

На правах рукописи

**Голубкина Екатерина Валерьевна**

**ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ  
ВОЗДЕЙСТВИИ СЕРОВОДОРОДСОДЕРЖАЩЕГО ГАЗА  
И ПРИНЦИПЫ ИХ КОРРЕКЦИИ**

(Экспериментальное исследование)

**03.03.01 – физиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата медицинских наук**

**Саратов – 2017**

Диссертационная работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель Тризно Николай Николаевич** — доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

**Кузник Борис Ильич** — доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России

**Антропова Ирина Петровна** — доктор биологических наук; старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Барнаул

Защита состоится « » \_\_\_\_\_ 2017 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.094.03 при ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России (410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112)

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России (410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112) и на сайте: <http://science/sgmu.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета**  
доктор медицинских наук, профессор

**А. И. Кодочигова**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Исследование механизмов нарушения баланса между компонентами свёртывающей и противосвёртывающей систем, а также — сосудистой стенкой, необходимо для осуществления комплексных мер по профилактике как тромбообразования, так и кровоточивости (Кузник Б. И., 2015; Шахматов И. А. с соавт., 2016; Пантелеев М. А. с соавт., 2017).

Специфика современного этапа развития социума состоит в интенсификации антропогенной деятельности, ведущей, в большинстве своем, к экологическому дисбалансу окружающей среды, отражаясь на состоянии физиологических систем (Агаджанян А. Н. с соавт., 2000; Бойко О. В. с соавт., 2016). Приоритетным научным направлением в настоящее время является изучение совокупности процессов, формирующих гомеостаз организма в неблагоприятных условиях внешней среды (Захарова Н.О., 2014). В связи с этим особую актуальность приобретает уточнение сдвигов эндотелиально-тромбоцитарных взаимодействий с факторами плазменного звена на протяжении длительного экзогенного воздействия техногенных факторов (Рязанова Е. А., 2011; Вахов Е. В. с соавт., 2012; Lewis R. J. et al., 2015; Petersen L. C., 2016).

Достаточно неоднозначны имеющиеся сведения о действии экзогенного  $H_2S$  (доноры  $HS$ -ионов) и эндогенного происхождения на систему гемостаза. Широкий диапазон доз, применяемый в лабораториях, определяет как уменьшение (Lu Xiaohua et al., 2015), так и увеличение коагуляционного потенциала (Петрова И. В. с соавт., 2015; Заичко Н. В. с соавт., 2016; D'Emmanuele di Villa Bianca R. et al., 2010, 2013). Разнонаправленные эффекты воздействия  $H_2S$  получены и в отношении сосудодвигательной функции: вазоконстрикторный (Ali M. Y. et al., 2006; Webb G. D., et al., 2008) и вазорелаксационный, NO-опосредованный, (Murphy M. E., Brayden J. E., 1995).

Таким образом, исследования воздействия сероводорода на систему гемостаза и сосудистую стенку недостаточны и противоречивы. Отсутствуют и

требуют изучения данные о механизме реагирования компонентов гемостазиологического профиля *in vivo* при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа (ССГ), что в совокупности с необходимостью уменьшения риска тромботических осложнений впоследствии и определило необходимость проведения данного исследования.

**Цель исследования.** Оценить характер изменений параметров системы гемостаза в условиях длительной ингаляции сероводородсодержащего газа Астраханского месторождения и определить возможные пути коррекции формирующихся изменений.

**Задачи исследования.**

1. Изучить закономерности изменения функционального состояния системы свёртывания крови на протяжении 4-месячного периода воздействия промышленного сероводородсодержащего газа Астраханского месторождения.
2. Определить изменения реакций системы гемостаза через один месяц хронического воздействия сероводородсодержащего газа.
3. Установить изменения в параметрах системы гемостаза через два месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа.
4. Исследовать нарушения показателей гемостазиологического профиля через три месяца хронической ингаляции сероводородсодержащего газа.
5. Охарактеризовать изменения в функционировании компонентов системы гемостаза через четыре месяца воздействия сероводородсодержащего газа.
6. Установить наиболее значимые корреляционные взаимосвязи параметров системы гемостаза, фибринолиза и состояния эндотелия на протяжении хронического воздействия сероводородсодержащего газа.
7. Исследовать возможные пути коррекции выявленных изменений в системе гемостаза при длительной ингаляции сероводородсодержащего поллютанта.

**Научная новизна исследования.** Впервые исследовано состояние системы гемостаза крыс при хроническом воздействии ССГ. Проведен сравнительный анализ изменений гемостазиологического профиля и сосудистого эндотелия по 15 показателям в различные по продолжительности периоды. Установлена

периодичность реакции системы гемостаза гипокоагуляционной направленности в первые два месяца действия ССГ и формирования признаков предтромботической готовности к концу наблюдения. Выдвинуто последовательное представление тромбинной и тромбоцитарной направленности реакций гемостатической системы в ответ на хроническое воздействие ССГ.

Впервые изучен уровень эндотелиально-тромбоцитарных взаимодействий с компонентами плазменного звена системы гемостаза и фибринолиза с помощью корреляционного анализа при хроническом воздействии ССГ.

Впервые исследована возможность коррекции возникших изменений путём воздействия на основные звенья системы гемостаза - тромбоцитарное и плазменное. Обосновано применение антиагреганта ацетилсалициловой кислоты (АСК) и антикоагулянта ДНК-аптамера ингибитора тромбина (31 ТВА), что может быть использовано для дальнейших этапов тестирования данного соединения с перспективой создания на его основе фармакологического препарата. Подтверждена рациональность одновременного применения двух средств для уменьшения гиперкоагуляционного потенциала после длительного воздействия ССГ.

Данная работа является продолжением гранта ГК № 16.740.11.0610 «Экспериментальная оценка биологических и возможных фармакологических свойств биологически устойчивых ДНК-аптамеров (ингибиторов) тромбина» (шифр «2011-1.3.1-141-005») от 31.05.2011 года по направлению «Фундаментальная медицина и физиология» Федеральной Целевой Программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные результаты исследования могут составлять основу для ранней диагностики коагулопатических расстройств, формирующих признаков повреждения систем гемостаза и фибринолиза. Полученные в ходе исследования данные могут служить обоснованием для расширения исследуемого диапазона параметров гемостазиологического профиля у лиц, находящихся в зонах

потенциального риска воздействия ССГ. Экспериментальные результаты работы могут составлять базисную платформу для дальнейшего исследования действия ДНК-аптамеров (ингибиторов тромбина) с последующим применением в практической медицине с профилактической и лечебной целью. Результаты работы могут быть использованы в учебном процессе для преподавания в соответствующих разделах нормальной физиологии, гематологии, патологической физиологии, фармакологии.

