

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Астраханский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор Тризно Николай Николаевич

Астрахань - 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Современные представления о функционировании системы гемостаза.....	12
1.2 Характеристика действия сероводорода на систему кровообращения.....	21
1.3 Современные аспекты профилактики тромбообразования.....	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
3.1 Изменения гематологических показателей через 1 месяц хронического воздействия сероводородсодержащего газа .....	51
3.2 Изменения гематологических показателей через 2 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа .....	55
3.3 Изменения гематологических показателей через 3 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа .....	59
3.4 Изменения гематологических показателей через 4 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа.....	63
3.5 Корреляционный анализ показателей системы гемостаза и эндотелия крыс в течение 4-месячного воздействия сероводородсодержащего газа.....	71
3.6 Оценка эффективности применения корригирующих средств на сосудисто-тромбоцитарное и коагуляционное звенья системы гемостаза.....	78
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	85
ВЫВОДЫ.....	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	104

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

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). Небезосновательно полагают, что важным инициирующим агентом расстройств гемостаза является ответственный за регуляцию тонуса и миграцию клеток сосудистый эндотелий, так как при деструкции он преобразуется в активатора процессов свёртывания (Киричук В. Ф. с соавт., 2015; Срубиллин Д. В. с соавт., 2016).

Наряду с внутренней сосудистой выстилкой весомое значение в активации гемокоагулирующих реакций принадлежит тромбоцитам. Пластинки крови являются не только активаторами факторов коагуляционного звена системы гемостаза, но и полноценными участниками свёртывающего процесса благодаря своей возможности синтезировать ряд физиологически активных веществ (Волкова С. А. с соавт., 2013; Якименко А. О. с соавт., 2014; Hoffman M. A et al., 2001; Nurden A. et al., 2011).

Специфика современного этапа развития социума состоит в интенсификации антропогенной деятельности, ведущая, 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). Учитывая растущие темпы потребления энергетических ресурсов, в которых значительную долю составляет газовое производство, чрезвычайную актуальность приобретают исследования механизма реагирования систем органов и тканей в условиях воздействия токсиканта, превышающего предельно допустимые концентрации во вдыхаемом воздухе (Резаев А. А. С соавт., 2001;

Бучин В. Н., Лазько М. В., 2002; Власова О. С. с соавт., 2012; Бакиров А. Б. с соавт, 2014).

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).

Астраханское газовое месторождение является уникальным по содержанию сероводорода в сравнении с газоконденсатными источниками других регионов добычи и производства. Содержание сероводорода в местном природном газе составляет около 25%, что значительно выше по сравнению с составом газа других месторождений: 1,45 — 4,9% (Оренбург), до 5,3 (Саратов), до 5,5% (Уртабулак, Узбекистан), 3,8 — 8,6 (Караганак, Казахстан), 1,14 % (Учкыр, Узбекистан), 2,6 — 6,5 (Самантепе, Туркменистан). Кроме сероводорода в составе местного газа присутствует углекислота, сероокись углерода, меркаптановая сера.

Для расширения комплекса защитных мер экологической медицины, увеличения спектра профилактических возможностей практического здравоохранения актуальным является всестороннее гемостазиологическое обследование населения в целом, особенно работников производственных зон, связанных с промышленными поллютантами, для правильного выбора фармакологической поддержки, учитывая высокий уровень заболеваемости по данному показателю (Лебедева-Несверя Н. А. с соавт., 2010; Онищенко Г. Г. с соавт., 2011; Калиева И. А., 2012).

Исследования, посвященные анализу состояния сердечно-сосудистой системы у сотрудников Астраханского газоперерабатывающего завода указывают на снижение кардио-респираторного резерва, морфологической трансформации клеток и белков крови и наличия признаков интоксикации у работников с высоким

стажем. Результаты профилактических осмотров свидетельствуют о смещении гемостатического баланса в сторону активации: увеличение содержания продуктов паракоагуляции фибриногена, тромбоцитопения (Мангушев Р. И. с соавт., 1989; Бучин В. Н., 1997; Ярошинская А. П., 2003; Лазько А. Е. с соавт., 2008; Эсаулова Т. А., 2009; Бойко В. И. с соавт., 2017).

Достаточно неоднозначны имеющиеся сведения о действии экзогенного H<sub>2</sub>S (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<sub>2</sub>S 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, что в совокупности с необходимостью уменьшения риска тромботических осложнений впоследствии и определило необходимость проведения данного исследования.

### **Степень разработанности темы исследования**

В научной литературе представлены работы по изучению действия сероводородсодержащего газа *in vivo*, указывающие на дисрегуляцию сердечно-сосудистой системы (Бариева Б. Ш., 1999; Кабиева А. А., 1999; Кынатбеков Б. Ж., 1999; Боев В. М. с соавт., 2001; Беднов И. А., 2004; Эсаулова Т. А., 2009; Ярошинская А. П., 2011; Derwall M. et al., 2011; Kida K. et al., 2011). В ряде работ

были отмечены структурные изменения в эндотелии крыс при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа (Тризно Н. Н. с соавт., 2007; Шишкина Т. А., 2009).

Реакцию системы гемостаза на воздействие сероводорода исследовали с помощью доноров HS-аниона *in vitro* (Петрова И. В. с соавт., 2015; Заичко Н. В. с соавт., 2016; Kamata et al., 2006; Koenitzer J. R. et al., 2007; Webb G. D. et al., 2008; D'Emmanuele di Villa Bianca R. et al., 2010, 2013).

После открытия сероводорода эндогенного происхождения становится актуальным изучение его физиологической роли (Мельник А. В., Пентюк О. О., 2009; Coppola A. et al., 2000; Davi G. et al., 2001; Predmore B. L. et al., 2012; Petras M. et al., 2014).

Вместе с тем, анализ основных показателей системы гемостаза в совокупности с изучением состояния эндотелия в хроническом эксперименте при ингаляции природного сероводородсодержащего газа имеет важное прогностическое значение для своевременной комплексной оценки физиологического состояния кардиоваскулярной системы и решения проблем коррекции этих повреждений на ранних стадиях.

### **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.

### **Новизна исследования**

Впервые исследовано состояние системы гемостаза крыс при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа. 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 сероводородсодержащего газа 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, 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 сероводородсодержащего газа.

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 сероводородсодержащего газа. 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**

В соответствии с поставленными задачами были определены современные лабораторные методы исследования системы гемостаза, которые выполнялись на кафедре патологической физиологии и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Астраханского государственного медицинского университета» Минздрава России.

В крови определяли следующие показатели, характеризующие:

- Состояние эндотелия сосудов (количество NO – метаболитов, число циркулирующих (десквамированных) эндотелиоцитов);
- Сосудисто-тромбоцитарное звено системы гемостаза (количество и агрегационная активность тромбоцитов);
- Коагуляционное звено системы гемостаза (АЧТВ, ПВ, ТВ, КВ, ЭВ, система протеина С, РФМК, D-димер, фХIIa-зависимый эуглобулиновый лизис, ИАП-1).

Все полученные данные подвергались статистической обработке и корреляционному анализу.

### **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 способствует 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**

Основные результаты работы опубликованы в виде 15 научных статей, 4 из которых изложены на страницах изданий, рекомендованных ВАК РФ.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 132 страницах. Построена по классическому принципу, включая введение, обзор литературы, описание материалов и методов работы, собственные исследования, обсуждения результатов и выводов, список использованных литературных источников. Работа иллюстрирована 12 таблицами, 21 рисунком.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. 1 Современные представления о функционировании системы гемостаза

Гемостаз - сложный биохимический процесс призванный обеспечивать постоянство агрегатного состояния крови и ее целостности. Поддержание крови в жидком состоянии является компонентом гомеостатической системы.

Большинство ключевых звеньев коагуляции были обнаружены в течение 20-го века. В 1905 году Моравиц построил первую модель гемокоагуляции с участием тканевого фактора. В 1960-е годы две независимые группы ученых предложили модель каскадной гемокоагуляции, согласно которой все компоненты системы активируются либо по внутреннему, либо - по внешнему пути, формирование фибринового сгустка происходит после каскадной последовательной череды реакций (Davie E. W., Ratnoff O. D., 1964; Macfarlane R. G., 1964).

Позднее была выделена отдельно система регулирования агрегатного состояния крови (РАСК). Благодаря которой с участием простагландинов и кининов поддерживается баланс факторов свёртывающей и противосвёртывающей системы, а также восстанавливается целостность сосудистой стенки после ее повреждения (Шиффман Ф. Дж., 2007; Зубаиров Д. М., 2000; Тимербаев В. Н. с соавт., 2013).

Широко используемая в настоящее время модель коагуляции позволяет разделить этот процесс на три отдельные фазы. Фаза инициации, характеризующаяся выделением тканевого фактора субэндотелиальной выстилкой после повреждения и объединения его с фактором VIIa из плазмы с последующим незначительным выделением тромбина. Фаза амплификации (усиления), в которой уровень активных факторов свертывания крови значительно повышается под действием тромбина. И фаза распространения, в которой компоненты свертывания крови связываются с прокоагулянтными мембранами активированных клеток плазмы, формируя теназный (фVIIIa/IXa) и протромбиназный (фVa/Xa/Ca<sup>++</sup>/фактор 3 тромбоцитов) комплексы в результате

«тромбинового взрыва», приводящие к фибринообразованию (Бутенас С., Манн К.Г., 2002; Monroe D. M., Hoffman M., 2006).

В настоящее время концепция гемостаза учитывает не только межмолекулярные и биохимические взаимодействия, но и участие клеточного компонента свертывающей системы. Так, после повреждения сосудов, тромбоциты собираются у поврежденного участка и формируют агрегат через взаимодействие рецепторов тромбоцитов с внеклеточными лигандами и растворимыми белками (Hoffman M. A., Munroe D. M., 2001). Тромбоциты циркулируют в дискоидном и неадгезивном состоянии благодаря особенностям эндотелиальных клеток сосудистой стенки, которые, с одной стороны продуцируют вещества, ингибирующие тромбоциты (простагландин I<sub>2</sub>, оксид азота), а с другой - метаболизируют агонисты данных клеток (АДФ, тромбин) в неактивные продукты (Волкова С. А. с соавт., 2013; Пучиньян Д. М., 1995; Colman RWCA et al., 2001). Исследования на генетически модифицированных мышях и пациентах, имеющих генетические дефекты, убедительно выявили несколько классов поверхностных гликопротеинов, которые экспрессируются в больших количествах и имеют важное значение для первичного ответа тромбоцитов (Nurden A., Nurden P., 2011). Медленно накапливающееся количество тромбина будет способствовать дальнейшей активации тромбоцитов, примкнувших к месту повреждения. При этом сама тромбоцитарная активация - довольно сложный процесс. Было выявлено множество рецепторов, а также сложные внутриклеточные сигнальные пути, которые участвуют в развитии многослойного тромба в физиологических условиях (Gibbins J. M., 2004; Dubois C. et al., 2007; Savage B., Ruggeri Z. M., 2007; Munnix I. C. et al., 2009; Brass L. F. et al., 2011; Stegner D., Nieswandt B., 2011).

В целом, дискоидной формы тромбоциты взаимодействуют посредством адгезивных рецепторов с внеклеточным матриксом компонентов факторов фон Виллебранда и коллагена, что приводит к нестабильной адгезии. После этого клетки меняют свою форму, округляются с образованием псевдоподий,

экспрессируют активированные интегрины, секретируют аутокринные агенты. Несколько свободных тромбоцитов затем соединяются с помощью фибриногена, производя фибриновые сгустки под действием тромбина, и, наконец, слипаются с образованием плотноупакованного тромба, что резко увеличивает образование теназа, протромбиназного комплекса и усиливает образование тромбина. Параллельно этому тромбин преобразует фV в фVa, усиливая протромбиназную активность и превращение фVIII в фVIIIa, действующим как кофактор к фIXa, что поддерживает выработку фXa на поверхности активированных тромбоцитов (Шиффман Ф. Дж., 2007; Munnix I. C., et. al., 2007).

Концепцией значимости физического расстояния в регуляции гемостатических реакций были дополнены существующие представления о кровоостанавливающих механизмах (Бутылин А. А., Пантелеев М. А., Атауллаханов Ф. И., 2007). Показано, что фXa и фIXa производятся и по внешнему и по внутреннему (фXIa) путям. Но фXa быстро ингибируется и не может добраться до тромбоцитов для производства протромбиназы. А фIXa ингибируется медленнее, что добавляет ему способности приблизиться к тромбоцитам и на их поверхности продолжать генерировать фIXa под действием фXIa, образованного под влиянием тромбина в петле обратной связи. То есть, для первоначального производства тромба нужна внешняя теназа, а для продолжения процесса необходима внутренняя. Поэтому фIXa начинает работать на значительном удалении от активатора. Множественные эффекты тромбина, обусловленные многократно усиленным его производством, проявляются в фазу распространения, и на последнем этапе активированная тромбином плазменная транслугаминаза фXIIIa катализирует образование ковалентных сшивок между соседними волокнами фибрина с образованием эластичного, полимеризованного фибринового тромба (рисунок 1) (Ariens R. A. et. al., 2002).

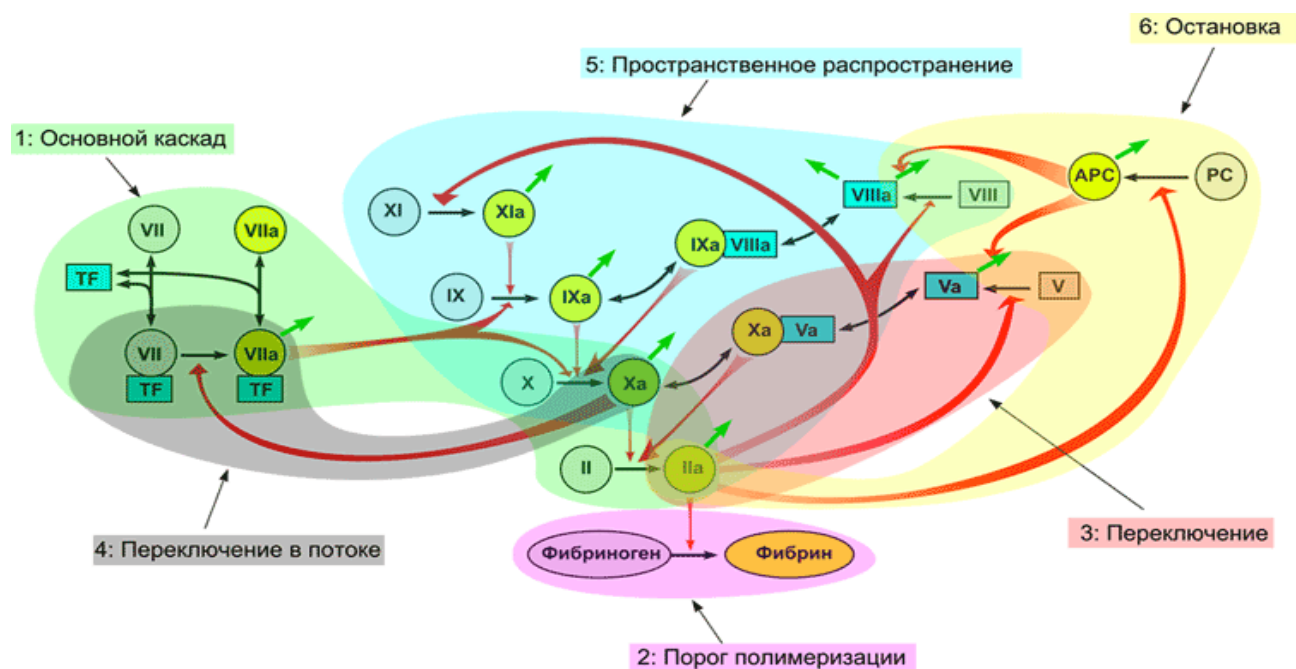


Рисунок 1. Модульная схема свёртывания крови по М. А. Пантелееву, Ф. И. Атауллаханову, А. Н. Баландиной, 2011.

