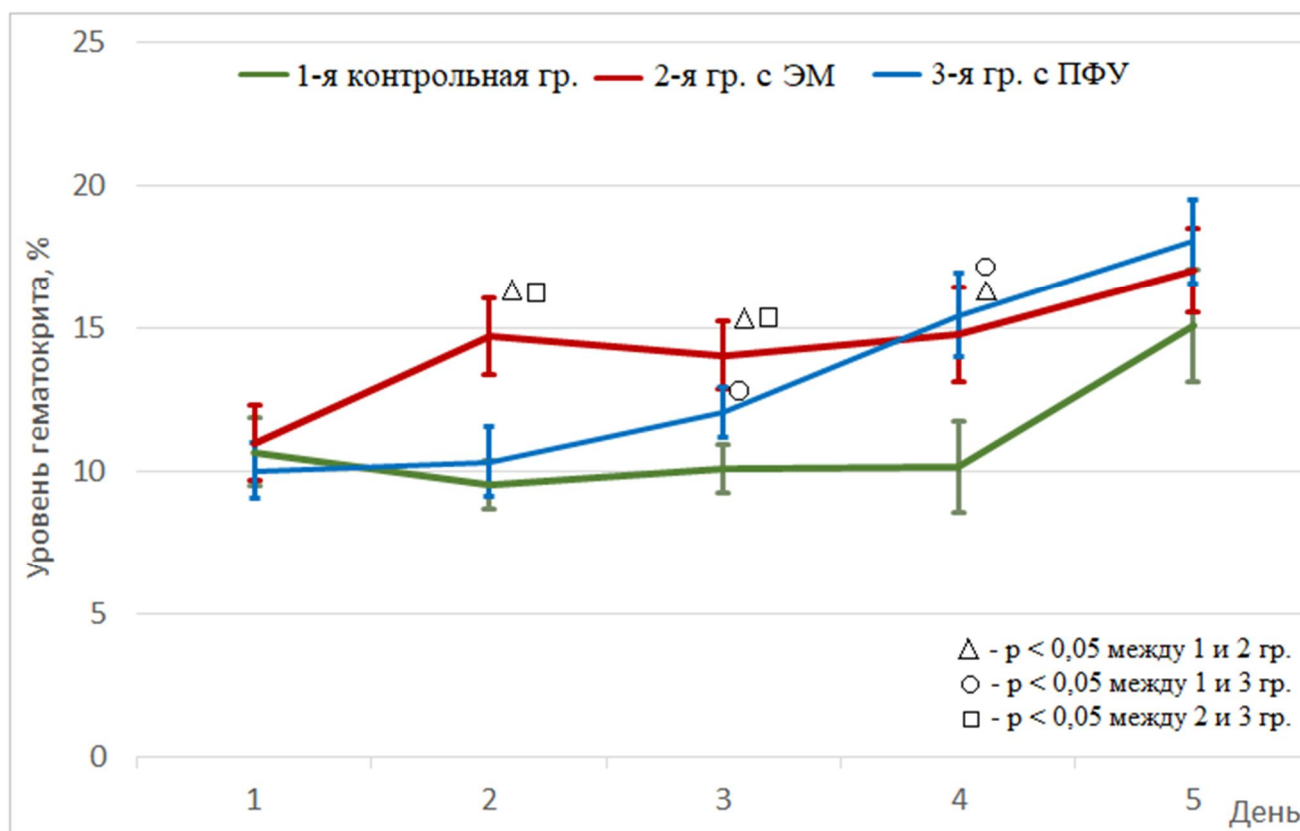


Рисунок 4. Динамика изменения гематокрита в 1 гр. контроль, 2 гр. с ЭМ и 3 гр. с ПФУ (Перфторан) животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом (в группах n = 10)

Билирубин. Значение билирубина у животных в трех группах в первый день исследований было существенно выше референсных границ, и достоверных отличий между группами не было.

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, так как донорские Эр, введенные животным на второй день лечения, существенно усиливали АИ-гемолиз у реципиента, в результате чего образовывалось большое количество билирубина (рис. 5).