**Методология и методы.** Исследования были выполнены на 180 белых лабораторных крысах (ФГБУ «НИИ по изучению лепры», г. Астрахань) мужского пола, в возрасте 6 месяцев, средней массой  $240 \pm 23$  г. Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных (Страсбург, 1986), а также «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ и СР РФ № 708н от 23.08.2010 г.).

Хроническое воздействие ССГ моделировалось согласно гигиеническим нормам к требованию выполнения и воспроизведения эксперимента (Токсикометрия химических веществ, 1986; Онищенко Г. Г. с соавт., 2011). Концентрацию сероводорода  $80 \text{ мг/м}^3$  в используемых воздушно-газовых смесях определяли с помощью индикаторных трубок фирмы «Auer» - Berlin (West), Bestell. Экспериментальные исследования проводились в осенне-зимний период для исключения влияния сезонных ритмов (Хачатурьян М.Л. с соавт., 1995, 1999; Сидоров П. И., 2002).

Модель экспериментальной хронической интоксикации на животных создавали при помещении их в атмосферу  $\text{H}_2\text{S}$  в течение четырёх часов, пять дней в неделю. Животные были распределены на 4 опытные группы в зависимости от периода затравки: №1 — 1 месяц, №2 — 2 месяца, №3 — 3 месяца, №4 — 4 месяца. Для исследования корригирующих средств, были созданы следующие опытные группы по 15 крыс в каждой: №5, №6, №7 (таблица 1).

Таблица 1

Распределение животных и количество проведённых исследований при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа в концентрации 80 мг/м<sup>3</sup>

Группы животных	Определение параметров	Количество животных
Контроль (референтная группа)	Т, ИАТ, САТ, КВ, АЧТВ, ПВ, ТВ, ЭВ, ПС, D-димер, РФМК, ХШа-ЭЛ, ИАП-1, NO, ЦЭК	10
1 месяц затравки (опыт/контроль)	Т, ИАТ, КВ, АЧТВ, ПВ, ТВ, ЭВ, ПС, D-димер, РФМК, ХШа-ЭЛ, ИАП-1, NO, ЦЭК, САТ	15/17
2 месяца затравки (опыт/контроль)	Т, ИАТ, САТ, КВ, АЧТВ, ПВ, ТВ, ЭВ, ПС, D-димер, РФМК, ХШа-ЭЛ, ИАП-1, NO, ЦЭК	15/17
3 месяца затравки (опыт/контроль)	Т, ИАТ, САТ, КВ, АЧТВ, ПВ, ТВ, ЭВ, ПС, D-димер, РФМК, ХШа-ЭЛ, ИАП-1, NO, ЦЭК	15/16
4 месяца затравки (опыт/контроль)	Т, ИАТ, САТ, КВ, АЧТВ, ПВ, ТВ, ЭВ, ПС, D-димер, РФМК, ХШа-ЭЛ, ИАП-1, NO, ЦЭК	15/15
4 месяца затравки + АСК	Т, ИАТ, АЧТВ, ПВ, ТВ, ПС, D-димер, РФМК, ХШа-ЭЛ, ИАП-1, NO, ЦЭК	15
4 месяца затравки + аптамер	Т, ИАТ, АЧТВ, ПВ, ТВ, ПС, D-димер, РФМК, ХШа-ЭЛ, ИАП-1, NO, ЦЭК	15
4 месяца затравки + АСК + аптамер	Т, ИАТ, АЧТВ, ПВ, ТВ, ПС, D-димер, РФМК, ХШа-ЭЛ, ИАП-1, NO, ЦЭК	15
Всего исследований	1620	

Десять последних суток животным группы №5 вводили АСК. Введение осуществляли однократно с помощью зонда во взвеси 1% — ной крахмальной слизи, в дозе 4 мг/кг веса животного на протяжении 10 дней в 8 часов утра (Хабриев Р. У., 2005; Николаевский В. А., 2013; Кочетков С. Ю., 2015).

Животным группы №6 на тридцатые сутки вводили аптамер ингибитор тромбина (31 ТВА) п/к в дозе 0,1 мл (31-mer) 1 мМ с последующим забором крови по нижеизложенной методике на 30 минуте. В опытной группе №7 одновременно применяли АСК и аптамер (АСК + аптамер) по описанной выше схеме. По окончании срока затравки у животных под общим наркозом забирали кровь из нижней полой вены в объёме 4 — 5 мл в одноразовые инсулиновые шприцы содержащими в соотношении 5,5 — водный цитрат

натрия в концентрации 3,8% (0,11 M). После этого кровь помещали в центрифужные градуированные пробирки с крышками (Долгов В. В., Свирин П. В., 2005). Все манипуляции проводились с учетом международных стандартов по клинической лабораторной диагностике NCCLS: H21-A2 1991 [www.nccls.org].

Оценку тромбоцитарного звена гемостаза проводили с помощью микроскопического метода подсчета в счётной камере Горяева с применением 1% водного раствора оксалата аммония.

Спонтанная агрегация тромбоцитов (САТ) проводилась по методам Тарасова Н. И. (1982), Баркаган З. С. с соавт. (2008). Время индуцированной агрегации тромбоцитов (ИАТ) и степени агрегации на стекле с универсальным индуктором агрегации (УИА) (гемолизат эритроцитов), % ("Агрескрин — тест" фирмы "Технология — Стандарт", Россия).

Уровень NO-метаболитов в плазме крыс определяли с помощью спектрофотометра марки ПЭ 5400В (ООО «ПромЭкоЛаб», Россия) с применением реактива Грисса (водный раствор 0,05% N-нафтилэтилендиамин и 1% раствор сульфаниламид в 30% уксусной кислоте в равных объемах) и раствора хлорида ванадия (VCl<sub>3</sub>) (Метельская В. А., Гуманова Н. Г., 2005).

Определение степени циркулирующих эндотелиальных (десквамированных) клеток (ЦЭК) осуществляли по методике J. Hladovec (1978) (Петрищев Н. Н. с соавт., 2001).

Состояние коагуляционного звена системы гемостаза исследовали по АЧТВ (Caenetal et al.,1968) с использованием легкой фракции каолина и частичного тромбопластина (кефалина); для определения каолинового времени (КВ) использовали реактивы, протромбиновое время свертывания цитратной бедной тромбоцитами плазмы определяли по Quick (1935) с тромбопластином (Техпластин™ — тромбопластин-кальциевая смесь из фосфолипидов мозга человека), (ISI =1,1-1,2) ("Технология — Стандарт", Барнаул). ТВ определяли с использованием наборов «Тромбин — тест» тест-систем фирмы «Ренам НПО», (Россия). ЭВ — время свертывания с ядом змеи *Echis multisquamatus*.