Недавние исследования показали, что у мышей внутренний путь активации более или менее эквивалентен внешнему пути. В данном случае инициаторами коагуляции являются, по-видимому, коллаген, фосфатные полимеры и нейтрофильные ловушки (NETs) (Renne T., Gailani D., 2007; Van der Meijden P. E. et al., 2009; Von Bruhl M. L. et al., 2012). Тромбоцитарные и клеточные полифосфаты связываются и активируют фХII, что приводит к последующей активации калликреина плазмы, фIX и - к последующему каскаду свёртывания (Тимербаев В. Н. с соавт., 2013; Muller F. et al., 2009).

В последнее время было открыто множество факторов и биохимических ингибиторов различных этапов коагуляции. Подобные супрессоры могут быть разделены на 2 группы: циркулирующие ингибиторы протеаз, такие как антитромбин, гепарин, кофактор II, TFPI и ингибитор C<sub>1</sub>. Данные молекулы блокируют активированные факторы свертывания крови, связываясь с их активными сайтами. Второй путь контроля коагуляции представляется системой

ферментов на основе протеина C / S (Broze G. J. Jr., Girard T. J., 2012; Hansen J. B. et. al., 1994).

Тромбин - уникальный по своим свойствам компонент системы гемостаза. Эта сериновая протеиназа может направлять процесс свёртывания крови как в прокоагулянтную, так и в антикоагулянтную сторону. Образование минимальных «следовых» количеств тромбина уже способствует активации фV, фVIII и фXI, что идёт в совокупности с непосредственной ролью тромбина в процессе перехода фибриногена в фибрин (Stubbs M. T., Vode W., 1995). В последнее время говорят о существовании PAR- рецепторов на мембранах тромбоцитов, с помощью которых протеиназа способна активировать клетки в условиях патологии такой, как, например, гипоксия (Дугина Т. Н. с соавт., 2002; Di Cera. E., 2003). Выявлена значимая способность у сформированного по внешнему пути тромбина. На мембране уже агрегированных пластинок крови под непосредственным влиянием тромбина образуются рецепторы, адсорбирующие фХа. В результате чего, фХа становится «невидимым» для сильнейшего естественного антикоагулянта — антитромбина III. Указанный аспект формирует дополнительные условия для развития тромба (Dang Q. D. Et al., 1995; Esmon C. T., 2000; Аасрум М., Придз Х., 2002; Mann K. G. et. al., 2003).

Изначально в организме баланс в работе систем свёртывания и противосвёртывания преимущественно смещен в прокоагулянтную сторону. Термин «тромбофилия» был предложен Egebrgg O. в 1965 после обнаружения дефицита антитромбина III на генетическом уровне, говорящий об отсутствии сдерживающего влияния противосвёртывающих факторов на естественный гиперкоагуляционный ответ при сопутствующих условиях. В настоящее время появились многочисленные работы, в которых система гемостаза перестает рассматриваться изолированно, как мультиферментный каскад кровотока, а ее анализ переводится в плоскость взаимосвязей с другими системами организма (Патрушев Л. И., 2002; Ядрихинская В. Н. с соавт., 2016).

Исследования последних лет расширяют представления об эндотелии как о



внутреннем барьере между кровью и адвентицией, указывая скорее на то, что это самостоятельная активная метаболическая система (Киричук В. Ф. с соавт., 2015; Кузник Б. И., 2015; Милош Т. С. с соавт., 2015; Срубиллин Д. В. с соавт., 2016). Функциональная активность эндотелия находится в активной взаимосвязи с лейкоцитами и тромбоцитами (рисунок 2). Показано, как под воздействием ацетилсалициловой кислоты путем ацетилирования циклооксигеназы - 2 в клетках крови, синтезируется 15-эпилипосин А4, который стимулирует эндотелиальную (eNOS) и индуцибельную (iNOS) NO — синтазы, активируя образование метаболитов оксида азота (Герасимов А. А., 2015; Цепелев В. Ю. с соавт. 2009; Chakraborty K. et al., 2003; Gilroy D. W., 2005; Paul – Clark M. et al., 2004).

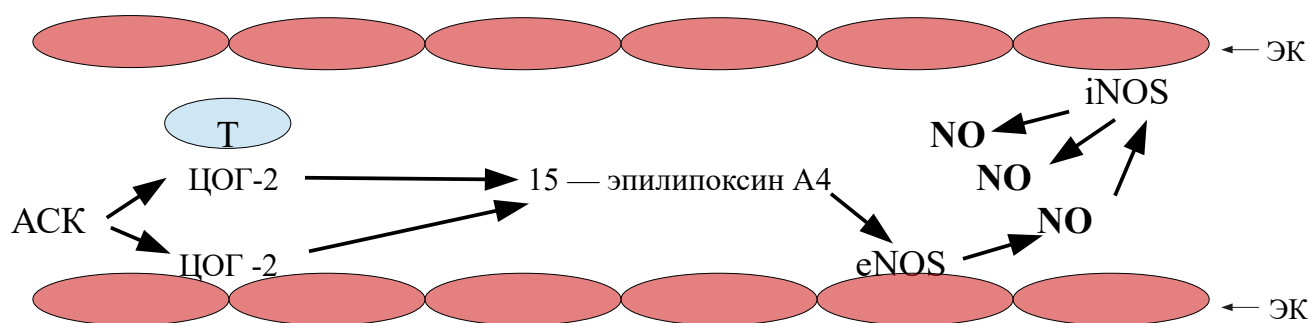


Рисунок 2. Продукция оксида азота под воздействием АСК (по Цепелеву В. Ю. с соавт.)

Примечание: eNOS — эндотелиальная NO — синтаза, iNOS — индуцибельная NO — синтаза, NO — оксид азота, ЭК — эндотелиальные клетки, Т — тромбоцит, АСК — ацетисалициловая кислота, ЦОГ-2 — циклооксигеназа -2.

Система гемостаза остро реагирует на изменение такого интегративного параметра, как кислотно-щелочного равновесие в организме. При уменьшении pH крови и формирования ацидоза показатели системы гемостаза смещаются в прокоагулянтную сторону. Так, ретроспективный анализ историй болезней пациентов с метаболическим ацидозом на фоне сахарного диабета показал

повышение концентрации маркёров тромбинемии - D-димеров в 2,43 раза, уменьшение числа тромбоцитов, удлинение АЧТВ на 23,9%, ТВ в 1,2 раза и МНО на 12,3% ( $p \leq 0,05$ ) (Авсеенко Н. Д., 2012). У всех представителей данной категории больных были отмечены признаки ДВС-синдрома. Снижение числа тромбоцитов на 48,45% к окончанию периода лечения в стационаре в исследовании объясняется снижением дзета-потенциала клеток в связи с увеличенным числом протонов при ацидозе, ведущее к формированию конгломератов кровяных пластинок.

Значение снижения параметров рН на свёртывающую систему крови и фибринолиз изучали *in vitro* на собаках (Альфонсов В. В., 2010). Определено, что низкие концентрации молочной кислоты ускоряли, а высокие — замедляли фибринообразование. Механизм гиперкоагуляции низких доз кислоты автор связывал с инактивированием антитромбина, высвобождением прокоагулянтов тромбоцитов и эритроцитов, а также повреждением реакций дезагрегации пластинок крови. Несколько отличались процессы свёртывания крови при исследовании на цельной крови, что указывает на сложную организацию системы гемостаза. В условиях ацидоза первоначально процесс склеивания тромбоцитов замедляется, но на активации гемостаза это не отражается торможением, а напротив, усиливает его, так как необратимость агрегации нарастает, что увеличивает прочность конгломератов клеток.

Разнонаправленную реакцию гемостатических параметров на различные стрессирующие воздействия изучали в условиях, обычно формируемых при катастрофах природно - техногенного характера: психоэмоционального напряжения, физической нагрузки, иммобилизации и гипоксии. Однократная интенсивная физическая нагрузка отразилась на гемостазе активацией функционирования тромбоцитов. Со стороны коагуляционного звена наблюдалась активация внешнего и контактного путей свёртывания. Конечный этап образования фибрина угнетался на фоне роста количества фибриногена в плазме. Активировались антикоагулянтная и фибринолитическая системы. Стимуляция

всех звеньев гемостатической системы наблюдалась после кратковременного иммобилизационного воздействия. Изменения в сосудисто-тромбоцитарном звене системы гемостаза были в форме увеличения агрегационной способности пластинок крови. Активирующее влияние гипобарической гипоксии на систему гемостаза авторы объяснили тем, что  $\text{CO}_2$  может активировать антикоагулянтные факторы плазмы такие, как антитромбин III (Вдовин В. М., 2006; Шахматов И. И., 2011). Во внимание было принята значимая в адаптивных процессах роль углекислого газа (Агаджанян Н.А., Чижов А.Я., 2003; Габриелян Э.С., Амроян Э.А., 1984; Маршак М. Е., 1969; Прокопов Г. В. с соавт., 1970). Активация агрегации тромбоцитов и внутреннего пути свёртывания при кратковременном пятнадцатиминутном воздействии гипоксии может объясняться неспецифическим реагированием симпато-адреналовой системы (Нагнибеда Н. Н., 1997), а также - показателем эустрессового ответа (Li X.B., Guo X.Q., 1996). Подавление фибринолиза может быть связано с ростом количества ингибитора тканевого активатора плазминогена (ИАП-1), активируемого тромбином (Долгов В. В., Свирин П. В., 2005). Увеличение продолжительности однократного воздействия гипоксии приводило к специфической реакции гемостатической системы, активирующей прокоагулянтные факторы, а в условиях гиперкапнии - дополнительно противосвёртывающих и фибринолитических систем.

Изучалось влияние различных температурных режимов на параметры гемостатической системы.

Известно, что гипотермия вызывает значительные изменения реологических свойств крови и гемостатического баланса (Старков Ю. Л. с соавт., 1999; Доровских В. А., 2001; Sharovalov K. G. et al., 2006; Mohr W. J., 2009; Ikäheimo T. M., 2011). Так, описаны изменения на крысах, которые говорят о понижении тромботической готовности под воздействием холодого фактора. Увеличение протромбинового времени, АЧТВ, времени коагуляции, количества маркёров тромбинемии свидетельствует о гипокоагулянтной направленности реакций системы гемостаза и фибринолиза (Лычёва Н. А., 2015).

Воздействие гипертермии на параметры систем гемостаза и фибринолиза изучалось в работах Николаева В. Ю. (2016). Было показано смещение гемостатического потенциала в гипокоагуляционную сторону по мере увеличения ректальной температуры крыс с последующим формированием тромботической готовности в постгипертермический период и долговременной адаптацией при многократном гипертермическом воздействии.

Учитывая значение экологического фактора на организм, актуально изучение воздействия экзогенных токсикантов на систему крови. В НИИ скорой помощи им. Склифосовского изучалось влияние экзогенных токсикантов химической природы на гемостаз (Бурыкина И. А. с соавт., 2005). Уже в ранние сроки, токсикогенную стадию, отмечалось нарушение функционального состояния мембран клеток крови с образованием агрегатов в микроциркуляторном русле, что являлось плацдармом для развития микроорганизмов и эндотоксемии. Последствия воздействия токсикантов различных категорий (психофармакологические средства, фосфорорганические соединения и прижигающие жидкости) приводили к повышению концентрации фибриногена и гиперагрегации тромбоцитов. Наблюдалось сокращение времени свёртывания. В части случаев, при отравлении фосфорорганическими соединениями, отмечалось падение агрегационной активности клеток крови.

Согласно данным ряда авторов, изучавших воздействие химических токсикантов на функциональные характеристики крови, временной фактор способствует увеличению агрегационной активности эритроцитов и тромбоцитов (Радзивил Г. Г., Минскер Г. Д., 1985; Ильяшенко К. К. с соавт., 2003; Dintenfass L. et. al., 1974). Была выявлена зависимость концентрации фибриногена и роста вязкости плазмы. Замечено, что изменения существенно не различались при среднетяжелых и тяжелых степенях отравлений, что объяснялось уравниванием адаптационных возможностей организма в ответ на химические факторы при увеличении концентрации токсикантов в кровяном русле и присоединением нарушений со стороны сердечно-сосудистой и дыхательной систем (Бурыкина И.

А. с соавт., 2005).

В связи с интенсификацией газовой промышленности, в частности производства по добыче и переработке сероводородсодержащего газа (ССГ), увеличивается количество исследований в области механизма воздействия данного поллютанта на кровеносную систему. В исследованиях *in vitro* с помощью донора  $\text{HS}^-$  - аниона изучена дозозависимая коагулопатическая активность сероводорода. Было показано, что на дисбаланс параметров системы гемостаза под воздействием молекулярных источников сероводорода значительно влияет сопутствующая патология организма (Петрова И. В. с соавт., 2015; Заичко Н. В. с соавт., 2016; Coppola A. et al., 2000; Davi G. et al., 2001; Murakami et al., 2012; D'Emmanuele di Villa Bianca R. et al., 2013; Lu Xiaohua et al., 2015).

Таким образом, понимание сущности реагирования параметров свёртывающей и противосвёртывающей систем в различных условиях на целостный организм важно для формирования специфического подхода в диагностике ранних изменений.

## **1.2 Характеристика действия сероводорода на систему кровообращения**

Показатели функционального состояния элементов системы крови важны, поскольку они координируют все органы и ткани организма. О важности мониторинга количественных характеристик системы крови, формирующих преморбидное состояние у работников зон с повышенным риском лучевого и токсического поражения начали говорить относительно недавно (Антонишкис Ю. А., 2005; Эсаулова Т. А., 2009; Grace M. B. et al., 2005). Вследствие неспецифических изменений органов кроветворения и гематологических показателей на фоне хронического воздействия производственных факторов обсуждается возвращение всестороннего обследования военнослужащих для обнаружения границы предельной формы адаптации перед срывом и клиническими проявлениями, включая безаварийные периоды эксплуатации

оборудования (Захарченко М.П., Щербук Ю. А., 2008; Максимов А. Л., 1994). Сероводород рассматривается в разделе общего токсического экзогенного воздействия, так как нет селективных рецепторов, реализующих последствия его биологического воздействия. Газ способен связываться с гемопротейнами крови, а также без переносчиков проникать в клетки, благодаря чрезвычайной липофильности (Mustafa A. K. et al., 2009).

Локальная концентрация является критическим фактором, который позволяет разделять физиологию и токсикологию  $H_2S$  (Collman J. P. et al., 2009; Petersen L. C., 1977; Reiffenstein. R. J. et al., 1992).

Основной путь поступления сероводорода в организм - легочный. Сероводород не считают ядом с кумулятивным действием из-за его быстрого инактивирования, но во всех органах выявляются продукты его метаболизма, которые в наибольшей степени накапливаются в почках, печени, легких, сердце, мышцах. Благодаря высокой проницаемости через гистогематические барьеры сероводород образует низкорастворимые сульфиды, угнетая ферменты и нарушая кислотно-основное равновесие в структурах печени, головного мозга и легких (Кустов В. В. с соавт., 1975; Бандиан А. Л. с соавт., 1989; Dombkowski R. A. et al., 2004).

Метаболизм сероводорода может происходить различными путями. Один путь связан с окислением в печени ферментом сульфид оксидазой, ведущий к формированию тиосульфата и выведением с мочой (Kangas et al., 1987; Lewis J., 2014). Через другой путь, связанный с металлопротеинами, формируются метантиол и диметилсульфид (Beauchamp et al., 1984; Kimura H., 2011). Основной токсический эффект ССГ направлен на связывание с железом цитохромоксидазы  $aa_3$ , в результате чего происходит блокада митохондриальной дыхательной цепи. Диссеминирует  $H_2S$  далее практически на всех биологических уровнях, главным образом в центральной нервной системе, почках и печени (Feng X. et al., 2013). Неоспоримы данные, указывающие на рост сердечно-сосудистой патологии при экзогенном воздействии сероводородсодержащего газа (Лазько А. Е. с соавт.,

2008; Ярошинская А. П., 2011). Исследования состава загазованной атмосферы вокруг предприятий по добыче и переработке природного газа отмечают преобладающую роль сероводорода (Бариева Б. Ш., 1999; Кабиева А. А., 1999; Кынатбеков Б. Ж., 1999; Бойко В. И. с соавт., 2017).