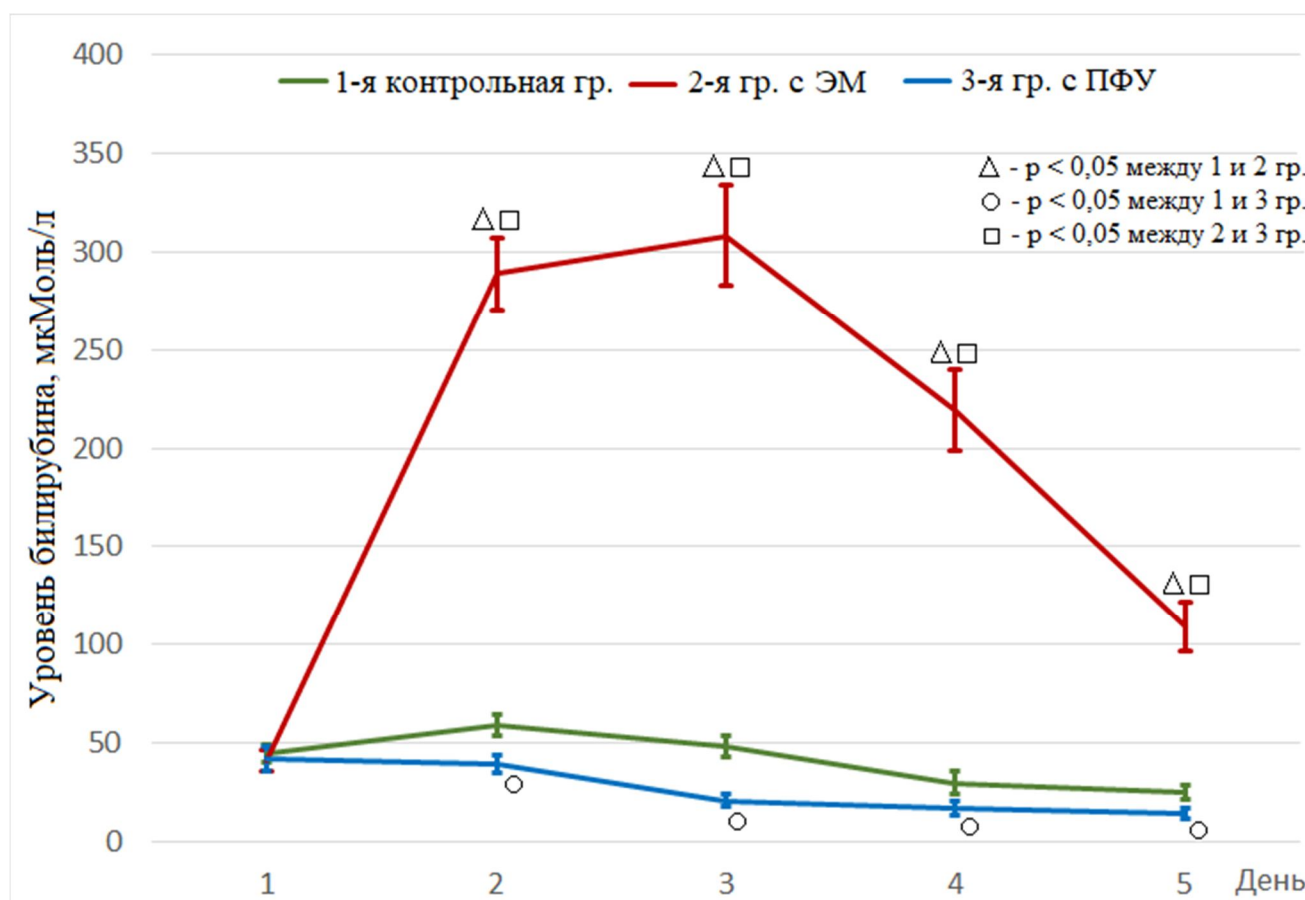


Рисунок 5. Динамика изменения билирубина в 1 гр. контроль, 2 гр. с ЭМ и 3 гр. с ПФУ (Перфторан) животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом (в группах n = 10)

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 аутоиммунной гемолитической анемии без коррекции гипоксии (рис. 6).