Эхитоксовый тест по Цывкиной Л. П. с соавт., (1977) проводили с помощью набора «Эхитокс» ("Технология — Стандарт", Россия).

Активность естественных антикоагулянтов системы протеина С исследовали с помощью «Парус-теста» "Технология-Стандарт" (Россия).

ФХПа-зависимый эуглобиновый лизис определяли с помощью «Фибринолиз — теста», для разграничения нарушений в нарушении активности фактора XII, прекалликреина, ВМК и плазминогена была использована стрептокиназа в виде рабочего раствора в концентрации 330 МЕ/мл («Технология — стандарт», Барнаул). Активность ИАП-1 определяли с помощью диагностикума «Berichrom PAI» фирмы Dade Behring Inc., а также спектрофотометра ПЭ-5400 В (ООО «ПромЭкоЛаб», Россия), длина волны 405 нм. Маркёры тромбемии определяли по содержанию РФМК «РФМК–тест» «Технология — стандарт» (Россия) и D-димеру в плазме проводили с помощью D-Dimer-test (D-Dimer-СHEСК-1), иммунохроматографическим экспресс-тестом, фирмы BioMerieux.

Все цифровые данные, полученные в ходе исследования, подвергали статистической обработке с определением показателей: среднюю арифметическую (M), стандартное отклонение (s). Достоверность различий исследуемых выборочных данных определяли при помощи критерия Стьюдента (t). Проводили корреляционный анализ по Пирсону (R) (Гланц С., 1999). Результат расчета корреляционной связи между исследуемыми показателями представлен в виде r. Различия считали значимыми при уровне статистической значимости  $p < 0,05$  (Реброва О. Ю., 2000). При статистической обработке была использована OpenOffice Calc программного продукта OpenOffice (Ver. 3.0) и прикладная программа SPSS Statistics 21, функционирующая под управлением Windows 10. Графический анализ проводили в системе Microsoft Graf (приложение MS Word 97).

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Хроническое воздействие сероводородсодержащего газа в зависимости от продолжительности периода ингаляции вызывает стадийные изменения

параметров системы гемостаза гипокоагулянтной направленности на ранних сроках воздействия (в первые два месяца) и последующей гиперкоагуляционной напряжённости плазмы крови к концу 4-месячного затравочного периода.

2. Активация компонентов системы гемостаза начинается с компонентов плазменного звена в результате повреждения эндотелия. Тромбоцитарная направленность действия ССГ проявляется вторично (опосредовано тромбином).

3. Использование антиагреганта АСК и антикоагулянта ДНК-аптамера ингибитора тромбина способствуют коррекции, возникающих под действием сероводородсодержащего газа, изменений.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Материалы исследования доложены и обсуждены в ходе заседаний кафедры нормальной физиологии Астраханского государственного медицинского университета (2011 — 2017 гг.); II-й региональной конференции учёных и инноваторов «ИННО-КАСПИЙ» (Астрахань, 18 – 22 апреля 2011); на 9 международном научно-практическом конгрессе IMSCNS (9<sup>th</sup> INTERNATIONAL MEDICAL STUDENT'S CONGRESS IN NOVI SAD) (Сербия, г. Нови — Сад, 17 — 20 июля 2014); на Всероссийской заочной научно-практической конференции «Актуальные проблемы патофизиологии: теоретические и клинические аспекты» (Россия, г. Саратов, 2016); на I Межрегиональной научно-практической конференции «Фармакология разных стран» (Россия, г. Курск, 28 — 29 марта 2017).

**Личное участие автора.** Автором поставлены задачи, сформулированы все научные положения и определены выводы исследования. Вся экспериментальная часть работы и интерпретация результатов проведены автором самостоятельно.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 научных статей, 4 из которых изложены на страницах изданий, рекомендованных ВАК РФ.

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа построена по классическому принципу, включая введение, обзор литературы, описание

материалов и методов работы, собственные исследования, обсуждения результатов и выводов, список использованных литературных источников. Работа изложена на 132 страницах машинописного текста. Содержит 12 таблиц, 21 рисунок.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ**

**Изменения гематологических показателей на фоне хронического воздействия сероводородсодержащего газа.** В ходе оценки влияния ССГ на тромбоцитарное звено определилась тенденция к снижению количества тромбоцитов в периферическом кровяном русле крыс, уменьшившись на 19% ( $p < 0,05$ ) через 4 месяца затравочного периода. Функциональная активность пластинок крови в первые два месяца воздействия ССГ снижалась, что проявилось в замедлении времени ИАТ на 11% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Высокая липофильность газа (Салихов М. Н., 1990г; Тризно Н.Н., 1993, 2003; Резник Н. Л., 2009), обеспечивает беспрепятственное преодоление клеточных барьеров, не затрагивая процессы активации тромбоцитов до определённого времени (до 3 месяцев в нашем исследовании), что проявилось в замедлении САТ на 58,2% ( $p < 0,01$ ) во второй опытной группе по сравнению с контрольной.

Увеличение содержания NO — метаболитов во второй опытной группе на 82,1% ( $p < 0,001$ ) косвенно свидетельствует об активации эндотелия на ранних сроках (1 и 2 месяца) эксперимента.

Количество слущенных циркулирующих эндотелиоцитов в плазме крыс увеличивалось по мере продолжительности эксперимента и возросло на 48,7% ( $p < 0,05$ ) во второй опытной группе по сравнению с контрольной, что говорит о повреждении эндотелия.

Учитывая данные показатели, очевидно, что поврежденный эндотелий запускает процесс гемостаза. В то же время запускается механизм активации плазменных факторов коагуляционного каскада, о чём говорит удлинение во второй опытной группе КВ на 20,3% ( $p < 0,001$ ), АЧТВ — на 24,7% ( $p < 0,001$ ),

ПВ — на 22,7% ( $p < 0,01$ ), ТВ — на 11,9% ( $p < 0,01$ ), ЭВ — на 29,5% ( $p < 0,001$ ) (рисунок 1).