Различают наличие лёгкой, средней и тяжёлой степеней клинических проявлений последствий бесконтрольных бальнеопроцедур (Кузнецов В. М. с соавт., 1987). Кардиоваскулярная система реагировала при лёгкой степени отравления повышением артериального давления и тахикардией. Жалобы на неприятные ощущения в груди, лабильность артериального давления и пульса характеризовали вторую степень осложнений. Третья, тяжёлая степень экзотоксикоза, проявлялась гипо- и гипертензией, тахи-, и брадикардией. Изменения затрагивали картину крови, представленную повышением протромбинового индекса, лейко- и эритроцитозами, эозинофилией, лимфопенией, повышением СОЭ. Множественные изменения фиксировались на электрокардиограмме в виде понижения вольтажа зубцов, удлинения интервала PQ, расширения комплекса QRS и изменение желудочкового комплекса (Бандиан А. Л. с соавт., 1989; Кузнецов В. М. с соавт., 1987; Стеринсон Л. З. с соавт., 1973).

В НИИ гигиены и профзаболеваний (Уфа) хроническую интоксикацию продуктами сернистой нефти выделили в отдельную нозологическую единицу. Изменения в системе крови характеризуются лейкопенией, тромбоцитопенией, гипергликемией и угнетением окислительно — восстановительных процессов в крови. Описаны изменения в сердце на фоне действия сероводородсодержащего газа в виде вакуольной и зернистой дистрофии вплоть до миокардита и склерозирования сосудистых стенок (Айтбаев Т. Х. с соавт., 1976; Саифуллина С. И. с соавт., 1978).

В различных тканях сероводород влияет и на цАМФ, увеличивая его выработку в клетках мозга и в аорте и ингибируя - в кардиомиоцитах (Kimura, 2000).

Бандиан А. Н. с соавт. (1989) описали клинические проявления отравления

сероводородом, выраженные в расстройстве сердечной деятельности и падением АД, а также состоянии оглушения или возбуждения, обмороках. Сероводород довольно быстро выводится из организма, но метаболические нарушения могут создавать необратимые изменения в системах органов (Даршт, В.В., Воронцов В. А., 1986; Кустов, В. В., Тиунов Л. А., Васильев Г. А., 1975). Так, изучение данных медицинских профилактических осмотров (Эсаулова Т. А., 2009) показало, что с увеличением стажа работников Астраханского ГПЗ увеличивается степень выраженности хронической интоксикации газом, проявляющаяся в нарушении кардиореспираторного резерва. Неспецифические проявления на начальных этапах воздействия газа являются следствием скрытого течения патологического процесса. Хроническая интоксикация в результате повторных воздействий сероводородсодержащего газа в концентрации 75 до 150 мг/м<sup>3</sup> способствует развитию анемии и изменению морфологической картины крови (Бандиан А. Л. с соавт., 1989; Боев В. М., Сетко Н. П., 2001).

Нарушения в работе сердечно-сосудистой системы кроликов в хроническом эксперименте на фоне экзогенного воздействия H<sub>2</sub>S наблюдали Kosmider et al. (1967). На фоне пятидневного воздействия газа в концентрации до 100 мг / м<sup>3</sup> по H<sub>2</sub>S в течение 1,5 и 0,5 часов были выявлены изменения на электрокардиограмме. Регистрировались аритмии и желудочковые экстрасистолы, случаи фибрилляции предсердий. Аритмия сохранялась несколько дней после экспозиции газа. Гистохимическое исследование показало прямое токсическое воздействие на клетки миокарда в виде снижения активности АТФ фосфогидролазной и оксидоредуктазной НАДФ2, приводящее к изменению Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> транспорта и к аритмии. Введение цитрата натрия, комплексообразователя кальция, ослабляло аритмию (Kosmider S. et al., 1967).

Физиологическое воздействие на сердечно-сосудистую систему крыс линии Вистар сероводородсодержащего газа исследовал Kohno M. et al. (1991). Экспонирование животных в газовой среде осуществлялось в концентрации до 105 мг / м<sup>3</sup> по H<sub>2</sub>S в течение 20, 40 и 60 минут. Интересно, что никаких изменений



со стороны артериального давления зафиксировано не было. Наблюдалось снижение частоты сердечных сокращений, а также расстройство в передаче стимула по интервалу P-Q на электрокардиограмме.

Существует представление, что сероводород чувствителен к кислороду и процессы окисления  $H_2S$  внутри клеток зависят от количества  $O_2$ . В ходе серии экспериментов на тканях, сенсорных к кислороду, было дано заключение, что экзогенный сероводород способствует формированию таких же биологических эффектов, что и гипоксия. В обратной зависимости находится работа систем, регулирующих синтез эндогенного  $H_2S$  и содержание  $O_2$ . Не исключено, что активность CSE и продукция  $H_2S$  может быть звеном в цепи реакций на гипоксию, ведущей к вазодилатации (Blackstone E., Roth M. B., 2007).

Имеются данные, что констрикторный механизм работы  $H_2S$  зависит от эндотелия, а также является следствием перекрёстного взаимодействия с NO. В исследованиях на сосудистых тканях крыс инкубирование с донорами оксида азота способствовало росту эндогенного синтеза сероводорода (Geng B. et al., 2004; Teng X. et al., 2008).

В настоящее время эндотелий сосудов, рассматриваемый как крупнейшая железа внутренней секреции, видоизменяет свою функциональную активность в условиях хронической интоксикации  $H_2S$  (Тризно Н. Н. с соавт., 2007). Формируется дисфункция эндотелия (Шишкина Т. А., 2009), изменяющая реологические характеристики крови и увеличивающая содержание прокоагулянтов (Визель М. А., 1982; Фатенков В. Н., 2002; Кравец Е. Б., 2006; Losso et al., 2004). Свойства крови при дисфункции эндотелия изменяются в сторону формирования гиперкоагуляции, а увеличение способности тромбоцитов к адгезии и агрегации создаёт предтромботическое состояние, латентный гиперкоагуляционный синдром и риск тромбообразования. Дисфункция эндотелия формируется и опосредованно через свободнорадикальное окисление и гипоксию смешанного (гемического и тканевого) характера, ацидоз, в результате

полисистемного воздействия сероводородсодержащего газа на живой организм (Беднов И. А., 2004; Мажитова М. В., 2012; Панова Т. Н., 2013).

Перекрёстное взаимодействие между  $H_2S$  и  $NO$  изучалось рядом авторов (Whiteman M. et al., 2006). Известно, что, газообразные посредники сероводород ( $H_2S$ ) и оксид азота ( $NO$ ) синтезируются в организме из L-цистеина и L-аргинина, что было впервые продемонстрировано при инкубации этих соединений вместе. В качестве источника сероводорода служили  $NaHS$ ,  $H_2S$ -donor. Последствием данного эксперимента явилось формирование нитрозотиолов. Для доказательства эндогенного синтеза данного соединения были использованы гомогенаты печени крыс. Была получена возможность измерения (Teng X. et al., 2008) в организме результата взаимодействия газотрансмиттеров. Ещё одним доказательством перекрёстной реакции  $H_2S$  и  $NO$  было высвобождение донором  $HS^-$ -аниона,  $NaHS$ , оксида азота из их совместного комплекса в нитротииоле, что было показано на гомогенатах мозга крыс и мышей. Так как освобождающий эффект был более выражен при pH 8,0, чем 6,0 pH, предположено, что  $HS^-$ , а не  $H_2S$ , отвечает за  $NO$  - реализующий эффект. Следовательно, релаксирующий эффект может быть следствием работы окиси азота после активации его эндогенным сероводородом (Ondrias, K., et al., 2008).

Констрикторное действие в виде увеличения сократительных ответов отмечено при действии низких концентраций  $H_2S$  (10-100 мкМ) на гладкомышечные клетки сосудистой стенки. Описанный эффект связывают с подавлением аденилатциклазы и как следствие, цАМФ-зависимой сигнальной системы. Сероводород отменял расслабляющее действие форсколина, являющегося активатором аденилатциклазы (Webb G. D. et al., 2008).

В исследованиях *in vitro* показано, что в присутствии кислорода в высоких концентрациях сероводород окисляется, и изменение сократительного ответа гладкомышечных клеток опосредуется не самим  $H_2S$ , а его окисленными вазоактивными производными (Koenitzer J. R. et al., 2007).

В организме без сопутствующей патологии на метаболическом уровне

(гипергомоцистеинемия, сахарный диабет) синтезируемый в физиологических дозах  $H_2S$  обеспечивает вазорелаксацию по дополнительному пути, зависящему от эндотелия. Способность сероводорода перекрёстно реагировать и реализовывать высвобождение NO исследована недавно (Murphy M.E., Brayden J.E., 1995).

Имеется точка зрения, что реализуя NO — релаксирующую способность, сам сероводород является вазоконстриктором. Ali M.Y. et al. (2006) показали сосудодпрессорное действие доноров сероводорода, молекул NaHS при смешивании *in vitro* с NO. *In vivo* данный эффект проявлялся гипертензией. Был сделан вывод о противоположном действии сероводорода и окиси азота.

Некоторые исследования показывают, что сероводород способен оказывать расслабляющее действие на стенку кровеносных сосудов, приводя к снижению давления крови. Этот механизм объясняется взаимодействием  $H_2S$  с белками мембран — калиевыми каналами, регулирующими поток  $K^+$ . Открывание газом каналов ведёт к миорелаксации. Имеются прямо противоположное мнение, не дающее достаточных оснований говорить о сероводороде, как об универсальном вазодилататоре. Показано, что сосуды в одинаковой мере реагируют на гипоксию и на  $H_2S$  (Kenneth R. O. et al., 2009).

Высвобождение эндотелиального вазоконстрикторного фактора (EDCF) под действием  $H_2S$  в условиях гипоксии было показано в эксперименте на коронарных артериях собак (Webb G. D. et al., 2008)

Был исследован механизм протромбогенного действия сероводорода у лиц с гиперцистеинемией *in vitro* (Заичко Н.В. с соавт., 2016). На основании известного факта склонности к тромбообразованию у лиц с гипергомоцистеинемией вследствие как повреждения самой сосудистой стенки, так и нарушения в работе отдельных звеньев системы гемостаза (Пентюк О. О. с соавт., 2003; Petras M. et al., 2014). Было выявлено, что увеличение содержания в крови серосодержащего цистеина свыше 200-300 мкмоль/л также провоцировало тромбообразование (Мельник А. В., Пентюк О. О., 2009). Основанием к изучению роли сероводорода в тромбогенных процессах послужило открытие эндогенного происхождения  $H_2S$

из серосодержащих аминокислот. Выяснилось, что в менее выраженной форме цистеин также обладает прокоагулянтным потенциалом и способен повышать активность протромбина и фХ системы гемостаза в присутствии тромбопластина и экомулина более чем в два раза. Эта способность возрастает с увеличением концентрации со 100 до 1000 мкМ цистеина. HS- анион в дозировке 100 мкМ подавлял активность тромбина, но с повышением концентрации до 1000 мкМ увеличивал активность фХ (хотя это не сказывалось на протромбиновом времени в отличие действия цистеина и гомоцистеина). Снижение активности антикоагулянта антитромбина III и чувствительности фV на активированный протеин C наблюдалось под воздействием данных аминокислот, но не HS-аниона. Заичко Н. В. с соавт., (2016) отмечает, что исследуемая концентрация 100 мкМ, при которой отмечался антикоагулянтный эффект *in vitro*, приближен к физиологическому уровню этого иона в организме 70-80 мкмоль/л. Высказано предположение, что изменение данной концентрации при патологических состояниях может способствовать тромбофилии.

По данным Заичко Н. В. с соавт. (2016) значительный эффект доноры HS-аниона *in vitro* оказывают и на агрегацию тромбоцитов. В частности, при оценке ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов укорачивается время агрегации тромбоцитов с  $400,8 \pm 18,0$  с до  $350,0 \pm 30,1$  при максимальной концентрации HS<sup>-</sup>. На фоне этих изменений отмечается снижение степени агрегации тромбоцитов. Статистически значимые изменения в показателях агрегации возникали уже при концентрациях HS<sup>-</sup> 100 мкМ, с увеличением значений концентрации до 1000 мкМ. Так, при концентрации в 100 мкМ скорость колаген-индуцированной агрегации изменилась на 6,5%, а при 1000 мкМ - на 30,9%. Также отмечалось удлинение Лаг-периода на 14,4% при концентрации 1000 мкМ. В целом же авторы заключают, что сероводород обладает широким спектром антиагрегационных эффектов благодаря сравнительно небольшой молекуле аниона и достаточно высокой липофильностью, что, облегчает проникновение его через мембрану тромбоцитов.

Аналогичное исследование, но с разнящимися результатами провели итальянские и английские учёные (D'Emmanuele di Villa Bianca R. et al., 2013). В идентичных условиях *in vitro* в диапазоне концентраций 0,1-100 мкМ донора  $\text{HS}^-$  –  $\text{NaHS}$  и цистеина - получен однонаправленный по механизму протромбогенный эффект. Авторы подчёркивают, что образование эндогенного  $\text{H}_2\text{S}$  происходит в результате переноса серы из гомоцистеина. Базировалась серия экспериментов на известном представлении о склонности к тромбообразованию организма с содержанием гомоцистеина свыше 100 мкМ (гипергомоцистеинемия). Наличие патологии в обмене веществ способствует изменениям физиологической роли  $\text{H}_2\text{S}$  и вовлечению в формирование сердечно-сосудистых заболеваний, таких как гипертония, атеросклероз, сердечная недостаточность (Predmore V. L. et al., 2012). Не стоит забывать о существовании умеренной формы данной патологии у 5-7% людей с повышением уровня гомоцистеина до 50 мкМ и дефицитом CBS фермента. Данная категория лиц составляет группу риска развития венозного тромбоза и инфаркта миокарда. Доноры сероводорода в условиях гипергомоцистеинемии стимулировали агрегацию тромбоцитов через тромбиновые рецепторы тромбоцитов в диапазоне концентраций 0,1 — 100 мкМ, дозозависимо, увеличиваясь по мере роста концентрации. Инкубация с ингибиторами CBS и CSE ферментов подавляла агрегацию пластинок крови. Помимо тромбин-опосредованной агрегации тромбоцитов отмечалась повышение уровня производства тромбоксана  $\text{A}_2$  (Di Minno G. et al., 1993; Coppola A. et al., 2000; Davi G. et al., 2001). Для определения причастности сероводорода к эйкозаноидному пути были применены селективные ингибиторы фосфолипазы, и ЦОГ. Блокада указанных ферментов приводила к снижению агрегации тромбоцитов, вызванной ранее донорами  $\text{HS}^-$  и у здоровых пациентов. Было сделано заключение о способности сероводорода активизировать фосфолипазу  $\text{A}_2$ , провоцируя каскад арахидоновой кислоты как *in vivo*, так и *in vitro* (D'Emmanuele di Villa Bianca R. et al., 2011). При гипергомоцистеинемии риск тромбогенных осложнений происходит за счёт увеличения эндогенного синтеза

сероводорода тромбоцитами, что делает их более чувствительными к эндогенным раздражителям таким, как тромбин, который в здоровом организме не провоцирует агрегацию пластинок крови.

Более подробно влияние сероводорода на тромбоцитарную и сосудистую активность изучали на брыжеечной и почечной микроциркуляции с помощью донора  $\text{HS}^-$  раствора NaHS (D'Emmanuele di Villa Bianca R. et al., 2010). Воздействовали инфузионно раствором на изолированные и перфузируемые мезентериальные сосуды, после чего наблюдали дозозависимый двухфазный эффект: сократительный при дозировке 10 мкМ и дилатационный - при 100 мкМ. Изучение внутриклеточного механизма показало, что  $\text{H}_2\text{S}$  активизирует фосфолипазу  $\text{A}_2$ , которая запускает каскад арахидоновой кислоты. В брыжеечной и почечной микроциркуляции арахидоновая кислота является основным источником NaHS — индуцированных вазоактивных эффектов (Kamata et al., 2006). Арахидоновая кислота действует в качестве вторичного мессенджера и высвобождается из фосфолипидной мембраны в ответ на внеклеточное раздражение фосфолипазой  $\text{A}_2$  (Hirabayashi Y. et al., 2000).  $\text{H}_2\text{S}$  активизирует данный белок через обеспечение поступления  $\text{Ca}^{++}$  во внутреннюю среду клетки (Murakami et al., 2012). Сосудистые эффекты зависят от состояния и области сосуда. Присутствие  $\text{O}_2$  влияет на функционирование аорты крысы на фоне воздействия  $\text{H}_2\text{S}$  (Bhambhani Y., 1996).