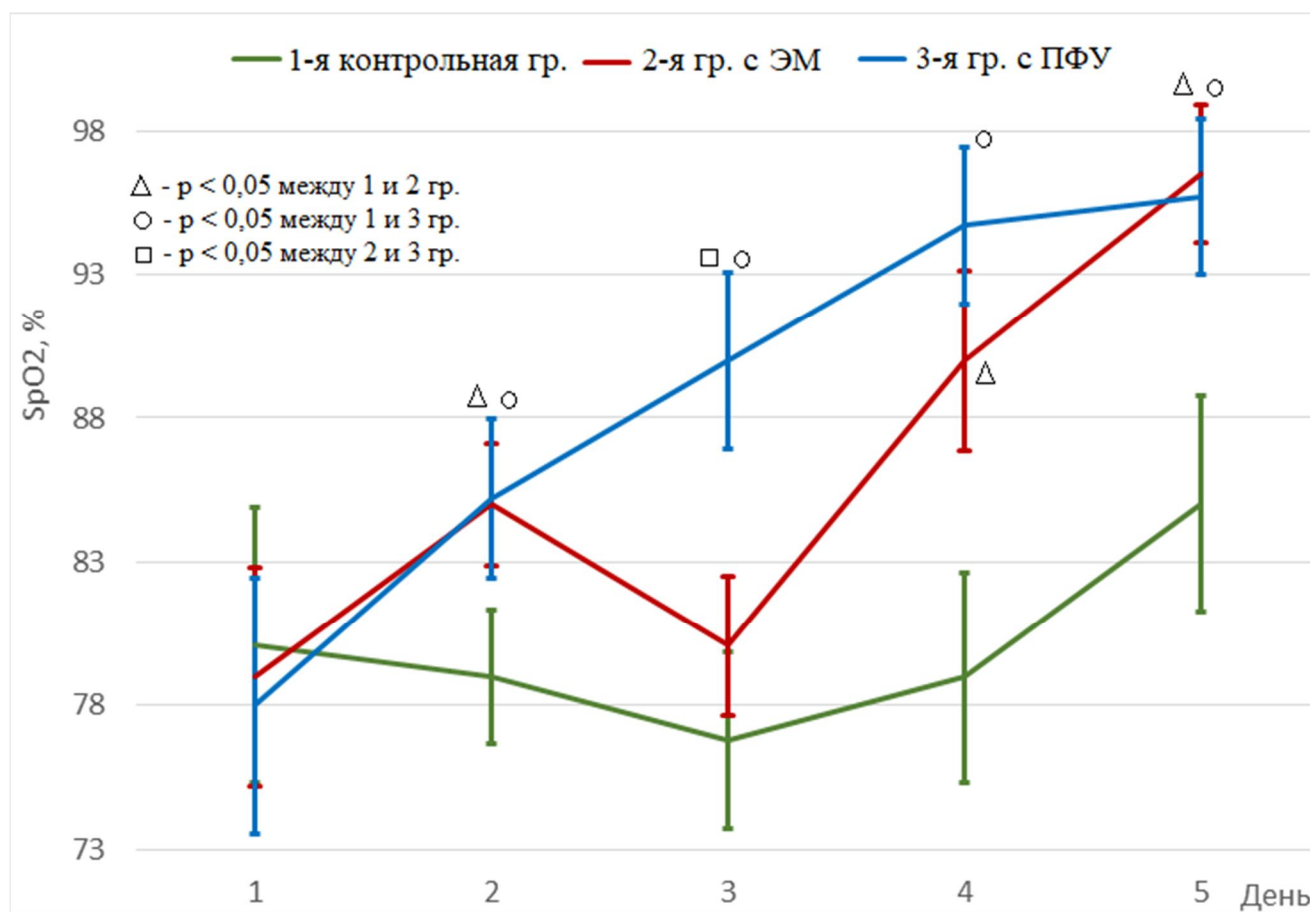


Рисунок 6. Динамика изменения сатурации в 1 гр. контроль, 2 гр. с ЭМ и 3 гр. с ПФУ (Перфторан) животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом (в группах n = 10)

Лактат. 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.

Животные в первой контрольной группе на всем протяжении исследования имели критично высокое значение лактата, что доказывает повышенную летальность при отсутствии заместительной терапии при гипоксии в результате аутоиммунной гемолитической анемии. 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, которым в качестве заместительной терапии использовали донорские эритроциты (рис. 7).