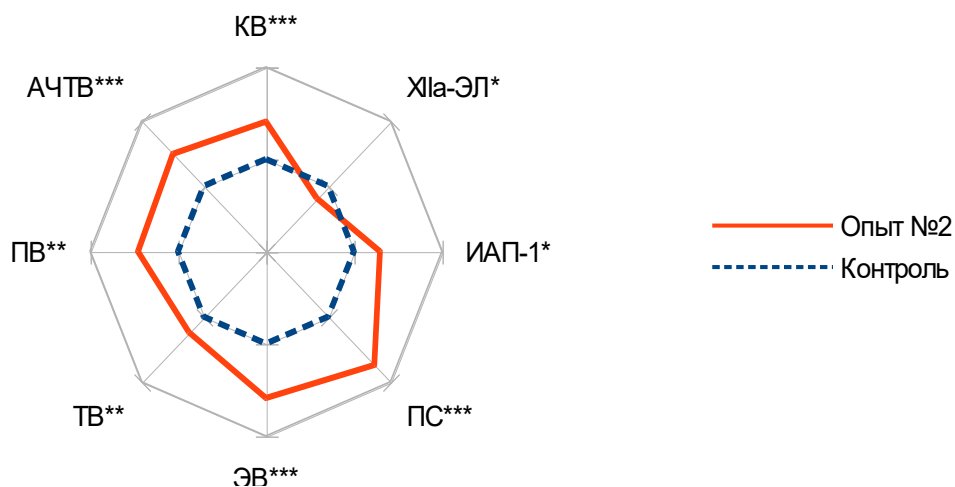


Рисунок 1. Состояние показателей коагулограммы крыс после 2 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду)

Примечание: данные, представленные на рисунке, выражены в % относительно группы контроля №1; Уровень статистической значимости между опытной и контрольной группой соответствует \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Высвобождение тканевого фактора поврежденным эндотелием запускает генерацию тромбина, недостаточную для активации фVIII, фIX, фXI, фXII в первые два месяца эксперимента, т.к. первые порции образующегося фIIa нивелируются тромбомодулином с последующей активацией антикоагулянта протеина С (Кузник Б. И., 2015; Patrono С., Vachmann, et. al., 2004). Это показали и наши исследования, когда активность компонентов системы протеина С сначала возросла на 35,7% ( $p < 0,05$ ) в первой опытной группе, а затем во второй группе — увеличилась на 37,1% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольной. В последующих опытных группах активность протеина С уменьшилась в 4-й опытной группе стала меньше контрольных величин на 11,4% ( $p < 0,05$ ), что объясняет рост образования тромбина, который уже в большей степени остаётся в плазме, а не связывается с тромбомодулином.

Система фибринолиза в первые два месяца действия ССГ активировалась. В нашем исследовании это видно на показателе фXIIa-зависимого эуглобинового

лизиса, который первоначально в первой опытной группе возрос на 14,5% ( $p < 0,01$ ), затем снизился на 18,7% ( $p < 0,01$ ) в четвёртой группе по сравнению с контролем, указывая на истощение ресурсов плазминогена (добавление стрептокиназы подтверждает это заключение неизменившимся временем лизиса). Активность ИАП-1 сначала практически не меняется в первой группе, а затем в четвёртой возрастает на 55,6% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольной группой. Этот показатель свидетельствует о том, что по мере увеличения сроков затравочного периода ССГ увеличивается производство тромбина. Так как тромбин непосредственно активирует выработку ИАП-1 эндотелиоцитами, который впоследствии сначала накапливается в тромбоцитах, а затем, при активации последних, высвобождается в плазму, замедляя фибринолиз.

По мере увеличения продолжительности действия ССГ гиперагрегационная напряженность плазмы крыс нарастала. Показатель ЦЭК увеличился на 80,4% ( $p < 0,001$ ) в 4 группе по сравнению с контролем, указывая на прогрессирование повреждения эндотелия. Количества NO — метаболитов уменьшилось на 32,1% ( $p < 0,01$ ) в данной группе по сравнению с показателем после 3 месяцев действия ССГ, что говорит о дисфункции сосудистого эндотелия.

Показатели агрегационной способности тромбоцитов к окончанию периода воздействия ССГ указывали на активацию функции. Уменьшился показатель ИАТ на 20% ( $p < 0,01$ ) и увеличился САТ на 80,3% ( $p < 0,001$ ) в четвёртой группе по сравнению с контрольной (рисунок 2). Увеличение функциональной активности тромбоцитов можно объяснить стимулирующим влиянием со стороны тромбина, в силу роста активности последнего, а также — непосредственной активацией фосфолипазы А2 сероводородом и запуска последующего эйкозаноидного пути, по данным исследований доноров HS-ионов *in vitro* (D'Emmanuele di Villa Bianca R. et al., 2013).

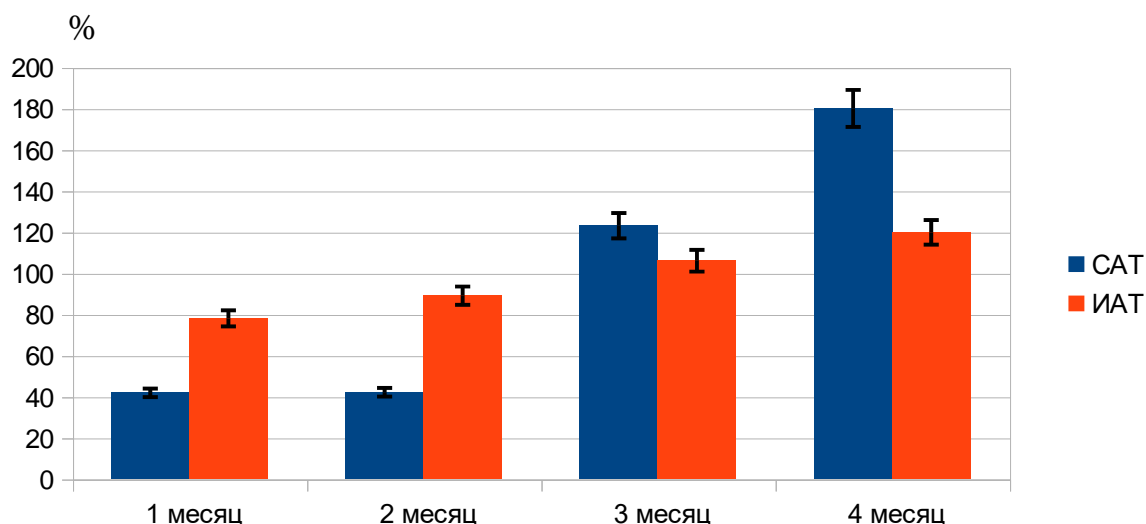


Рисунок 2. Показатели спонтанной (САТ), индуцированной (ИАТ) агрегации тромбоцитов при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду), %

Уменьшились показатели ЭВ на 11, 7% ( $p < 0,05$ ), ТВ на 10,9% ( $p < 0,05$ ) в 4 опытной группе, что говорит об увеличении активности тромбина (рисунок 3).