Так, под воздействием доноров  $\text{HS}^-$ , (NaHS), тромбоциты пациентов, страдающих сахарным диабетом второго типа *in vitro* демонстрировали более выраженную склонность к коллагениндуцированному тромбообразованию, нежели клетки здоровых пациентов (Петрова И. В. с соавт., 2015). Факторами, влияющими на гиперагрегационные свойства сероводорода, по мнению авторов, являются гипергомоцистеинурия, увеличение содержания ионов  $\text{Ca}^{++}$  во внутренней среде клеток у данной категории больных.

Не получилось избежать системного токсического эффекта сероводорода и при введении газа через экстракорпоральную мембрану

овцам с частичным искусственным кровообращением (Derwall M. et al., 2011). Этот факт доказывает наличие метаболических и вазомоторных системных эффектов воздействия сероводорода у крупных млекопитающих. Степень изменения метаболизма у животных зависит от изначального состояния: понижается при высоком базовом уровне, например у бодрствующих мышей, и почти не изменяется уже в депрессированном состоянии, к примеру, у анестезированных мышей и овец (Kida K. et al., 2011). Характер воздействия высоких доз сероводорода на сердечно-сосудистую систему не исследовался.

Китайские исследователи (Lu Xiaohua et al., 2015) внутривенно вводили доноры  $\text{HS}^-$  аниона, ( $\text{NaHS}$ ) кроликам в виде раствора. Был показан защитный механизм вводимого сероводорода в дозе 3,4 мг/кг от диссеминированного внутрисосудистого синдрома, формируемого после введения тканевого фактора.

Общеизвестно, что в естественных условиях самого организма продуцируется сероводород и основным ферментом источником его является CSE, cystathionine  $\gamma$ -lyase. Естественно проявление интереса к потенциальным физиологическим эффектам сероводородсодержащего газа ( $\text{H}_2\text{S}$ ) в теле человека (Moore P. K., et al., 2003; Wang R., 2003). На данный момент становится все более очевидным, что синтез  $\text{H}_2\text{S}$  в тканях из цистеина встречается повсеместно у большинства млекопитающих преимущественно при участии двух ферментов: cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) и cystathionine  $\beta$ -синтетазы (CBS) (Kamoun P., 2004). Относительно высокие концентрации  $\text{H}_2\text{S}$  (10–100  $\mu\text{M}$ ), были обнаружены в крови крыс и человека и в гомогенатах мозга, почек и печени (Kimura H. et al., 2010). Доказано, что экспрессия фермента происходит в сосудистой стенке гладкомышечными клетками, в отличие от эндотелиальных (Zhao W. et al., 2001). В диапазоне физиологических доз у здоровых людей  $\text{H}_2\text{S}$  оказывает гипотензивное действие путём увеличения тока в калиевых АТФ-зависимых каналах (Cheng Y. et al., 2004; Murphy M.E., Brayden J.E., 1995) и *in vitro* вызывая

гиперполяризацию гладкомышечных васкулярных клеток (Fiorucci S. et al., 2006). Данный механизм действия газа имеет и блокатор данных каналов, глибенкломид, провоцируя гипертензию (Zhao W. et al., 2001).

Появились сведения о влиянии сероводорода на  $Ca^{++}$  - каналы, следствием которого является проникновение ионов кальция во внутриклеточную среду (Gu Y., Shi S., 2016; Hou S. et al., 2009).

Имеются данные о гипотензивном действии эндогенного сероводорода в относительно низких дозах (10 - 100 мМ) у крыс и в человеческой крови, в гомогенатах мозга, почек и печени. В физиологических концентрациях  $H_2S$  снижает кровяное давление у анестезированной крыс и приводит к дозозависимой релаксации изолированной аорты животного (Zhao et al., 2001) и брыжеечных сосудов артериол (Tsubota M. et al., 2014; Cheng Y. et al., 2004). Реализация гипотензивного эффекта на гладкомышечные клетки сосудов осуществляется по одной версии через K-АТФ каналы (Wallace J. L. et al., 2015; Zhao et al., 2002), по другой - через дополнительный механизм K-АТФ-независимый (Teague B., 2002).

Таким образом, увеличение количества работ, посвященных изучению воздействия сероводорода на сердечно-сосудистую систему по всему миру говорит о неоднозначности современных взглядов на данный механизм и свидетельствует о необходимости углубления представлений об изменении функционирования системы крови. В частности, отсутствуют работы по изучению воздействия сероводорода в составе естественного природного токсиканта — промышленного газа - на систему гемостаза и фибринолиза в хроническом эксперименте *in vivo*. Определение сущности реагирования параметров гемостатической и фибринолитической систем в условиях хронического воздействия газового поллютанта важно для понимания механизма разбалансировки системы гемостаза и формирования специфического подхода в диагностике ранних изменений в целостном организме.



### 1.3 Современные аспекты профилактики тромбообразования

На текущий период времени в антитромботической терапии повсеместно используются три класса средств: дезагреганты, антикоагулянты и тромболитики (Аронов Д. М., 2004; Атрощенко Е. С., 2006). Дезагреганты (ацетилсалициловая кислота (АСК), клопидогрель, дипиридамол и др.) понижают функциональную активность тромбоцитов. Механизм действия данных средств связан с нарушением метаболизма арахидоновой кислоты и ингибированием агрегационных эффектов, вызываемых продуктом данной цепи реакций - тромбоксаном А<sub>2</sub> (АСК), блокадой АДФ — рецепторов (клопидогрель) или нейтрализацией П<sub>2</sub>У<sub>1</sub> рецепторов тромбоцитов (эптифибатид). С точки зрения доказательной медицины и оптимального режима наибольший спектр применения у ацетилсалициловой кислоты. Так, АСК является единственным антитромбоцитарным средством, для которого была продемонстрирована эффективность применения для профилактики тромбозов глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии (Awry E. H., 2007; Collier B. et al., 2001). Целесообразно применение АСК как при остром коронарном синдроме, так и для профилактики первичных / вторичных кардиоваскулярных осложнений (Елисеев Р. Н., Мирошниченко С. И., 2011; Крыжановский С., Шмырев В., 2011; Яковлев А. Н., 2015). На сегодняшний день расширены представления о механизме действия АСК. В частности, путем инициации синтеза 15 — эпипроксина А<sub>4</sub> тромбоцитами и лейкоцитами опосредует активацию эндотелиальной и индуцибельной NO - синтазы, увеличивая производство метаболитов оксида азота (Цепелев В. Ю. С соавт., 2009; Gilroy D. W., 2005).

В условиях стационара в качестве средств экстренной помощи, например восстановления коронарного кровотока, применяют тромболитический класс препаратов (альтеплаза, стрептокиназа). Механизм действия данных средств основан на активации главного фермента фибринолитической системы — пламина. Подобная терапия требует тщательного контроля:

коронароангиографии, ЭКГ, биохимического анализа крови. Однако, после реперфузии крупных артерий не всегда возможно восстановление микроциркуляции в ишемической зоне. Тромболитические препараты не предупреждают тромбообразование и могут активировать тромбин и агрегацию пластинок крови, спровоцировать аллергическую реакцию (Барбараш О. Л. с соавт. 2014; Константинова Е. В. с соавт., 2015).

Третий класс препаратов, антикоагулянты, препятствует формированию сгустков на плазматическом уровне. Для ключевой пептидазы тромбина созданы два класса препаратов — прямые и непрямые ингибиторы. Среди прямых антикоагулянтов широкое распространение получил гепарин с производными, снижающий функционирование тромбина только в присутствии дополнительных кофакторов плазмы (антитромбин III), воздействующий на несколько звеньев системы гемостаза (включая тромбоциты) и гирудин с его синтетическими аналогами (Topol E. et al., 1994), нейтрализующие тромбин посредством связи его активного центра. Имеется ряд ограничений для применения данных групп препаратов, например такие, как анемия, геморрагические диатезы, гипотония, аллергия. Гепарин активно применяется с антитромботической целью в терапии, но недостатком является вероятность возникновения тромбоцитопении и гипотонии и гиперагрегации тромбоцитов. Медленное и трудноконтролируемое выведение из системного кровотока может вызывать геморрагии, особенно у пожилых лиц и имеющих патологию почек, печени. Имеет место риск повышенного иммунного ответа. Тромбин, активированный по внешнему пути, стимулирует агрегированные тромбоциты на экспрессию рецепторов для адсорбирования фХа, что делает его невидимым для антитромбина III, сильнейшего антикоагулянта. Таким образом, становится возможной дальнейшая организация тромба уже на плазменном уровне (Добровольский А.Б, Титаева Е. В., 2009). Существует необходимость контроля времени начала действия непрямых антикоагулянтов (Варфарин), работающих на уровне печени и зависящих от наличия в кровотоке активных форм факторов гемостаза. Опасны

рецидивы тромбоза после отмены длительного приёма препаратов данной группы. Обязателен контроль международного нормализованного отношения при приеме данного класса препаратов (Беленкова Ю. Н., Оганова Р. Г., 2008; Машковский М. Д., 2006; Скворцова В. И, Стаховская Л. В., 2009; Портнягина Е. В., 2011).

Появление пероральных антикоагулянтов (Дабигатран, Ривароксабан) не изменили кардинально терапевтическую тактику. С 2010 года накопилось много сведений, влияющих на показания данных средств, что нашло свое отражение в обновлении рекомендаций по профилактике тромбоэмболий ESC 2012 г. и 2016 г. Так, не рекомендуется монотерапия антиагрегантами для профилактики инсульта: у пациентов с фибрилляцией предсердий вне зависимости от риска инсульта (Шубик Ю. В., 2017). Терапевтически обоснованным является сочетание препаратов для контролирования реакций системы гемостаза, воздействующая на два звена: коагуляционное (плазменное) и тромбоцитарное.

Востребованными становятся фармакологические средства, получаемые при помощи современных биотехнологий (Gibaldi M. et al. 2003), - биофармацевтики - биотехнологические продукты с фармацевтическими свойствами. Популярность набирают так называемые аптамеры (Bouchard P. R., et al., 2010; Ellington A. D., Szostak J.W., 1990).

Аптамеры (от лат. *aptus* - подходить) - одноцепочечные молекулы РНК и ДНК, обладающие способностью целенаправленно узнавать определенные соединения, так как обладают соответствующим молекулярным строением. Селекционные *in vitro* методы позволяют задавать необходимые свойства нуклеиновым кислотам. Применяя комбинаторный скрининг имеющихся библиотек нуклеиновых кислот (SELEX) *in vitro* (Fang X., Tan W., 2010; Ellington A.D., Szostak J.W., 1990) и *in vivo* (Mi J. et al., 2010) позволяет находить высокоафинные соединения, а впоследствии - конструировать участки нуклеиновых кислот технологическим путём для заданной биомолекулы - мишени. Сочетание качеств, присущих низко- и высомолекулярным структурам белковой природы, позволяет получить соединения, аналогичные

моноклональным антителам. Преимущества нуклеиновых кислот перед последними заключаются в отсутствии аллергической реакции в ответ на поступление их в организм. Технологичное получение аптамеров значительно проще, дешевле и быстрее, особенно при наличии необходимой комбинаторной библиотеки (Tuerk C., Gold L., 1990), а меньший размер (от 30 до 100 нуклеотидов) повышает проникающую способность в ткани и клетки. Лабораторные условия позволяют синтезировать фрагменты нуклеиновых кислот с заданными параметрами и необходимой аффинностью и специфичностью.

На базе накопленных исследований была выдвинута теория мира РНК («The RNA world theory») (Gilbert W., 1986; Gold L. et al., 2012). Согласно положениям данной теории, нуклеиновым кислотам под силу реализовывать разнообразные биологические функции и каталические реакции со времён зарождения жизни.

Диапазон применения аптамеров достаточно широк и применим при исследованиях, диагностике и лечении. Например, в качестве распознающих агентов, биосенсоров. В некоторых случаях в 100 раз меньший размер аптамеров по сравнению с антителами уменьшает и площадь их размещения, например, меньшее количество сыворотки крови при детекции биомаркёров. Сохранение чувствительности, благодаря де- и ренатурации, позволяет использовать биочипы множество раз.

В лечении новообразований конъюгация аптамеров с липосомами позволяет направленно доставлять лекарственные средства в опухолевые клетки (Cho E.J., Lee J-W., 2009; Farokhzad O. C. et al., 2004; McNamara J. O. et al., 2006), а также имеются аптамеры непосредственно к определенным типам раковых клеток (Замай Г. С. с соавт., 2012; Chen H.W., Medley C.D., et al., 2008; Takao K. et al., 2011).

В области инфекционных заболеваний и микробиологии аптамеры используются для мониторинга и терапии инфекционных заболеваний, бактериальных токсинов и факторов вирулентности в окружающей среде, например, в питьевой воде. В данном направлении определены

преимущественные группы исследований: синтез аптамеров, способных связываться с продуктами жизнедеятельности, факторами вирулентности и индивидуальными участками молекул бактерий, узнающих целостные клетки бактерий, а также создание качественно новых способов детекции на базе уже выведенных аптамеров (Bruno J. G., Kiel J. L., 1999; Cao X. et al., 2009; Ikanovic M. et al., 2007; Tok J. B., Fischer N. O., 2008; Qin L., 2009).

С развитием нанотехнологических направлений в практической медицине одним из перспективных подходов стало применение аптамеров для диагностики и лечения ряда заболеваний. Малые размеры частей нуклеиновых кислот увеличивают их проникающую способность. Прикрепление наночастиц к химически активным группам аптамеров осуществляется ковалентно в условиях лаборатории, что определяет преимущество аптамеров перед естественными антителами. Вместо наночастиц можно прикреплять лекарственные средства для направленной доставки к месту назначения - *targeting ligands*. Как пример, первым для этой цели был аптамер A10, узнающий простато-специфичный антиген мембраны (PSMA), экспрессируемый при раке простаты (Farokhzad O. S. et al., 2004; McNamara J. O. et al., 2006).

В клинической практике перспективно создание аптамерных биосенсоров, чипов, что даст возможность одновременно обнаруживать больше белков и значительно расширит возможности диагностирования патологических состояний (Block L. C. et al., 1992; Tidmarch G. F. et al., 1993; Lee J.-O. et al., 2008; Strehlitz D. et al., 2008; Tombelli S. et al., 2008; Keefe A. D., 2010).

В настоящее время в практической медицине официально применяется Регартаниб, или Macugen. Это аптамер, принцип работы которого заключается в блокировке развития аномальных сосудов кровеносной системы глаза путём связывания с фактором роста эндотелиальных клеток. Следствием работы препарата является исключение геморрагий и сохранение зрения (Siddiqui M.A., Keating G.M., 2005).

Специфичность аптамеров распространяется на различные структурные

качественные состояния одного белка. Создаются аптамеры, узнающие амилоидные фибриллы и отличные по специфичности амилоидогенные белки. Например, в арсенале учёных есть нуклеиновые кислоты, подходящие к растворимому типу прионного белка PrP (Sekiya S. et al., 2006; Ogasawara D. et al., 2007).

Учитывая ключевое значение для гемокоагуляции тромбина, актуально создание ингибиторов данной сериновой протеиназы. Несмотря на то, что тромбин не обладает способностью связывать нуклеиновые кислоты, методом SELEX был получен аптамер непосредственно для тромбина (Bock, 1992; Мазуров А. В., 2008). Впервые исследовано изменение гемостазиологического профиля на фоне воздействия аптамеров ингибиторов тромбина (thrombin-binding aptamer) по активированному частичному тромбопластиновому времени, протромбиновому времени, тромбиновому времени и даны рекомендации по использованию аптамеров в терапии тромбозов (Спиридонова В. А. с соавт., 2008) (рисунок 3).