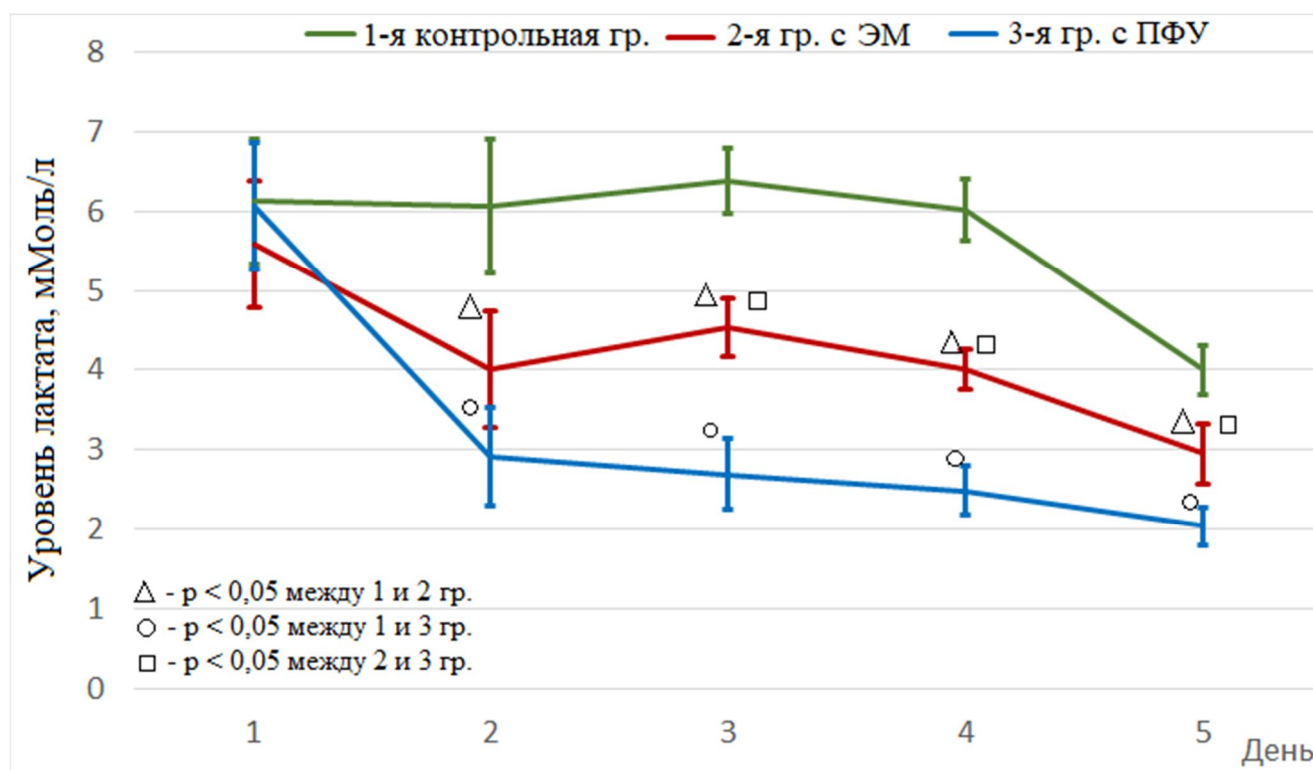


Рисунок 7. Динамика изменения лактата в 1 гр. контроль, 2 гр. с ЭМ и 3 гр. с ПФУ (Перфторан) животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом (в группах $n = 10$)

Калий является внутриклеточным микроэлементом и при разрушении клеток активно переходит в плазму крови. У собак при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе 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.

На протяжении пяти дней лечения видим, 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 аутоиммунного внутрисосудистого гемолиза в результате трансфузии донорской эритроцитарной массы (рис. 8).