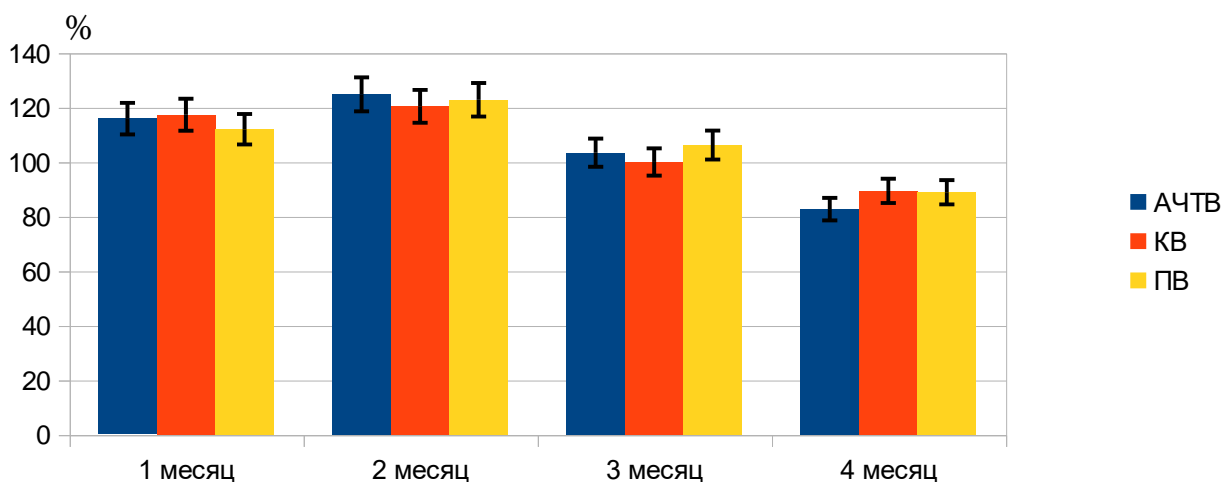


Рисунок 3. Показатели активированного частичного тромбопластинового (АЧТВ), каолинового (КВ) и протромбинового (ПВ) времени при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду), %

Содержание в плазме крыс ИАП-1 возросло на 55,6% ( $p < 0,01$ ). Его продукция эндотелием (и последующее торможение лизиса фибриновых отложений) активируется тромбином, депонируется в тромбоцитах в неактивированной форме и высвобождается на фоне действия ССГ. Данные

косвенно указывают на снижение активности плазмина, что привело к замедлению фибринолиза по показателю фХПа-ЭЛ на 18,7% ( $p < 0,01$ ) в данной группе и росту содержания РФМК 27,3% ( $p < 0,01$ ) в плазме животных.

**Корреляционный анализ взаимосвязей показателей системы гемостаза и эндотелия крыс в течение 4-месячного воздействия сероводородсодержащего газа.** Учитывая многочисленность внутри- и внесистемных связей параметров гемостаза при хроническом воздействии ССГ, нами был проведен корреляционный анализ. Сопоставлено 15 параметров системы гемостаза и эндотелия сосудов. На рисунке 4 указаны только сильные ( $r > 0,70$ ) прямые и обратные связи.

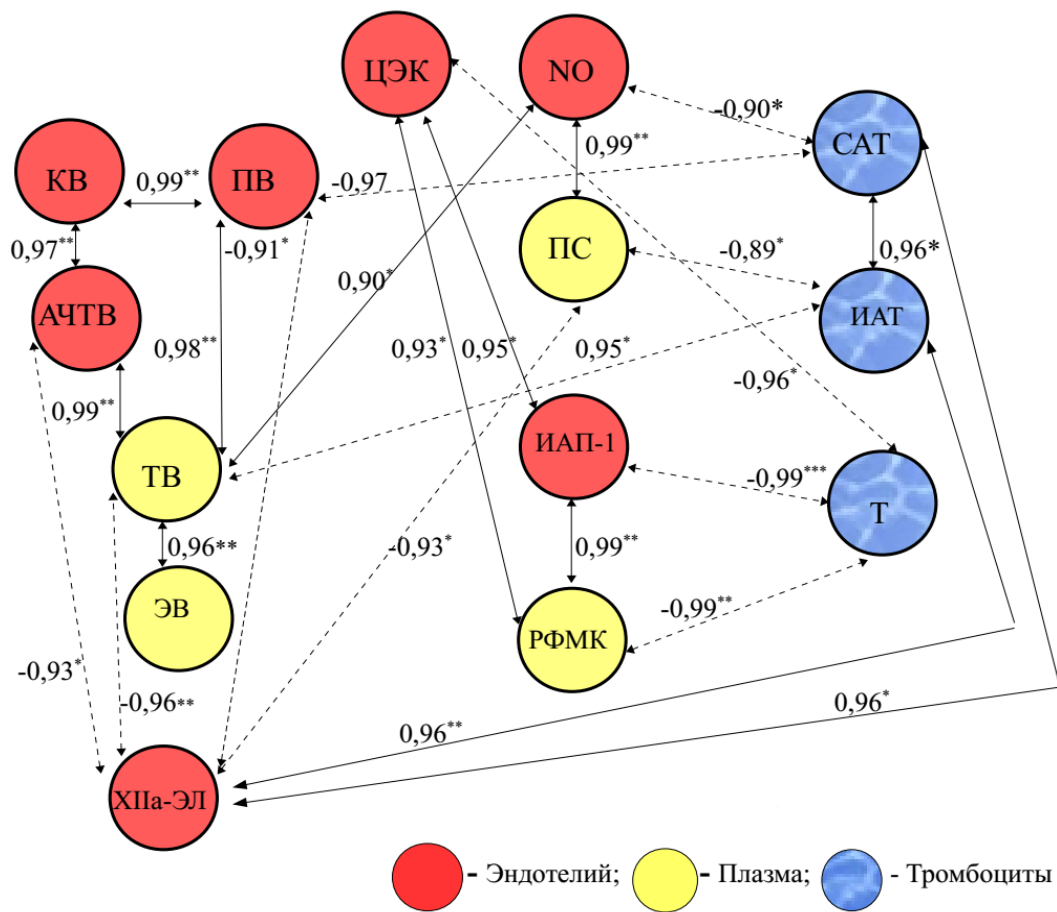


Рисунок 4. Корреляционные взаимосвязи между параметрами системы гемостаза и эндотелия на фоне хронического воздействия сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$ )

Примечание:  $\longleftrightarrow$  - прямая связь;  $\dashleftarrow \dashrightarrow$  - обратная связь;  
 \* -  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,002$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

В прямой сильной корреляции находились показатели повреждения эндотелиоцитов и маркеры тромбинемии.

Динамика изменения NO-метаболитов на фоне 4-месячного периода затравки находилась в прямой сильной взаимосвязи с естественными антикоагулянтами системы протеина С, с показателями конечного этапа фибринообразования, тромбиновым и эхитоксовым временем.