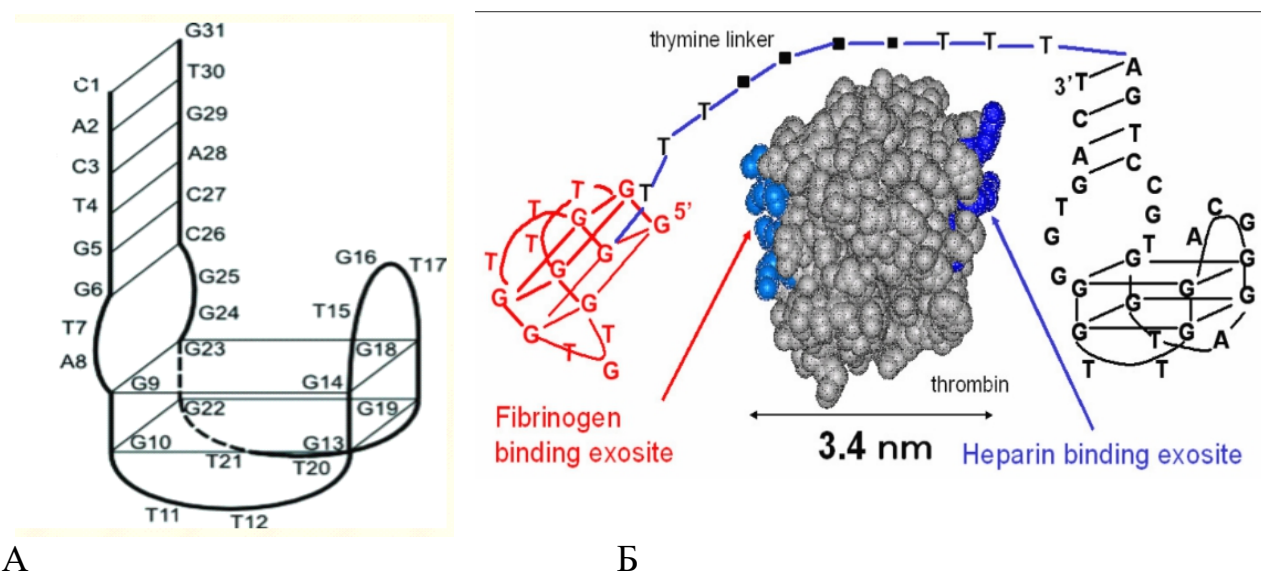


Рисунок 3. Молекулярный дизайн G-квадруплекс – содержащего ДНК аптамера (31 ТВА ингибитор тромбина) и динамика взаимодействия с тромбином (А: по Завьялова Е. Г. с соавт., 2009; Б: Hasegawa H. et al., 2008 /Mdpi. Com/).

Данный вид аптамеров представляет собой участки нуклеиновых кислот, способные связываться с тромбином непосредственно в фибриноген-связывающей области (Padmanabhan K., 1993; Schultze P., 1994; Tsiang M., 1995).

После получения 15ТВА аптамера повсеместно в лабораториях (Копылов А. М., Спиридонова В. А., 2009; Ikebukuro K., 2005) параллельно велись работы по конструированию улучшенных форм, способных циркулировать в кровотоке более длительное время, в отличие от пятиминутного периода выведения 15ТВА. Учитывая структуру, найденную в природных объектах (Wang C., 2016; Lipps H., 2009), были получены аптамеры 31ТВА, SG50, SG51, SG52, SG53, SG54, SG55, RE31 и ST43.

Блокирование ДНК-аптамерами эпитопов (участков) белка происходит даже в том случае, когда связывание с фибрином уже сформировалось (Linkins et al., 2005; Lunse C. E. et al., 2010; Arcand M. et al., 2010).

Как следствие положительного подавляющего действия на тромбин были обнаружены гипоагрегационные свойства аптамера в результате подавления тромбин-индуцирующего воздействия сериновой протеазы на PAR-1-рецепторы тромбоцитов (Мазуров А. В., 2008; Копылов А. М., Спиридонова В. А., 2009).

Непосредственно организацию тромба на открытом сосуде у мышей наблюдали после введения РНК-аптамера к фактору фон Виллебранда в сонной артерии, после чего регистрировали замедление скорости образования тромба (Rusconi et al., 2004; Nimjee et al., 2012).

На овцах изучали гипокоагулирующие возможности 15ТВА к тромбину на модели экстракорпоральной циркуляции и шунтирования легочной артерии. Наблюдали увеличение протромбинового времени с 21,7 секунд до 40-45 секунд (Li W. X., Kaplan A.V., Grant G.W., Toole J. J., Leung L. L. K., 1994; Reyderman L., Stavchansky S., 1998).

Для более подробного количественного анализа механизма взаимодействия звеньев гемостаза применим способ *in vitro*, то есть в крови у животных после введения аптамеров исследуются параметры плазмы с помощью коагуляционных

тестов. Данный подход использовался DeAnda et al. (1994). Беспородным собакам инфузионно в течение  $37 \pm 3$  минут инфузионно вводился ДНК-аптамер к тромбину. На отобранных образцах плазмы регистрировали гипокоагуляционное действие нуклеотидной последовательности через активированное частичное тромбопластиновое, протромбиновое и тромбиновое временные параметры.

Макаки-крабоеды использовались для исследования антитромбогенного действия РНК-аптамера к фактору фон Виллебранда (Dieneret et al., 2009) с применением постоянного электрического тока на модели внутриартериального формирования стеноза, а также - ДНК-аптамера к тромбину (Griffin et al., 1993; Boncler M. A. et al., 2001). В головную вену инфузионно вводился аптамер и забиралась кровь для последующих проб из подкожной вены. Диагностировалось снижение коагуляционного потенциала плазмы.

Высокая специфичность аптамеров, полученных к тромбину человека в предклинических испытаниях определяет слабое связывание с пептидазой животного (белки — ортологи). Преодолевают данную трудность “toggle” подход, при котором используется в процессе селекции смесь белков человека и свиньи (Jeter M.L. et al., 2004; White R. et al., 2001). Гипоагрегационную функцию аптамера к тромбину наблюдали в эксперименте на свиной крови (Jeter M. L. et al., 2004). После подавления функционирования тромбина нивелируется и активация PAR-1 рецепторов тромбоцитов сериновой протеазой (Griffin L.C. et al., 1993).

Описанный спектр положительных характеристик аптамеров ставит их на приоритетное место среди существующих антикоагулянтов с дальнейшей перспективой создания на их основе высокоэффективных фармакологических средств.



## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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.

Перед началом эксперимента животных содержали на карантине в течение трёх недель. После проведения обязательного обследования подозрительных на заболевания особей выбраковывали (Лоскутова З. Ф., 1980). В условиях кафедрального вивария однополые животные находились в просторных клетках по 9-10 особей на стандартном рационе (Западнюк И. П., 1983; Каркищенко Н. Н. с соавт., 2010), со свободным доступом к воде и пище. В помещении поддерживалась температура воздуха от 18 до 24°C) и естественное освещение. Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных или иных научных целях (Страсбург, 1986), а также «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ и СР РФ № 708н от 23.08.2010 г.).

Хроническое воздействие сероводородсодержащего газа моделировалось согласно гигиеническим нормам к требованию выполнения и воспроизведения эксперимента (Токсикометрия химических веществ, 1986; Онищенко Г. Г. с соавт., 2011) ингаляцией контролируемой газовой смесью воздуха с сероводородсодержащим газом в концентрации  $80 \text{ мг/м}^3$  по  $\text{H}_2\text{S}$  (Измеров Н. Ф. с соавт., 1977). Ингаляционные затравки животных осуществлялись в специализированных камерах объёмом 200 литров производства Московского института профзаболеваний и гигиены труда имени Эрисмана. Концентрацию сероводорода в используемых воздушно-газовых смесях определяли с помощью индикаторных трубок фирмы «Auer» - Berlin (West), Bestell – Nummer 5085 – 826. В камере во время проведения эксперимента поддерживался микроклимат: температура в пределах:  $+ 25^0 \text{ C}$  и влажность — 65% в начале опыта.

Экспериментальные исследования проводились в осенне-зимний период для исключения влияния сезонных ритмов (Хачатурьян М.Л. с соавт., 1995, 1999; Сидоров П. И., 2002). Каждой опытной группе соответствовала контрольная группа, которая помещалась в камеру на то же время, но с обычным составом газовой среды (Саноцкий И. В., 1970) (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)  (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

Модель экспериментальной хронической интоксикации на животных создавали путем помещения их в атмосферу  $H_2S$  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 три опытные группы по 15 крыс в каждой (№5, №6, №7). Период и условия пребывания в камерах с  $H_2S$  соответствовали опытной группе №4 (4 месяца). Десять последних суток животным группы №5 вводили ацетилсалициловую кислоту (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.

Для сравнения показателей крови крыс, использованных в данном эксперименте с имеющимися литературными данными была создана контрольная группа (10 особей), референтные значения которой приведены в таблице 2. Полученные результаты соответствовали физиологическим нормам (Алипов Н. Н., 2013; Бурмистров Е. Н., 2002; Долгов В. В. с соавт., 2012).

По окончании срока затравки у животных под общим наркозом (тиопентал натрия: 40 мг на 1 кг веса) (Батрак Г.Е., Кудрин А.Н., 1979) забирали кровь из нижней полой вены в объёме 4-5 мл в одноразовые инсулиновые шприцы содержащие в соотношении 5,5-водный цитрат натрия в концентрации 3,8% (0,11 М). Через 5 минут после инъекции препарата у фиксированных к малому операционному столику крыс для определения степени наркотизации оценивали сохранность корнеального рефлекса приложением ватной пуховки к роговице.

При отсутствии смыкания века производили вскрытие брюшной полости.

Таблица 2

## Показатели состояния системы гемостаза и эндотелия у интактных крыс

Показатели	М	±s
ЦЭК, х 10 <sup>4</sup> /л	3,7	0,21
НО, мкМ/л	31,2	1,05
Тромбоциты, х 10 <sup>9</sup> /л	765	9,7
САТ, %	16,1	0,41
ИАТ, %	100	4,51
КВ, сек	71,8	0,80
АЧТВ, сек	23,9	0,71
ПВ, сек	13,1	0,69
ТВ, сек	23,0	0,71
ЭВ, сек	24,1	0,65
ПС, Ед	0,7	0,06
РФМК, мг/100 мл	3,3	0,22
D-димер, особи	abs	-
XIIa-ЭЛ, мин	7,4	0,29
ИАП-1, Ед/мл	2,6	0,19

Примечание: М — среднее по выборке; ±s — стандартное отклонение.

После выделения нижней полой вены кровь забирали в одноразовую пластиковую лабораторную посуду для центрифугирования и получения богатой и бедной тромбоцитами плазмы. Все манипуляции проводились с учетом международных стандартов по клинической лабораторной диагностике NCCLS: H21-A2 1991 [[www.nccls.org](http://www.nccls.org)].

Богатую тромбоцитами плазму крови получали при режиме центрифугирования 1000 об./мин, на протяжении 7 минут. Данную плазму использовали для оценки тромбоцитарного звена гемостаза. Для оценки плазменного звена гемостаза и фибринолитической системы далее плазму подвергали центрифугированию в течение 15 минут при скорости 3000 об./мин (Баркаган З. С, Момот А. П., 1999, 2001). После этого кровь помещали в

центрифужные градуированные пробирки с крышками (Долгов В. В., Свирин П. В., 2005). В результате получали бедную тромбоцитами плазму. С помощью дополнительного визуального контроля пробирки с гемолизом выбраковывали. Готовые образцы плазмы использовали в эксперименте не позже полутора часов после их получения (Бокарёв И. Н., 2011).

### **Исследование тромбоцитарного звена гемостаза**

Оценку тромбоцитарного звена гемостаза проводили с помощью микроскопического метода подсчёта в счётной камере Горяева с применением 1% водного раствора оксалата аммония. Для получения раствора крови с разведением в 200 раз в пробирке смешивали 0,02 мл венозной крови и 4 мл оксалата аммония.

Спонтанная агрегация тромбоцитов проводилась по методам Тарасова Н. И. (1982), Баркаган З. С. с соавт. (2008).

Кровь из нижней полой вены в объеме 0,5 мл помещалась в две пластиковые одноразовые пробирки, одну из которых (№1) встряхивали на установке АВУ — бс (Россия) в течение 3 минут с частотой 95 раз в минуту с последующим добавлением 1 мл ЭДТА - формалинового раствора. В другую пробирку (№2) к 0,5 мл крови добавляли 1 мл ЭДТА — раствора. Содержимое пробирок тщательно перемешивали, отстаивали 30 минут при комнатной температуре. Подсчет количества тромбоцитов производили в двух камерах Горяева, в которые помещали полученный после отстаивания супернатант (0,02 мл), смешанный с 1% оксалатом аммония (1,98 мл) фазовоконтрастным методом.

Спонтанную агрегацию тромбоцитов рассчитывали по формуле:

$$\frac{A - B}{A} \times 100 \%,$$

где: А — количество тромбоцитов в крови из пробирки №2, В — количество тромбоцитов в крови из пробирки №1.

Время индуцированной агрегации тромбоцитов и степени агрегации на стекле с УИА, в % (Агрескин – тест); В качестве индуктора агрегации

использовали точно дозируемый в лунках планшета гемолизат эритроцитов из диагностикума «Агрескрин-тест» фирмы «Технология-Стандарт» (Россия) (АДФ-индуцируемая агрегация). Определение времени визуальной агрегации тромбоцитов проводили на сухом обезжиренном стекле после смешивания 0,1 мл исследуемой богатой тромбоцитами плазмы и 0,1 мл рабочего раствора гемолизата эритроцитов в проходящем свете от подсветки для микроскопа типа ОИ-19 с использованием матового стекла. Степень агрегации определяли при помощи таблицы с имеющимися значениями времени агрегации в контрольной нормальной плазме, выраженной в секундах в сравнении со временем полученной плазмы крыс и выраженной в % («Агрескрин-тест» фирмы «Технология-Стандарт», Россия).

#### **Оценка уровня метаболитов оксида азота**

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 ( $VCl_3$ ) (Метельская В. А., Гуманова Н. Г., 2005).

После получения серии растворов 1М  $NaNO_2$  (10 пробирок по 0,7 мл  $NaNO_2$  соответствующих концентраций) определяли оптическую плотность каждого разведения нитритов на длине волны 540 нм и строили калибровочный график.

Количество суммарных метаболитов NO определяли в депротенизированной плазме путем добавления двукратного избытка этилового спирта (96<sup>0</sup>) с последующим центрифугированием в течение 20 минут при 3000 оборотах в минуту. Количество нитрит-ионов ( $NO^{2-}$ ) детектировали, смешивая полученный супернатант с реактивом Грисса и хлоридом ванадия в соотношении 1:1:1, инкубировали при 37<sup>0</sup> - 30 минут. Расчет нитрит-ионов производился по оптической плотности (при 540 нм) на калибровочном графике и выражался в мкмоль. Ввиду чувствительности реактива Грисса только к  $NO^{2-}$ , для получения значения суммарных NO-метаболитов, применялся  $VCl_3$ , способный переводить

нитрат-ионы в нитриты.

### **Оценка состояния внутреннего пути плазменного гемостаза**

Активированное парциальное (частичное) тромбопластиновое время (АПТВ/АЧТВ) определяли по Caenetal et al. (1968) с использованием легкой фракции каолина и частичного тромбопластина (кефалина). Для определения каолинового времени (КВ) использовали реактивы фирмы «Технология стандарт» (Барнаул). В эпиндорфе смешивали 0,1 мл бедной тромбоцитами плазмы и 0,1 мл АПТВ - реагента. После прогрева на водяной бане в течение трёх минут при 37<sup>0</sup>С смешивали с 0,1 мл раствором хлорида кальция. С помощью секундомера определяли время показателя. Тест чувствителен к дефициту факторов плазмы, участвующих в образовании протромбиназы крови по внутреннему механизму и к увеличению содержания антикоагулянтов.

### **Оценка состояния внешнего пути активации коагуляционного гемостаза**

Протромбиновое время свертывания цитратной бедной тромбоцитами плазмы определяли по Quick (1935) с тромбопластином фирмы «Технология-Стандарт» (Техпластин<sup>ТМ</sup> (тромбопластин-кальциевая смесь из фосфолипидов мозга человека)), стандартизированным по международному индексу чувствительности (ISI =1,1-1,2).

### **Оценка конечного этапа образования фибринового сгустка**

Определяли состояние:

а) Тромбинового времени (ТВ), с использованием наборов «Тромбин – тест» тест-систем фирмы «Ренам НПО», (Россия).

Активность рабочего раствора тромбина (6-8 ед. НИИ), используемого в работе, на нормальной пулированной лиофилизированно высушенной плазме человека составляла 11-12 секунд.