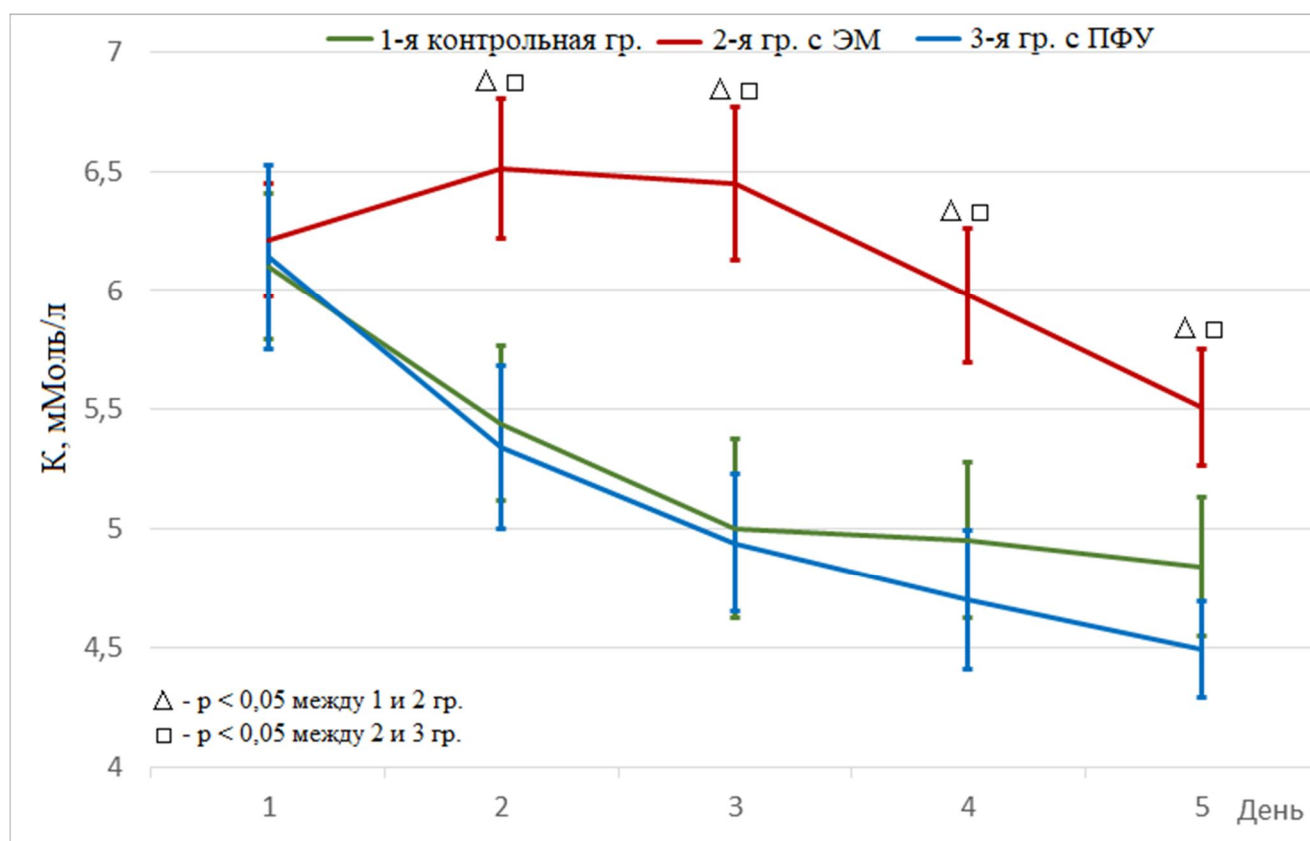


Рисунок 8. Динамика изменения калия в 1 гр. контроль, 2 гр. с ЭМ и 3 гр. с ПФУ (Перфторан) животных с аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом (в группах $n = 10$)

Летальность. 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 имеет гипербилирубинемия, гиперкалиемия и ацидоз.

Таблица 2. Летальность животных (собака), вызванной аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом при коррекции гипоксии с помощью препарата «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы в течение 9 дней наблюдений

Группы включения и не включения	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 %)

Так, исследования показали:

- в 1-й контрольной группе без коррекции гипоксии наблюдается высокая летальность в результате нарастающей гипоксии до 56 %;
- во 2-й группе, основной, где животным при коррекции гипоксии использовали ЭМ, наблюдалась самая высокая летальность до 60 %, это обусловлено возрастающим уровнем билирубина;
- в 3-й группе, основной, где при коррекции гипоксии использовался препарат 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.

По второму блоку исследований выявлено, что гипербилирубинемия в совокупности с гипоксией являются основным звеном патогенеза при анемии, вызванной аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, в отличие от анемии при кровопотере, где гипоксия не осложняется гипербилирубинемией. Коррекция

гипоксии у животных с анемией, вызванной острым аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, получивших в составе комплексной терапии препарат Перфторан, несмотря на низкий уровень гематокрита, не испытывали гипоксии и роста билирубина, что отразилось в низком уровне летальности до 13% по сравнению с донорской эритроцитарной массой, при использовании которой наблюдался рост билирубина в результате активизации аутоиммунного гемолиза, что отразилось в высоком уровне летальности – 60%. Летальность в контрольной группе без коррекции гипоксии составляла 56%.