В обратной выраженной корреляционной связи на протяжении хронического эксперимента находились параметры тромбоцитарного и плазменного звеньев системы гемостаза, показатели функционального состояния эндотелия (NO) и тромбоцитов (САТ).

Данные корреляционного анализа показали наличие выраженных взаимосвязей между тромбоцитарным, плазменным, фибринолитическим звеньями и эндотелием на фоне увеличения продолжительности хронического воздействия ССГ.

#### **Оценка эффективности применения корригирующих средств на сосудисто-тромбоцитарное и коагуляционное звенья системы гемостаза.**

Для подавления агрегационной активности через 4 месяца воздействия ССГ применялась АСК. Учитывалась ее способность угнетать последствия активации фосфолипазы А<sub>2</sub>, вызванные в нашем исследовании сероводородом (D'Emmanuele di Villa Bianca R. et al., 2013, 2015) и повышать продукцию NO – метаболитов (Щепелев В. Ю. с соавт., 2009; Gilroy D. W., 2005; Paul – Clarc M. et al., 2004), путём активации тромбоцитами эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) NO — синтазы (Chackraborty K. et al., 2003).

Учитывая повышение активности тромбина через 4 месяца хронического воздействия ССГ, для коррекции плазменного звена в качестве антикоагулянта был выбран специфический ингибитор данного фактора, ДНК-аптамер ингибитор тромбина (31 ТВА). Данное соединение — представитель перспективных недавно синтезированных активных молекул — участков ДНК с определенной фармакологической активностью. Использование аптамера было обусловлено его специфической способностью связываться с участками



(эпитопами) тромбина и подавлять его активность (Кульбачинский А. В. с соавт., 2003; Копылов А. М., Спиридонова В. А., 2009; Завьялова Е. Г., 2013; Block L. C. et al., 1992; Tidmarch G. F. et al., 1993).

В результате проведенного исследования хронического воздействия сероводорода стало очевидным положительное преимущественное влияние АСК на тромбоцитарное, а аптамера — на плазменное, вовлекающее впоследствии и клеточные звенья гемостаза. При одновременном применении двух средств происходит суммация эффектов за счет общего снижения прокоагулянтного фона плазмы.

АСК увеличила число тромбоцитов на 23,5% ( $p < 0,05$ ) в данной опытной группе. В то же время одновременное применение АСК и аптамера способствовало увеличению пластинок крови - на 25% ( $p < 0,01$ ). Аптамер проявил гипоагрегационное действие: степень ИАТ уменьшилась на 18,9% ( $p < 0,05$ ). АСК+аптамер понизили ИАТ на 39,8% ( $p < 0,01$ ) (рисунок 5).

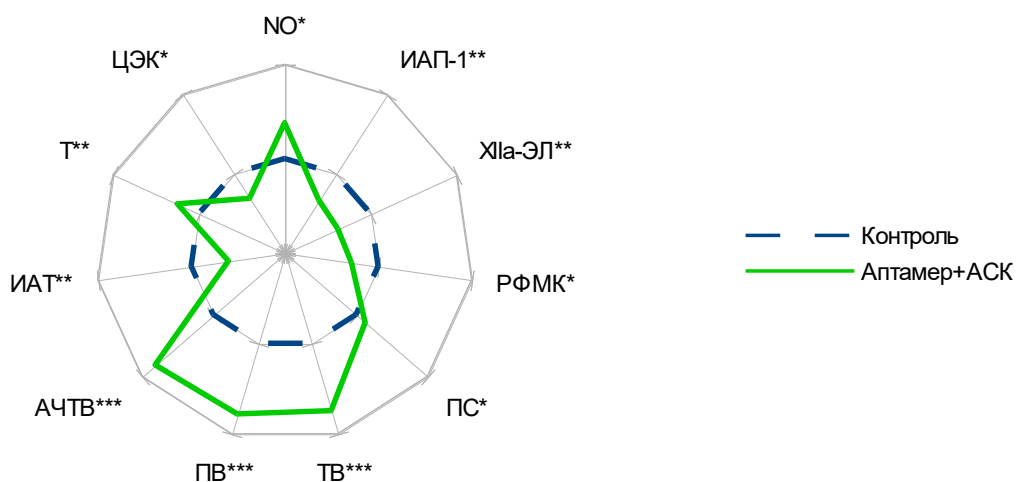


Рисунок 5. Коррекция изменений параметров системы гемостаза и эндотелия, вызванных сероводородсодержащим газом ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду) применением АСК+ аптамера

Примечание: данные на рисунке выражены в % относительно своей группы контроля; Уровень статистической значимости между опытной и контрольной группой соответствует \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .

При применении АСК у крыс уменьшилась выраженность дисфункции эндотелия: содержание NO — метаболитов в плазме крыс увеличилось на 36,9% ( $p < 0,05$ ). Понижение ЦЭК на 28,8% ( $p < 0,05$ ) в кровотоке животных на

фоне приема препарата свидетельствует и о защитной, восстанавливающей эндотелий способности АСК на фоне действия ССГ.

На факторы плазменного звена гемостаза аптамер оказал существенное значение через ингибирование тромбина. Так, увеличились показатели: ПВ — на 57,1% ( $p < 0,001$ ), АЧТВ — на 66,5% ( $p < 0,001$ ), ТВ — на 60,8% ( $p < 0,001$ ) — показатели коагуляционного звена системы гемостаза. Выраженнее изменения после применения АСК+аптамер. Так, АЧТВ увеличилось на 81,5% ( $p < 0,001$ ), что выше по сравнению с аптамером только на 15% ( $p < 0,05$ ), а по сравнению с АСК — на 64% ( $p < 0,001$ ) (рисунок 5).

Стоит отметить, что АСК проявила антикоагулянтные свойства у животных через 4 месяца хронической ингаляции, увеличив в опытной группе показатель АЧТВ — на 17,5% ( $p < 0,05$ ) и ПВ — на 8,4% ( $p < 0,05$ ).

Значительнее цифры после АСК + аптамер. Возрос показатель АЧТВ на 81,5% ( $p < 0,001$ ). Протромбиновое время увеличилось на 78,2% ( $p < 0,001$ ), тромбиновое время — на 74,5% ( $p < 0,001$ ). Активность протеина С (ПС) после применения АСК увеличилась на 29% ( $p < 0,01$ ). Аптамер на данный показатель не повлиял.

Одновременное воздействие АСК и аптамера на два звена гемостаза: клеточный и коагуляционный при хронической ингаляции ССГ повлияли на третье — фибринолитическое. В группе применения аптамера отмечено снижение активности ИАП-1 на 28,6% ( $p < 0,05$ ). После АСК+аптамер — на 33,3% ( $p < 0,01$ ).