б) Эхитоксового времени (ЭВ) - время свертывания с ядом змеи Эфы многочешуйчатой (*Echis multisquamatus*). Эхитоксовый тест по Цыпкиной Л. П. с соавт., (1977) проводили с помощью набора «Эхитокс», фирмы «Технология-

Стандарт» (Россия).

Активность рабочего раствора яда эфы, используемого в работе, на нормальной пулированной лиофилизированно высушенной плазме человека составляла 26-27 секунд.

### **Оценка состояния противосвёртывающей системы**

Исследовали активность естественных антикоагулянтов системы протеина С с помощью «Парус-теста», фирмы «Технология-Стандарт» (Россия). Активность параметра выражалась в Ед Нормализованного отношения, рассчитанного по формуле :

$$НО = (C(1) \times B(2) / B(1) \times C(2)) \times k,$$

где С(1) и С(2) - время свёртывания в контрольной плазме с добавлением дистиллированной воды(С1) и активатора протеина С (С2); Б(1) и Б (2) — время свёртывания в плазме животных с добавлением дистиллированной воды (Б1) и активатора протеина С (Б2),  $k$  — нормирующий коэффициент (0,90).

### **Оценка состояния фибринолитического звена гемостаза**

XIIa-зависимый эуглобиновый лизис определяли с помощью «Фибринолиз-теста», для разграничения нарушений в нарушении активности фХII, прекалликреина, ВМК и плазминогена была использована стрептокиназа в виде рабочего раствора в концентрации 330 МЕ/мл («Технология — стандарт», Барнаул).

Активность ингибитора активатора плазминогена (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.

### **Определение маркёров тромбинемии**

Производили оценку следующих параметров:

а) Содержание в плазме растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) с помощью набора «РФМК – тест» фирмы «Технология — стандарт» (Россия). Рабочий раствор тромбина с необходимой активностью смешивали в полистироловой пробирке в соотношении: 1 объем маточного раствора тромбина с



10-13 объемами рабочего раствора буфера трис-HCl. Получали рабочий раствор тромбина после добавления к нормальной пулированной крысиной плазме активностью 22-25 с.

б) Выявление D-димера в плазме проводили с помощью D-Dimer-test (D-Dimer-CHECK-1), иммунохроматографическим экспресс-тестом, фирмы «BioMerieux».

### **Оценка степени повреждения эндотелия**

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

Сразу после забора из нижней полой вены кровь в одноразовых пластиковых пробирках с цитратом натрия (3,8%, в соотношении 1:9) центрифугировали 10 минут со скоростью 1000 оборотов в минуту. Затем 1мл получившейся богатой тромбоцитами плазмы смешивали с 0,2 мл АДФ (НПО «Ренам», Москва) до достижения концентрации 1мг/мл. После аккуратного перемешивания в течение 10 минут пробирку помещали в центрифугу и в прежнем режиме удаляли агрегаты тромбоцитов. Полученный супернатант в другой чистой пробирке центрифугировали 15 минут при 1500 оборотах в минуту для осаждения эндотелиальных клеток. После удаления надосадочной плазмы полученный осадок суспендировали в 0,1 мл физиологического раствора натрия хлорида. Подсчет эндотелиоцитов осуществляли методом световой микроскопии (при увеличении 10x20) после заполнения полученной суспензией камеры Горяева. Результат умножали на  $10^4/л$ .

### **Статистическая обработка экспериментальных данных**

Все цифровые данные, полученные в ходе исследования, подвергали статистической обработке с определением показателей вариационного анализа: среднюю арифметическую (M), стандартное отклонение (s). Учитывая, что распределение в группах данного исследования было нормальным, достоверность различий исследуемых выборочных данных определяли при помощи критерия

Стьюдента ( $t$ ) для неравных дисперсий (отклонений). Проводили корреляционный анализ по Пирсону ( $R$ ) (Гланц С., 1999). Результат расчета корреляционной связи между исследуемыми показателями представлен в виде  $r$ . Сильной корреляционная связь признавалась при  $r = 0,8 — 1,0$ , средней — при  $0,6 < r < 0,8$  и слабой — при  $r < 0,4$ .

Различия считали значимыми при уровне статистической значимости  $p < 0,05$  (Реброва О. Ю., 2000).

При статистической обработке была использована утилита 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).

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1 Изменения гематологических показателей через месяц хронического воздействия сероводородсодержащего газа

В результате полученных данных, представленных в таблице 3, после одного месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа, было выявлено увеличение содержания суммарных  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  метаболитов оксида азота (NO) на 79,1% ( $p < 0,05$ ), что говорит об активации эндотелиальной NO-синтазы, определяющей базальный уровень данного соединения и дисфункциональной активности эндотелия (Ивашкин В. Т., Драпкина О. М., 2011; Каминская Г. О., 2004).

Таблица 3

Показатели параметров системы гемостаза и эндотелия через 1 месяц воздействия сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду),  $M \pm s$

Показатели	Контроль	Опыт №1	P
ЦЭК, х 10 <sup>4</sup> /л	3,8±0,20 (n=5)	4,3±0,38 (n=5)	P>0,05
NO, мкМ/л	31,1±1,01 (n=5)	55,7±0,46 (n=5)	P<0,05
Тромбоциты х 10 <sup>9</sup> /л	760±11,15 (n=10)	749±11,77 (n=12)	P>0,05
САТ, %	16,5±0,46 (n=5)	6,9±0,27 (n=5)	P<0,05
ИАТ, %	100±4,90 (n=10)	78±9,25 (n=12)	P<0,01

Примечание: p — уровень статистической значимости по сравнению с контрольной группой.

На уровне тромбоцитарно-сосудистого звена системы гемостаза было отмечено увеличение показателя индуцированной агрегации тромбоцитов (ИАТ) на 23,2%, с  $18,1 \pm 0,52$  секунд в контрольной группе до  $22,3 \pm 0,56$  секунд в опытной группе ( $P < 0,01$ ). Уровень спонтанной агрегации (САТ) пластинок крови понизился на 58,2% ( $P < 0,05$ ), что говорит об уменьшении функциональной активности тромбоцитов (рисунок 4).

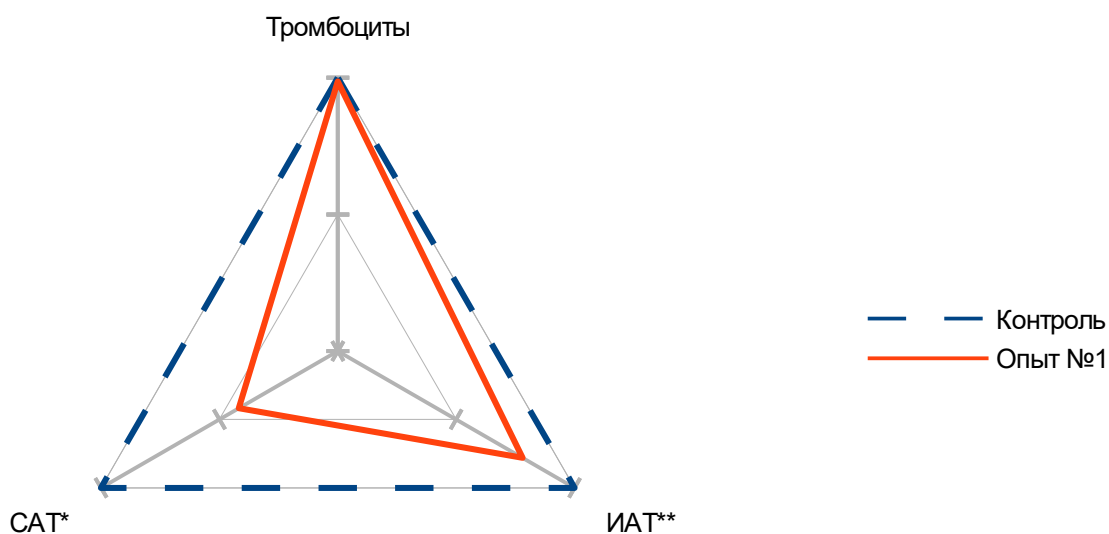


Рисунок 4. Показатели числа и функциональной активности тромбоцитов после 1 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду)

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

Состояние коагуляционного звена гемостаза было исследовано по показателям, представленным в таблице 4. Отмечалось замедление образования фибринового сгустка по внутреннему механизму свёртывания, что проявилось

возрастанием каолинового времени (КВ) на 17,2% ( $p<0,01$ ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) — на 15,8% ( $p<0,01$ ).

Таблица 4

Состояние плазменных компонентов свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем крыс после 1 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду),  $M\pm s$

Параметры	Контроль (n=10)	Опыт №1 (n=12)	P
КВ, сек	72,0±0,82	84,4±1,00	P<0,01
АЧТВ, сек	24,1±0,74	27,9±0,67	P<0,01
ПВ, сек	13,5±0,71	15,1±0,67	P<0,01
ТВ, сек	23,1±0,74	25,9±0,67	P<0,01
ЭВ, сек	24,3±0,67	28,0±0,74	P<0,01
ПС, Ед	0,7±0,07	0,95±0,24	P<0,05
РФМК, мг/100 мл	3,3±0,26	3,3±0,26	P>0,05
D-Димер, особи	abs	abs	-
фХПа-ЭЛ, мин	7,6±0,32	6,5±0,41	P<0,01
ИАП-1, Ед/мл	2,7±0,21	2,7±0,23	P>0,05

Примечание: p — уровень статистической значимости показателей при сравнении с контрольной группой.

Состояние внешнего пути активации системы коагуляции оценивалось по протромбиновому времени (ПВ), которое увеличилось на 11,9% ( $p<0,01$ ). Показатели конечного этапа фибринообразования также возросли. Так, тромбиновое время замедлилось по сравнению с контрольной группой на 12,1% ( $p<0,01$ ). Наряду с тромбиновым, показательным тестом активности тромбина является определение эхитоксового времени. При выполнении теста с ядом эфы становится возможным определение активности более устойчивой (к разрушению гепарином-антитромбином III) формы тромбина — мейзотромбина. В

преобразованной форме тромбин способен свёртывать более широкий спектр продуктов фибриногена, например растворимые фибрин-мономерные комплексы (Баркаган З. С., Момот А. П., 2008). После 1 месяца воздействия сероводородсодержащего газа в опытной группе было отмечено увеличение данного показателя на 15,2% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольной группой (рисунок 5).

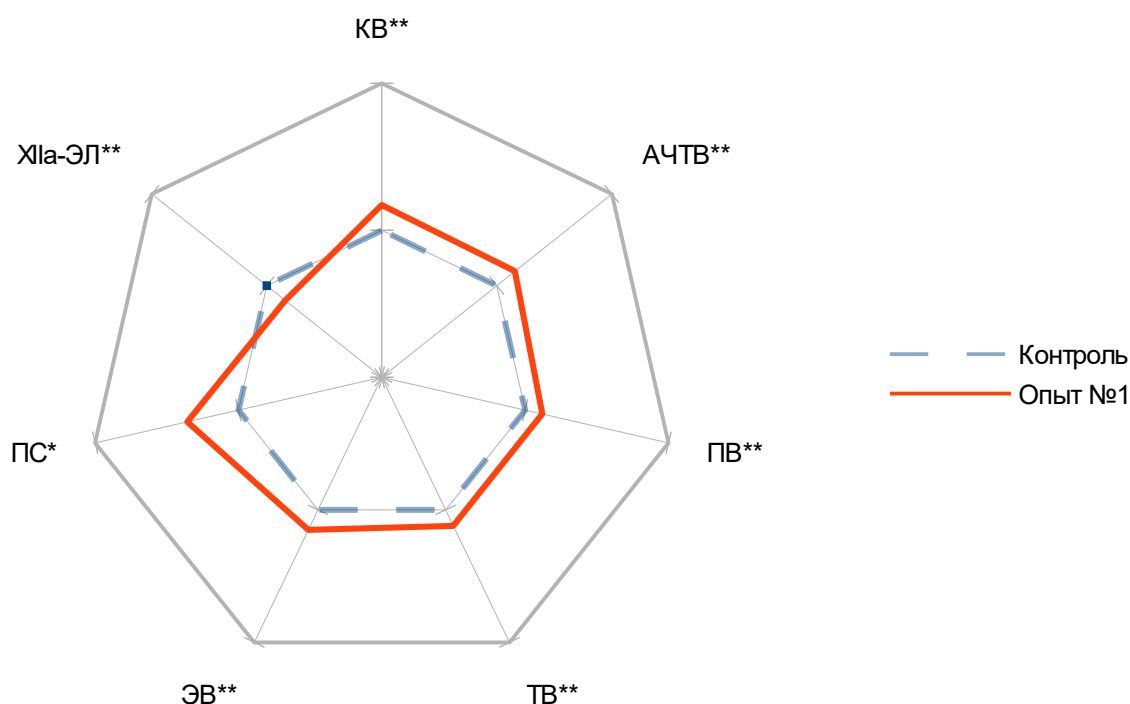


Рисунок 5. Состояние показателей коагулограммы крыс после 1 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду)

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

Активность противосвёртывающих компонентов, системы протеина С (ПС), в опытной группе №1 была выше на 35,7% по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Данные наблюдения указывают на повышение гипокоагуляционного потенциала

плазмы животных опытной группы.

В данной опытной группе была отмечена активация системы фибринолиза по показателю фХIIa-зависимого эуглобулинового лизиса (фХIIa-ЭЛ), который сократился на 14,5% ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, полученные данные по окончании первого экспериментального периода (1 месяц) воздействия сероводородсодержащего газа свидетельствуют в пользу гипокоагуляционной направленности сдвигов в системе гемостаза крыс, уменьшения функциональной активности тромбоцитов и дисфункции эндотелия.

### **3.2 Изменения гематологических показателей через 2 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа**

Результаты двух месяцев ингаляции сероводородсодержащего газа, представленные в таблице 5, показали увеличение содержания стабильных метаболитов оксида азота (NO) на 82,1% ( $p < 0,001$ ) во второй опытной группе по сравнению с контролем, и - на 2% ( $p < 0,05$ ) выше по сравнению с первой опытной группой.

В данной группе в плазме животных было отмечено увеличение содержания циркулирующих эндотелиоцитов (ЦЭК) на 48,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. Данный показатель указывает на повреждение клеток внутренней выстилки (Киричук В. Ф. с соавт., 2009; Петрищев Н. Н. с соавт., 2001; Cines D. B., et al., 1998). Было зарегистрировано превышение числа десквамированных клеток по сравнению с опытной группой №1 на 34,9% ( $p < 0,05$ ). Результаты подсчета ЦЭК в плазме крыс позволяют констатировать, что сероводородсодержащий газ через 2 месяца хронической ингаляции способствует повреждению эндотелия.

Количество тромбоцитов у крыс после двух месяцев хронической ингаляции газа уменьшилось на 5,1% ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе, и — на 4%

( $p < 0,05$ ) — по сравнению с опытной группой №1. Сокращение числа пластинок крови может быть связано с миграцией пластинок крови к эндотелию (адгезией) в связи с начавшимся их потреблением, а также — с угнетением синтеза тромбоцитов костным мозгом под воздействием ССГ (Тризно Н. Н. с соавт., 2005; Dorman D. C. et al., 2002).

Таблица 5

Показатели состояния системы гемостаза и эндотелия у крыс через 2 месяца воздействия сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду),  $M \pm s$

Показатели	Контроль №2	Опыт №2	P
ЦЭК $\times 10^4/\text{л}$	$3,9 \pm 0,27$ (n=5)	$5,8 \pm 0,29$ (n=5)	$P < 0,05$
NO, $\mu\text{М/л}$	$31,2 \pm 0,64$ (n=5)	$56,8 \pm 0,79$ (n=5)	$P < 0,001$
Тромбоциты $\times 10^9/\text{л}$	$758 \pm 6,02$ (n=10)	$719 \pm 4,57$ (n=12)	$P < 0,05$
САТ, %	$14,0 \pm 0,16$ (n=5)	$5,9 \pm 0,27$ (n=5)	$P < 0,001$
ИАТ, %	$100 \pm 4,90$ (n=10)	$89 \pm 7,15$ (n=12)	$P < 0,05$

Примечание: p — уровень статистической значимости показателей при сравнении с контрольной группой.