Сравнительный анализ летальности между двумя блоками исследований

Сравнительный анализ летальности животных между двумя блоками исследований показал (рис. 9), что при коррекции гипоксии препаратом Перфторан, при любом виде анемии, наблюдается самая низкая летальность (9,9-13%). При коррекции гипоксии, вызванной аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом, при помощи ЭМ, летальность резко возрастает (до 60%) по сравнению с животными, где использовалась ЭМ при постгеморрагической анемии (летальность – 23%).

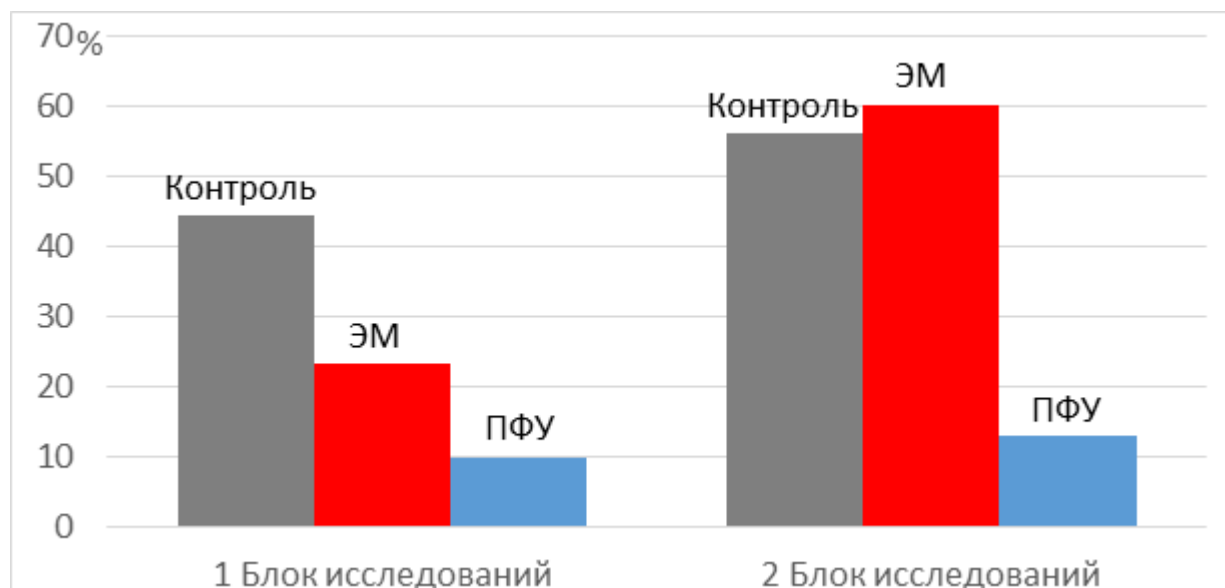


Рисунок 9. Летальности животных между двумя блоками исследований при коррекции гипоксии, вызванной постгеморрагической анемией (1 Блок исследований) и аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом (2 Блок исследований)

Однако, сравнительный анализ позволяет предположить, что коррекция гипоксии при острой кровопотере с помощью газотранспортных препаратов: перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» и донорской эритроцитарной массы в первом блоке исследований более эффективна, по сравнению с традиционным лечением гипоксии препаратами без газотранспортной функции, при которых летальность достигала 44,4%. Известно, что одной из главных патофизиологических задач в клинической практике является устранение гипоксии и доставка кислорода органам и тканям. При тяжелых анемиях, когда гематокрит падает до 12%, возникает острый дефицит кислорода в тканях. В этом случае, как указывает А.А. Рагимов (2015), пациенту необходимо незамедлительно провести заместительную терапию донорскими эритроцитами. Возмещение кровопотери с помощью традиционных плазмозаменителей без газотранспортной функции не позволяет купировать гипоксию. Традиционно возмещение кровопотери осуществляется донорской ЭМ. Но, как экспериментально показано, донорская ЭМ не дает стойкого терапевтического эффекта при купировании гипоксии, вызванной аутоиммунным внутрисосудистым гемолизом. На сегодняшний день разработаны и успешно применяются в медико-биологической области искусственные гемокорректоры – газотранспортные перфторуглеродные препараты типа «Перфторан» и другие перфторуглеродные эмульсии. Перфторуглеродные препараты улучшают динамику газообмена и снижают вязкость, что приводит к улучшению скорости кровотока и реологии крови, увеличивают кислородную емкость плазмы крови на 1/3 с помощью физически связанного кислорода, увеличивают кислородное снабжение за счет большего количества «искусственных эритроцитов» - перфторуглеродных частиц наноразмерного уровня до $\sim 10^{16}$ /л, по сравнению с донорской кровью $\sim 10^{12}$ /л, увеличивают массоперенос O_2 за счет ускоренной диффузии и большей скорости насыщения O_2 в перфторуглеродах, увеличивают массоперенос O_2 за счет большей поверхности газообмена у субмикронных частиц эмульсии перфторуглеродов.