Менее изменилась динамика фХПа-зависимого фибринолиза, которая под воздействием АСК ускорилась на 12,4% ( $p < 0,05$ ), что говорит об увеличении активности плазминогена. Аптамер также повлиял на лизис сгустка, ускорив его на 16,9% ( $p < 0,01$ ). После применения АСК+аптамер скорость фибринолитического процесса возросла в большей степени: на 38,2% ( $p < 0,01$ ).

Эффект ускорения фибринолиза под воздействием АСК наблюдал и С. Patrono et. al. (1994), который объяснил данный механизм следствием уменьшения количества тромбина и облегчением активации плазминогена,

даже той его части, что связана с фибриногеном и фибрином. Подавляется функциональная активность фибриногена, приводящая к ингибированию образования фибрина и продуктов его деградации — D-димеров. Содержание маркера внутрисосудистой активации системы гемостаза, РФМК, в равной степени снизилось, как от аптамера (на 21,4%,  $p < 0,05$ ), так и от АСК+аптамер (на 28,6%,  $p < 0,05$ ). АСК снизила содержание данного показателя на 7,1% ( $p < 0,05$ ).

Количество животных с превышающим пороговое значение (500 нг/мл) продуктов деградации поперечноспятого фибрина, D-димеров, в большей степени уменьшилось под воздействием аптамера: на 30% по сравнению с контрольной группой.

На основании проделанной работы нами предложен механизм хронического воздействия сероводородсодержащего газа Астраханского месторождения (в концентрации 80 мг/м<sup>3</sup>) на параметры системы гемостаза и эндотелия сосудов, основанный на корреляционном анализе и применении корректирующих средств.

## **ВЫВОДЫ**

1. При хроническом воздействии промышленного природного сероводородсодержащего газа Астраханского месторождения установлены разнонаправленные изменения со стороны системы гемостаза крыс. Отмечается смещение гемостатического баланса в сторону гипокоагуляции на ранних этапах ингаляции (1 — 2 месяца) и выраженная гиперкоагуляция — в более поздний период (3 — 4 месяца).

2. Через один месяц хронического воздействия сероводородсодержащего газа (в концентрации 80 мг/см<sup>3</sup> по сероводороду) отмечаются гипокоагуляционные изменения параметров гемостазиологического профиля крыс за счёт активации эндотелия (синтез метаболитов азота, тканевого активатора пламиногена), фибринолитической системы (фХПа-зависимый эуглобулиновый лизис) и гипофункции тромбоцитов (снижение степени спонтанной и индуцированной агрегации тромбоцитов).

3. Через два месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа гипокоагуляционная направленность реакций системы гемостаза усиливается. Эти изменения связаны с гиперфункцией эндотелия (синтез метаболитов оксида азота), активацией физиологических антикоагулянтов (протеины С и S, активированные тромбином) и усилением фибринолиза (преобладание синтеза активаторов плазминогена над ингибиторами, высокая скорость фХПа-зависимого эуглобулинового лизиса) на фоне формирующейся тромбоцитопении.

4. Через три месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа возникает критический период гемостазиологического баланса — отмечается тенденция к гиперкоагуляции. Регистрируется угнетение противосвёртывающего звена гемостаза (протеинов С и S), истощение резервных возможностей системы фибринолиза (угнетение активаторов плазминогена подавляющим количеством ингибиторов; замедление фХПа-зависимого эуглобулинового лизиса) и эндотелия (снижение активности тканевых активаторов плазминогена, NO-синтаз).

5. Через четыре месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа ускоряется гемокоагуляция крови по внешнему и внутреннему путям. Усиливается деструкция эндотелия (рост числа десквамированных эндотелиоцитов, высвобождение тканевого фактора поврежденными эндотелиоцитами). Отмечается тромбинемия (увеличение D-димера, растворимых фибрин-мономерных комплексов), рост активности тромбоцитов (спонтанная и индуцированная агрегации), угнетение фибринолиза (увеличение растворимых фибрин-мономерных комплексов и ингибитора активатора плазминогена-1, замедление фХПа-зависимого эуглобулинового лизиса), что является предпосылками к формированию латентного гиперкоагуляционного синдрома.

6. Корреляционный анализ выявил значительную взаимосвязь между параметрами различных звеньев системы гемостаза и эндотелия крыс на протяжении четырех месяцев воздействия сероводородсодержащего газа.

Сопряжённая функциональная динамичность внутрисистемных реакций при этом открывает возможности решения проблемы коррекции тромботической готовности крови.

7. Учитывая тромбинную и тромбоцитарную направленность хронического действия промышленного природного сероводородсодержащего газа Астраханского месторождения, обоснованна целесообразность одновременного применения в период гиперкоагуляционной напряжённости у крыс ДНК-аптамера ингибитора тромбина (коагуляционное звено) и ацетилсалициловой кислоты (сосудисто-тромбоцитарное звено).

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Полученные в ходе исследования данные изменения и взаимодействия параметров системы гемостаза и эндотелия на фоне хронического действия промышленного природного сероводородсодержащего газа Астраханского месторождения могут являться основой для расширения диагностической панели коагулометрических тестов, применяемых по региональным нормативам в ходе медицинских осмотров работников газовой промышленности определением каолинового и эхитоксового времени свёртывания, активность системы протеина С, содержания ингибитора активатора плазминогена-1, скорости фХIIа-зависимого эуглобулинового лизиса, количества десвамированных эндотелиоцитов и NO-метаболитов.

2. Для коррекции гиперкоагуляционных сдвигов, вызванных хроническим действием сероводородсодержащего газа целесообразно использовать антикоагулянты и антиагреганты. В качестве антикоагулянта оптимально использовать аптамер, подавляющий активность тромбина (и все тромбинообусловленные реакции). ДНК-аптамер ингибитор тромбина специфично угнетает фибринообразование, активность проакцелерина (фV), проконвертина (фVII), предшественника плазменного тромбопластина (фXI), фибринстабилизирующего фактора (фXIII). В числе зависимых от тромбина функций аптамером ингибируется агрегационная способность тромбоцитов крови. Результаты данной работы могут быть использованы на дальнейших

этапах исследования в перспективе создания на его основе зарегистрированного фармакологического препарата.

В качестве антиагреганта рекомендуется ацетилсалициловая кислота, корректирующая тромбоцитарную и эндотелиальную активность, содержание кальция в тромбоцитах и фибринолиз.