Функциональная активность тромбоцитов заметно уменьшилась после двух месяцев хронического воздействия газа. Так, показатель САТ в опытной группе №2 уменьшился на 57,9% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольной группой.

ИАТ в данной группе меньше на 11% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, что выразилось замедлением с  $17,9 \pm 0,25$  сек до  $19,9 \pm 0,80$  сек. В то же время по отношению к ИАТ в первой опытной группе зафиксировано увеличение данного показателя на 14,1% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 6).



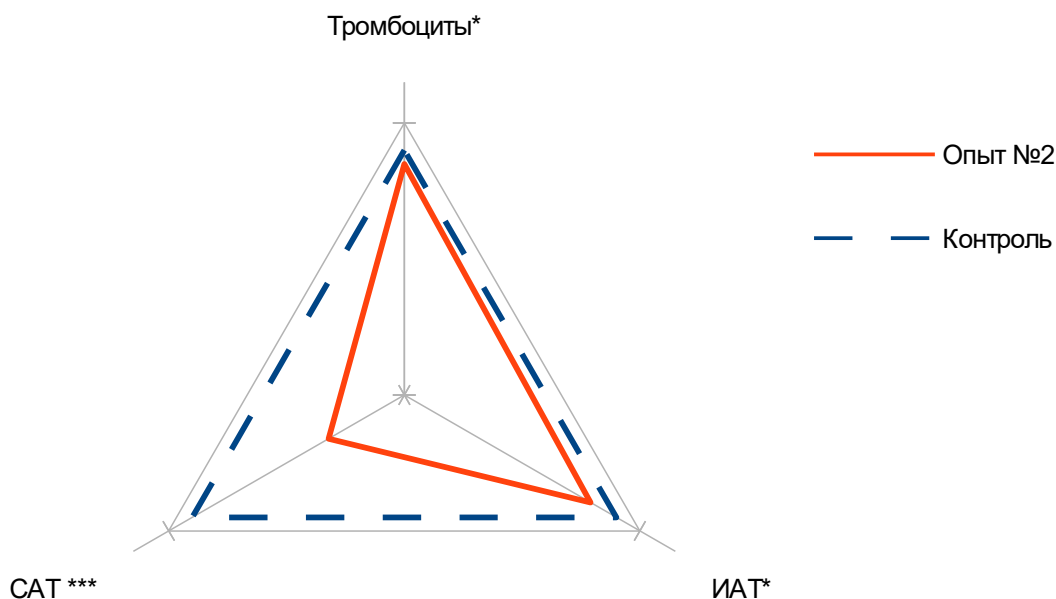


Рисунок 6. Показатели числа и функциональной активности тромбоцитов через 2 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду)

Примечание: данные на рисунке, выражены в % относительно группы контроля №2; Уровень статистической значимости между опытной и контрольной группой соответствует \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Показатели свёртывающей системы крови, представленные в таблице 6, указывали на угнетение внешнего механизма формирования протромбиназы. Так, показатель ПВ увеличился на 22,7% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем.

Со стороны конечного этапа фибринообразования отмечалась гипокоагуляция по показателям ТВ и ЭВ, которые возросли на 11,9% ( $p < 0,01$ ) и 29,5% ( $p < 0,001$ ) соответственно.

На внутреннем пути образования протромбиназного комплекса также наблюдалось угнетение по показателям АЧТВ и КВ. Первый замедлился на 24,7% ( $p < 0,001$ ), а второй — на 20,3% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем (таблица 6) (рисунок 4).

Таблица 6

Состояние плазменных компонентов свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем крыс после 2 месяцев хронического воздействия сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду), М±s

Параметры	Контроль №2 (n=10)	Опыт №2 (n=12)	P
КВ, сек	71,9±1,07	86,5±1,51	P<0,001
АЧТВ, сек	23,9±0,57	29,8±0,75	P<0,001
ПВ, сек	13,2±0,92	16,2±0,75	P<0,01
ТВ, сек	23,5±0,97	26,3±0,78	P<0,01
ЭВ, сек	24,1±0,99	31,2±0,62	P<0,001
ПС, Ед	0,7±0,05	0,96±0,05	P<0,001
РФМК, мг/100 мл	3,3±0,26	3,4±0,29	P>0,05
D-Димер, особи	abs	2 (16,7 %)	-
фХIIa-ЭЛ, мин	7,6±0,23	6,9±0,26	P<0,05
ИАП-1, Ед/мл	2,7±0,18	3,1±0,24	P<0,05

Примечание: p — уровень статистической значимости показателей при сравнении с контрольной группой.

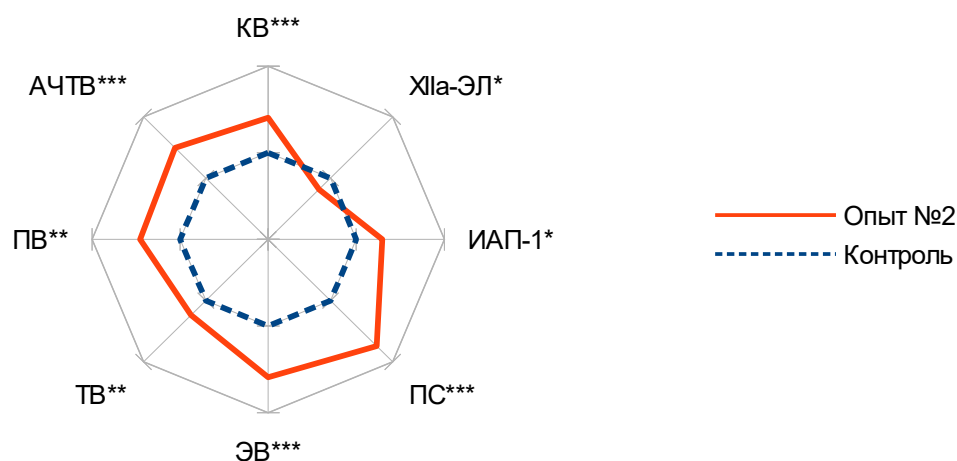


Рисунок 7. Состояние показателей коагулограммы крыс после 2 месяцев хронического воздействия сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду)

Примечание: данные на рисунке выражены в % относительно группы контроля №2; Уровень статистической значимости между опытной и контрольной группой соответствует \* - p<0,05, \*\* - p<0,01, \*\*\* - p<0,001.

Активность естественной антикоагулянтной системы протеина С возросла в группе опыта №2 на 37,1% ( $p < 0,001$ ) (рисунок 7).

Со стороны фибринолитической системы крови крыс после двух месяцев затравочного периода достоверно зафиксировано увеличение времени лизиса по показателю фХШа-ЭЛ на 9,2% ( $p < 0,05$ ), содержания ИАП-1 — на 14,8% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. Было отмечено у 16,7% особей крыс появление в плазме позднего продукта лизиса поперечносшитого фибрина, D — димера, превышающего пороговое значение 500 нг/мл.

Показатели гемостатического профиля лабораторных крыс во второй опытной группе указывают на увеличение гипокоагуляционного потенциала, угнетении функциональной активности тромбоцитов на фоне выраженной дисфункции и повреждения эндотелия.

### **3.3 Изменения гематологических показателей через 3 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа**

Через три месяца воздействия ССГ содержание суммарных метаболитов NO уменьшилось по сравнению со второй опытной группой на 22% ( $p < 0,01$ ), оставаясь выше контрольных величин на 41,1% ( $p < 0,001$ ). Это указывает на прогрессирующую дисфункцию эндотелия.

Превышение содержания десквамированных эндотелиоцитов (ЦЭК) в плазме на 83,3% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем, и — на 32,8% ( $p < 0,001$ ) по отношению ко второй группе указывает на повреждение сосудистого эндотелия.

Спонтанная агрегация тромбоцитов (САТ) в третьей опытной группе увеличилась на 22,7% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем. Отмечено, что по сравнению со второй опытной группой данный показатель был в 2,3 ( $p < 0,001$ ) раза выше. На 14,1% ( $p < 0,01$ ) увеличилась индуцированная агрегация тромбоцитов (ИАТ) в опытной группе №3 по сравнению с группой №2 с  $19,9 \pm 0,80$  сек до  $17,1 \pm 0,58$  сек (таблица 7) (рисунок 8).

Показатели параметров системы гемостаза и эндотелия через 3 месяца воздействия сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду),  $M \pm s$

Показатели	Контроль	Опыт №3	P
ЦЭК $\times 10^4/\text{л}$	$4,2 \pm 0,07$ (n=5)	$7,7 \pm 0,47$ (n=5)	$P < 0,001$
NO, мкМ/л	$31,4 \pm 0,33$ (n=5)	$44,3 \pm 0,57$ (n=5)	$P < 0,001$
Тромбоциты $\times 10^9/\text{л}$	$761 \pm 4,11$ (n=10)	$680 \pm 2,97$ (n=11)	$P < 0,05$
САТ, %	$14,1 \pm 1,23$ (n=5)	$17,3 \pm 0,29$ (n=5)	$P < 0,01$
ИАТ, %	$100 \pm 4,90$ (n=10)	$106 \pm 8,02$ (n=11)	$P > 0,05$

Примечание: p — уровень статистической значимости показателей при сравнении с контрольной группой.

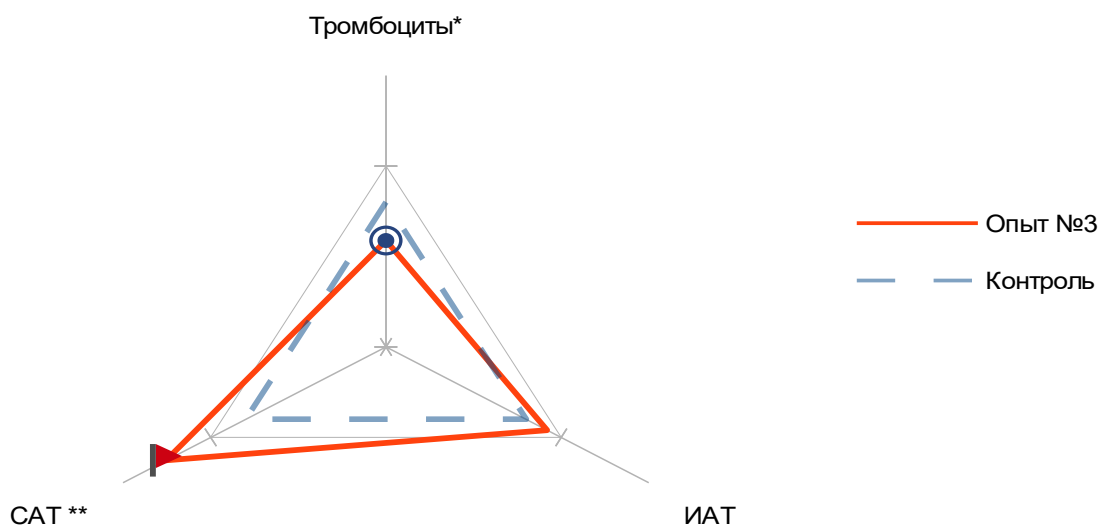


Рисунок 8. Показатели числа и функциональной активности тромбоцитов через 3 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду)

Примечание: данные на рисунке выражены в % относительно группы контроля №3; Уровень статистической значимости между опытной и контрольной группой соответствует \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ .

Количество тромбоцитов уменьшилось в опытной группе №3 на 10,6% ( $p<0,05$ ) по сравнению с контрольной группой (рисунок 8).

Со стороны параметров внутреннего механизма свертывания крови, представленным в таблице 8, отмечалось уменьшение показателей АЧТВ - на 16,8% ( $p<0,05$ ) и КВ — на 16,9% ( $p<0,05$ ), по сравнению с опытом №2.

Таблица 8

Состояние плазменных компонентов свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем крыс после 3 месяцев хронического воздействия сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду),  $M\pm s$

Параметры	Контроль (n=10)	Опыт №3 (n=11)	P
КВ, сек	72,0±1,49	71,9±0,83	P>0,05
АЧТВ, сек	24,0±0,67	24,8±0,87	P>0,05
ПВ, сек	13,1±0,57	13,9±1,04	P>0,05
ТВ, сек	23,0±0,94	22,9±0,54	P>0,05
ЭВ, сек	24,0±0,82	25,6±0,52	P<0,05
ПС, Ед	0,7±0,67	0,80±0,77	P<0,05
РФМК, мг/100 мл	3,3±0,26	3,8±0,61	P<0,05
D-Димер, особи	abs	5 (45,5 %)	-
фХIIa-ЭЛ, мин	7,5±0,28	7,5±0,44	P>0,05
ИАП-1, Ед/мл	2,8±0,22	3,5±0,34	P<0,05

Примечание: p — уровень статистической значимости показателей при сравнении с контрольной группой.

Показатель состояния внешнего пути образования протромбиназного комплекса, протромбиновое время (ПВ), сократился в данной группе на 14,2% ( $p<0,05$ ) в сравнении с опытной группой №2. Активация факторов конечного этапа фибринообразования была отмечена по параметрам ТВ и ЭВ по сравнению со второй опытной группой. Так, ТВ ускорилось на 12,9% ( $p<0,05$ ), а ЭВ — на 17,9% ( $p<0,05$ ). Исходя из показателей коагуляционных тестов в сравнении с группой

контроля достоверно больше отмечалась только ЭВ - на 6,7% ( $p<0,05$ ).

Наблюдалось угнетение физиологической активности естественных антикоагулянтов в системе протеина С на 16,7% ( $p<0,05$ ) по сравнению со второй опытной группой. В то же время по отношению со своей контрольной группой данный показатель оставался выше на 14,3% ( $p<0,05$ ) (рисунок 9).

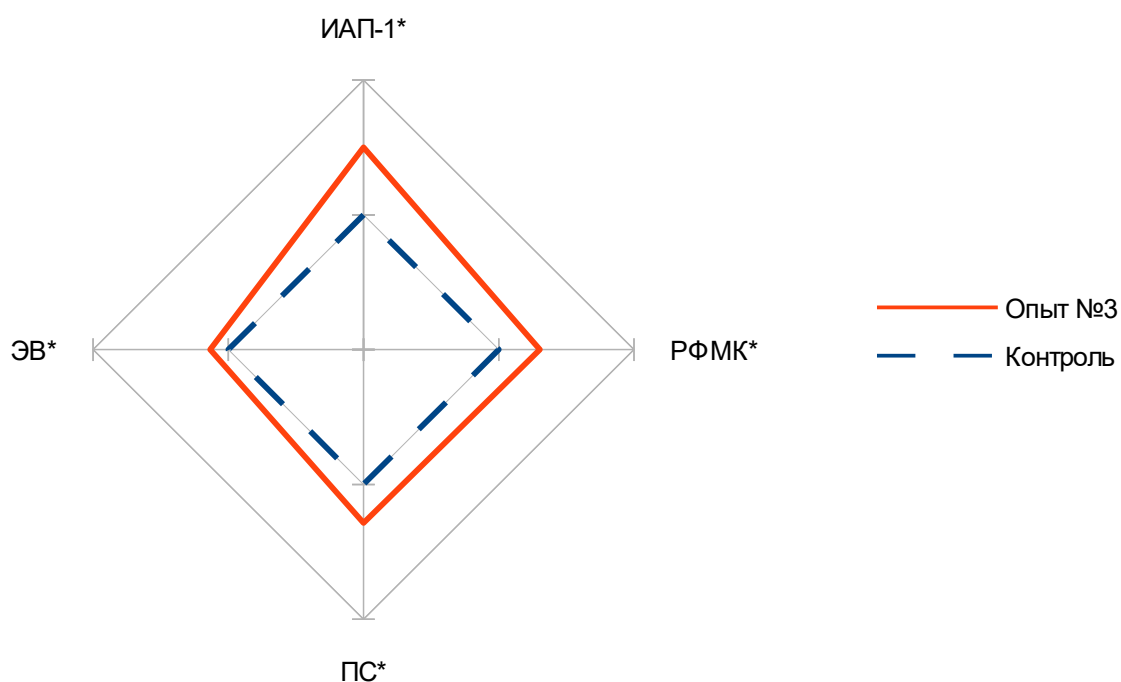


Рисунок 9. Состояние показателей коагулограммы крыс после 3 месяцев хронического воздействия сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду)

Примечание: Данные, представленные на рисунке, выражены в % относительно группы контроля №3; Уровень статистической значимости между опытной и контрольной группой соответствует \* -  $p<0,05$ .