Все вышеперечисленные факторы способствуют более эффективной коррекции гипоксии, как при купировании кровопотери, так и при анемии в результате внутрисосудистого аутоиммунного гемолиза с помощью перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» по сравнению с традиционной применяемой донорской эритроцитарной массой.

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 иммунносложных реципиентов значительно выше, в несколько раз.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Воробьев С.И., Вотрин С.В., Болевич С.Б., Кутышенко В.П., Новиков А.А., Колотилова М.Л., Орлова А.А. Биологические и физико-химические действия синтетической эмульсии перфторуглеродного заменителя крови. // Нетрадиционные природные ресурсы. Инновационные технологии и продукты. 2016. № 24. С. 220-229.
2. Воробьев С.И., Вотрин С.В., Болевич С.Б., Кутышенко В.П., Новиков А.А., Колотилова М.Л., Орлова А.А. Перфторуглеродные кровезаменители - термодинамически неустойчивые лиофобные коллоидные системы. // Нетрадиционные природные ресурсы. Инновационные технологии и продукты. 2016. № 24. С. 59-68.
3. Вотрин С.В., Воробьев С.И. Применение перфторуглеродного кровезаменителя при лечении острой постгеморрагической анемии у кошек. // Российский ветеринарный журнал. 2017. № 8. С. 16–21.
4. Воробьев С.И., Вотрин С.В., Кутышенко В.П., Болевич С.Б., Орлова А.А. Современный анализ перфузионных составов для консервации и трансплантации

изолированных лёгких. // Нетрадиционные природные ресурсы. Инновационные технологии и продукты. 2017. № 25. С. 274 – 284.

5. Воробьев С.И., Вотрин С.В. Применение перфторуглеродного кровезаменителя Перфторан при лечении острой постгеморрагической анемии у животных. // Нетрадиционные природные ресурсы. Инновационные технологии и продукты. 2017. № 25. С. 261-173.

6. Вотрин С.И., Болевич С.Б., Воробьев С.И., Орлова А.С., Болевич С.С., Тачиева Б.И., Корсаков Д.Ю. Устранение гипоксии при остром аутоиммунном внутрисосудистом гемолизе эритроцитов с помощью перфторуглеродной кровезамещающей эмульсии в эксперименте. // Сеченовский вестник. 2018. № 2. С. 5-13.

7. Sizova Z.M., Zakharova V.L., Alibeyli K.A., Shikh E.V., Bolevich S.B., Bolevich S.S., Vorobyev S.I., Votrin S.V., Padalko V.V., Medvedev O.S., Novikov A.A., Omarov I.A. Ubiquinone plasma levels are correlated with brain natriuretic peptide plasma levels in patients with chronic heart failure: the potential of coenzyme Q10 combined therapy. // Serbian Journal of Experimental and Clinical Research. 2018. V. 19, No. 2. P. 141–149.

8. Votrin S.V., Vorobyev S.I., Bolevich S.B. [et al.] Use of perfluorocarbon based blood substitute Perftoran in correction of hypoxia during acute anemia in animals. // Serbian Journal of Experimental and Clinical Research. 2019. V. 20, No. 3. P. 245–250.

9. Vorobyev S.I., Kutyshenko V.P., Bolevich S.B., Votrin S.V. et al. Gas transport characteristics of hemocorrectors and perfusates based on perfluorocarbon blood-substituting emulsion // Serbian Journal of Experimental and Clinical Research. 2020. V. 21, No. 2. P. 147-155.

10. Votrin S.V., Vorobyev S.I., Bolevich S.B., Orlova A.A., Gudanovich D.D. Efficiency of the use of perfluorocarbon gas transport drugs for various forms of anemia in animals. // Revista de la Universidad del Zulia. 2021. V. 12, No. 32. P. 24-34.