## **ПУБЛИКАЦИИ:**

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

#### **Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ**

1. Голубкина, Е. В. Нарушения в системе гемостаза при воздействии сероводородсодержащего газа и возможные пути коррекции / Тризно Н. Н., Теплый Д. Л., Голубкина Е. В., Тризно М. Н., Дюкарева О. С. // *Естественные науки.* - №1 (58). - 2017. - С.67-72.
2. Голубкина, Е. В. Состояние системы гемостаза у крыс после хронической интоксикации сероводородсодержащим газом / Тризно Н.Н., Голубкина Е.В., Тризно М.Н., Дюкарева О.С. // *Современные проблемы науки и образования.* – 2017. – № 4.; URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26683>
3. Голубкина, Е. В. Изменения гемостазиологического профиля крыс при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа и возможности их коррекции / Тризно Н.Н., Галимзянов Х.М., Никулина Д. М., Спиридонова В. А., Голубкина Е. В., Дюкарева О.С., Тризно М.Н. // *Астраханский медицинский журнал.* №2. – Т. XII. – С. 75-81.
4. Golubkina, E. V. Complex Formation with Protamine Prolongs the Thrombin-Inhibiting Effect of DNA Aptamer in vivo V. A. Spiridonova, T.M. Novikova, D.M. Nikulina, T.A. Shishkina, E.V. Golubkina, O.S. Dyukareva, N. N. Trizno // *Biochimie.* DOI: 10.1016/j.biochi.2017.09.010

#### **Работы, опубликованные в других научных изданиях**

1. Голубкина, Е. В. Воздействие сероводородсодержащего газа на гемостаз крыс / Голубкина Е. В. // II-й региональной конференции учёных и инноваторов «ИННО-КАСПИЙ» 18 – 22 апреля, Астрахань, 2011. – С. 48.
2. Голубкина, Е. В. Экспериментальное изучение 15 и 31 ТВА ДНК-аптамеров ингибиторов тромбина / Никулина Д. М., Тризно Н. Н., Шишкина Т.А., Голубкина Е. В., Тризно М. Н., Дюкарева О. С., Спиридонова В. А., Мяснянкина Л. М. // *Материалы II Международной научной конференции, посвященной 80-летию академика РАЕН, заслуженного работника высшей школы РФ, д.б.н., профессора Д. Л. Теплового, г. Астрахань, 2011. – С. 23.*

3. Голубкина, Е. В. Влияние сероводородгазовых поллютантов на систему гемостаза крыс / Е. В. Голубкина, Тризно Н. Н. // Материалы II международной научной конференции 2-3 ноября «Свободные радикалы, антиоксиданты и старение» АГУ, Астрахань, 2011. – С. 24.
4. Голубкина, Е. В. Влияние ДНК-аптамеров (ингибиторов) тромбина на синдром гиперкоагуляции при кишечной непроходимости / Тризно М. Н., Голубкина Е. В., Шишкина Т. А., Дюкарева О. С. // Материалы 88-й итоговой научно-практической конференции сотрудников академии, врачей города и области «Актуальные вопросы современной медицины», Астрахань, 2011. – С. 51.
5. Голубкина, Е. В. Изменение показателей свертываемости крови в условиях гипоксии / Тризно М. Н., Шишкина Т. А., Голубкина Е. В., Дюкарева О. С. // Материалы 88-й итоговой научно-практической конференции сотрудников академии, врачей города и области «Актуальные вопросы современной медицины», Астрахань. - 2011 – С.72.
6. Голубкина, Е. В. Применение аптамеров в профилактике тромбозомболических осложнений при воздействии ССГ / Е. В. Голубкина, Тризно Н. Н. // Материалы II международной научной конференции 2-3 ноября «Свободные радикалы, антиоксиданты и старение» АГУ, Астрахань, 2011. – С.43.
7. Golubkina, E. V. Experimental study of the biological properties of DNA Aptamers — thrombin inhibitors / Golubkina, E. V., K. Glinkina, A. Protsko, O. Dyukareva, T. Shishkina, D.M. Nikulina, V. A. Spiridonova, N. N. Trizno // Abstract book 20014 IMSCNS, July 17 th — 20th 2014, NoviSad Republic of Serbia. — 2014. — P. 40.
8. Голубкина, Е. В. Оценка параметров фибринолитической системы при воздействии газовых поллютантов // Тризно Н.Н., Голубкина Е.В., Тризно М. Н., Дюкарева О. С., Мажитова М. В. / Бюллетень медицинских Интернет-конференций. — Саратов. — 2016. Т.6. — №11. — С. 1582.
9. Голубкина, Е. В. Изменение параметров плазменного звена гемостаза на фоне воздействия газовыми поллютантами // Тризно Н. Н., Голубкина Е.В., Тризно М. Н., Дюкарева О. С., Мажитова М. В. / Бюллетень медицинских Интернет-конференций. — Саратов. — 2016. — Т.6. — №11. — С. 1581.
10. Голубкина, Е. В. Изменение тромбоцитарного звена гемостаза под влиянием сероводородсодержащего газа. // Голубкина Е.В., Тризно Н.Н., Тризно М.Н., Дюкарева О. С., Мажитова М. В. / Бюллетень медицинских Интернет-конференций. — Саратов. — 2016. Т.6. — №11. — С.1580.
11. Голубкина, Е. В. Применение ДНК-аптамера ингибитора тромбина и ацетилсалициловой кислоты для коррекции предтромботических нарушений / Тризно Н.Н., Голубкина Е. В., Дюкарева О.С., Тризно М. Н. // I Межрегиональной научно-практической конференции «Фармакология разных стран». — Курск, 28 — 29 марта 2017. — Курск. — 2017. — С. 33—34.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСК -	ацетилсалициловая кислота
АЧТВ -	активированное частичное тромбопластиновое время
ГПЗ -	газоперерабатывающий завод
ИАП-1	ингибитор активации плазминогена – 1
ИАТ -	индуцированная агрегация тромбоцитов
КВ -	каолиновое время бедной тромбоцитами плазмы
ПВ -	протромбиновое время
ПС -	система протеина С
РФМК -	растворимые фибрин-мономерные комплексы
САТ -	спонтанная агрегация тромбоцитов
ССГ -	промышленный природный сероводородсодержащий газ Астраханского месторождения
Т -	количество тромбоцитов
ТВ -	тромбиновое время
ФХIIa-ЭЛ	фХIIa-зависимый эуглобулиновый лизис
ЦЭК -	циркулирующие (десквамированные) эндотелиоциты
ЭВ -	эхитоксовое время бедной тромбоцитами плазмы
31 ТВА -	thrombin binding aptamer, 31-цепочечный ДНК аптамер – ингибитор тромбина

Научное издание

**ГОЛУБКИНА Екатерина Валерьевна**

**ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ  
ВОЗДЕЙСТВИИ СЕРОВОДОРОДСОДЕРЖАЩЕГО ГАЗА  
И ПРИНЦИПЫ ИХ КОРРЕКЦИИ  
(Экспериментальное исследование)**

**Специальность 03.03.01 – физиология**