Содержание внутрисосудистого маркера активации системы гемостаза, РФМК, было статистически значимо выше в данной группе и по сравнению с контролем (на 15,2%,  $p<0,05$ ) (рисунок 9), и по сравнению со второй опытной группой (на 11,8%,  $p<0,05$ ). Замедление фибринолиза отмечалось по показателю фХПа-ЭЛ, увеличенному на 8,7% ( $p<0,05$ ) в сравнении с опытной группой №2.

Об угнетении фибринолитической системы, активации эндотелия и увеличении агрегационной способности тромбоцитов говорит рост в плазме ингибитора активатора плазминогена — 1 (ИАП-1). Под воздействием тромбина эндотелием продуцируется данный фактор с последующим накоплением в тромбоцитах, высвобождаемый уже при их активации (Петрищев Н. Н. с соавт., 2003; Мазуров А. В., 2011; Шиффман Ф. Д., 2007). В нашем исследовании содержание ИАП-1 в плазме животных третьей опытной группы увеличилось на 25% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем (рисунок 6), и - на 12,9% ( $p < 0,05$ ) - по сравнению с опытной группой №2.

Содержание D — димера в плазме крыс в данной опытной группе было зафиксировано у 5 (45,5%) особей в отличие от опытной группы №2, где данный маркер тромбинемии регистрировался у 2 (16,7%) животных.

Данные после трех месяцев хронического воздействия сероводородсодержащего газа говорят о тенденции к смещению гемостатического баланса в гиперкоагуляционную сторону, угнетению фибринолиза ввиду достоверных изменений показателей в сравнении со второй опытной группой.

### **3.4 Изменения гематологических показателей через 4 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа**

Уровень суммарных NO-метаболитов (NO) в группе после 4 месяцев затравки меньше контрольных значений на 4% ( $p < 0,05$ ) и на 32,1% ( $p < 0,01$ ) ниже, чем в опытной группе №3 (таблица 9). Угнетение синтеза оксида азота эндотелиоцитами может быть следствием истощения конститутивных форм NO-синтаз (cNOS), обеспечивающих синтез оксида азота в физиологических условиях (Реутов В. П., Сорокина Е. Г., 1998) после трёх месяцев воздействия поллютанта, а при увеличении продолжительности хронического воздействия сероводородсодержащего газа - повреждения и индуцибельной NO - синтазы (iNOS) продуктами метаболизма и общего оксидативного стресса, ведущее

впоследствии к функциональному нарушению клеток сосудистой стенки (рисунок 10) (Мажитова М. В., 2012).

Таблица 9

Состояние параметров системы гемостаза и эндотелия у крыс через 4 месяца воздействия сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду),  $M \pm s$

Показатели	Контроль	Опыт №4	P
ЦЭК, $\times 10^4/\text{л}$	$4,6 \pm 0,14$ (n=5)	$8,3 \pm 0,34$ (n=5)	$P < 0,01$
NO, мкМ/л	$31,3 \pm 0,25$ (n=5)	$30,1 \pm 0,26$ (n=5)	$P < 0,05$
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$762 \pm 7,92$ (n=10)	$617 \pm 4,81$ (n=10)	$P < 0,05$
САТ, %	$14,2 \pm 0,34$ (n=5)	$25,6 \pm 0,60$ (n=5)	$P < 0,001$
ИАТ, %	$100 \pm 5,43$ (n=10)	$119,8 \pm 3,10$ (n=10)	$P < 0,05$

Примечание: p — уровень статистической значимости показателей при сравнении с контрольной группой.

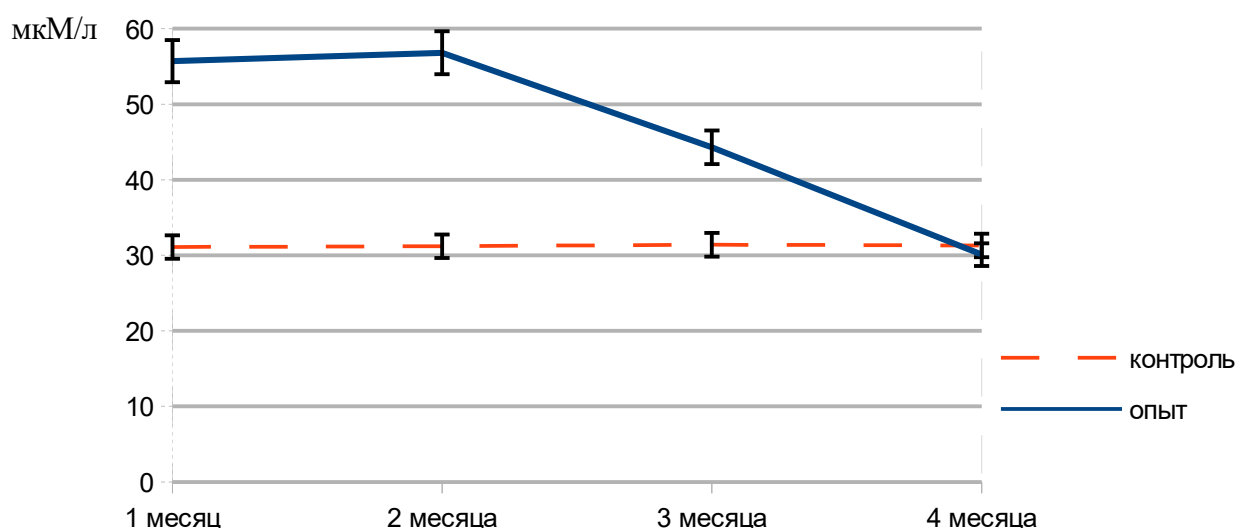


Рисунок 10. Содержание метаболитов NO-метаболитов при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду)



Повышение в плазме крыс количества десквамированных эндотелиоцитов (ЦЭК) в четвертой опытной группе на 80,4% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем говорит о наличии повреждения клеток внутренней сосудистой выстилки. Увеличение данного показателя на 7,8% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с третьей опытной группой указывает на усиление повреждающего действия сероводородсодержащего газа на эндотелий по мере увеличения срока хронического воздействия газа (рисунок 11).

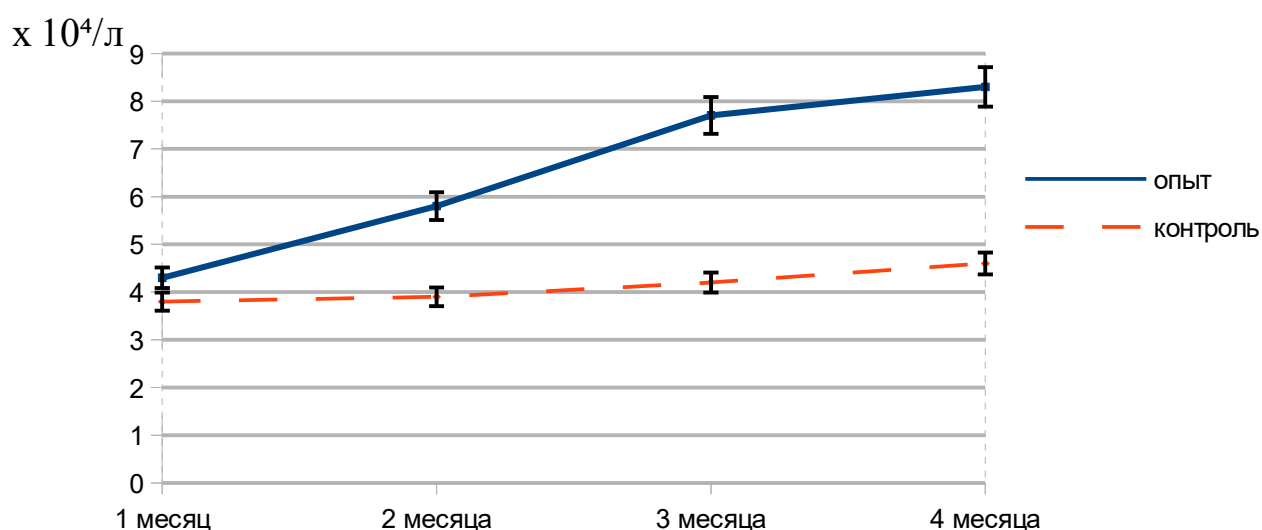


Рисунок 11. Содержание циркулирующих (десквамированных) эндотелиоцитов (ЦЭК) при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду)

Количество тромбоцитов в четвертой опытной группе уменьшилось на 19% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем, что может быть связано с их потреблением (Мазуров А. В., 2011; Шиффман Ф. Д., 2007).

Функциональная активность тромбоцитов в данной опытной группе увеличилась, о чем свидетельствуют показатели спонтанной (САТ) и индуцированной (ИАТ) агрегации пластинок крови. Так, САТ возросла на 80,3% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем, и на 48% ( $p < 0,001$ ) - в сравнении с третьей

опытной группой. ИАТ увеличилась на 20% ( $p < 0,01$ ) по отношению к контрольной, и на 13,8% ( $p < 0,05$ ) - по сравнению с опытной группой №3 (рисунок 12).

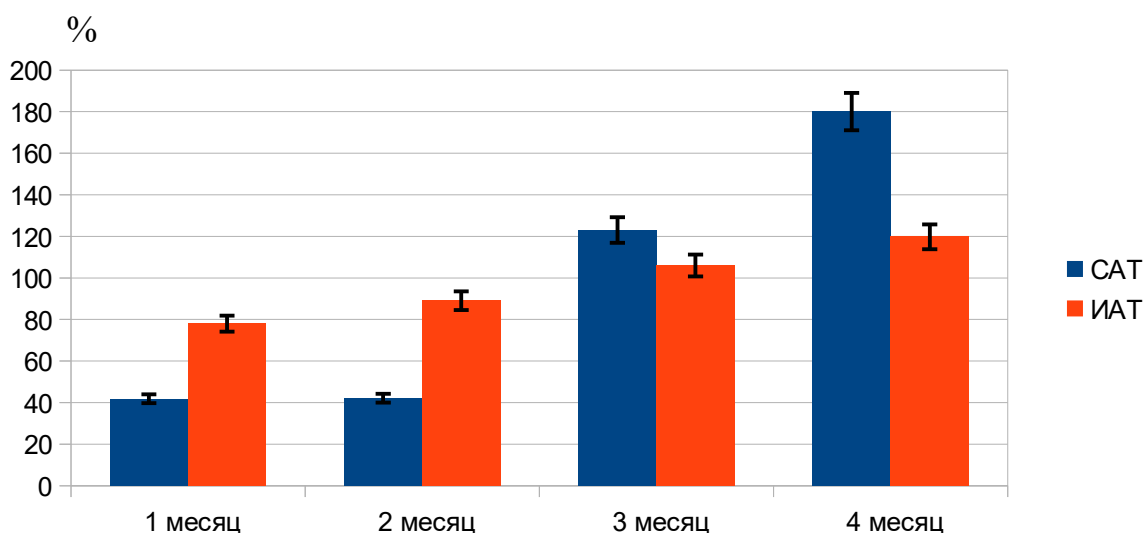


Рисунок 12. Показатели спонтанной (САТ) и индуцированной (ИАТ) агрегации тромбоцитов при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду)

Примечание: Данные, представленные на рисунке, выражены в % относительно своей группы контроля.

По данным, представленным в таблице 10, было отмечено, что показатели активации свертывания по внутреннему пути в четвертой опытной группе указывали на увеличение гиперкоагулянтной напряженности. Так, каолиновое время (КВ) уменьшилось в данной группе на 10,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Ускорение КВ по отношению к группе опыта №3 было установлено на 10,4% ( $p < 0,05$ ). Показатель АЧТВ сократился у крыс в данной опытной группе №4 на 17,4% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем (рисунок 13) и на 19,4% ( $p < 0,01$ ) стал меньше в сравнении с третьей опытной группой.

Таблица 10

Состояние плазменных компонентов свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем крыс после 4 месяцев хронического воздействия сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду),  $M \pm s$

Параметры	Контроль (n=10)	Опыт №4 (n=10)	P
КВ, сек	$72,1 \pm 0,99$	$64,4 \pm 0,70$	$P < 0,001$
АЧТВ, сек	$24,2 \pm 1,62$	$20,0 \pm 0,67$	$P < 0,01$
ПВ, сек	$13,4 \pm 0,69$	$11,9 \pm 0,57$	$P < 0,05$
ТВ, сек	$22,9 \pm 0,99$	$20,4 \pm 0,84$	$P < 0,05$
ЭВ, сек	$23,9 \pm 0,88$	$21,1 \pm 0,99$	$P < 0,05$
ПС, Ед	$0,7 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,37$	$P < 0,05$
РФМК, мг/100 мл	$3,3 \pm 0,42$	$4,2 \pm 0,39$	$P < 0,01$
D-димер, особи	abs	8 (66,7 %)	---
фХШа-ЭЛ, мин	$7,5 \pm 0,31$	$8,9 \pm 0,18$	$P < 0,01$
ИАП-1, Ед/мл	$2,7 \pm 0,21$	$4,2 \pm 0,33$	$P < 0,01$

Примечание: p — уровень статистической значимости показателей при сравнении с контрольной группой.

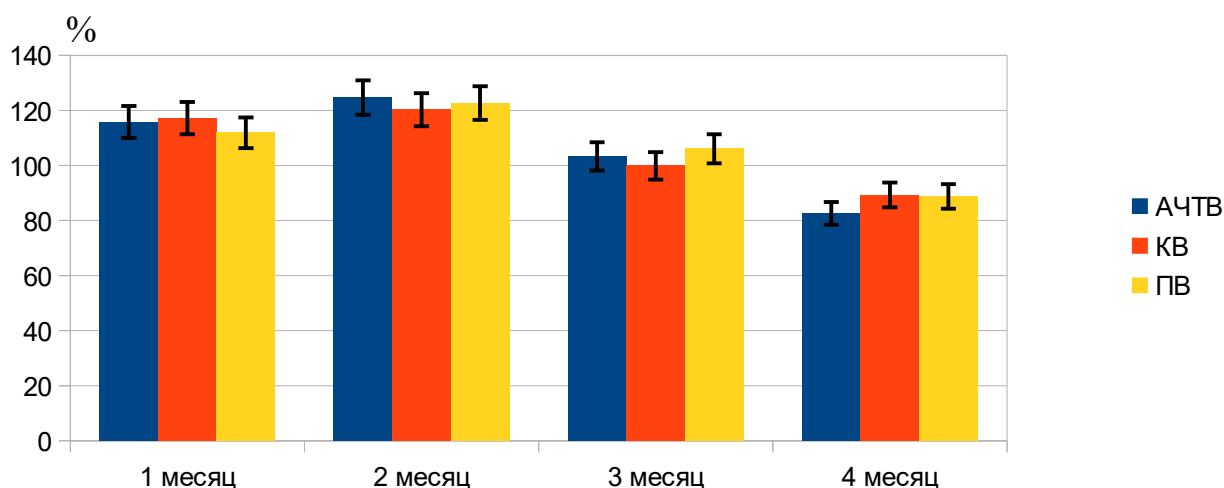


Рисунок 13. Показатели активированного частичного тромбопластинового (АЧТВ), каолинового (КВ) и протромбинового (ПВ) времени при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду)

Примечание: данные на рисунке выражены в % относительно своей группы контроля.

Активация процессов свертывания по внешнему пути наблюдалась по данным протромбинового времени (ПВ), которое ускорилось на 11,2% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, и на 14,4% ( $p < 0,05$ ) уменьшилось в сравнении с третьей опытной группой (рисунок 13).

Сокращение времени на конечном этапе фибринообразования было отмечено по показателям тромбинового (ТВ) и эхитоксового (ЭВ) времени. В опытной группе после четырех месяцев затравочного периода наблюдалось ускорение ТВ на 10,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. По отношению к третьей опытной группе ТВ уменьшилось на 11% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 14). ЭВ у животных данной группы сократилось на 11,7% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем. На 17,6% ( $p < 0,01$ ) ускорилось эхитоксовое время по отношению к опытной группе №3.

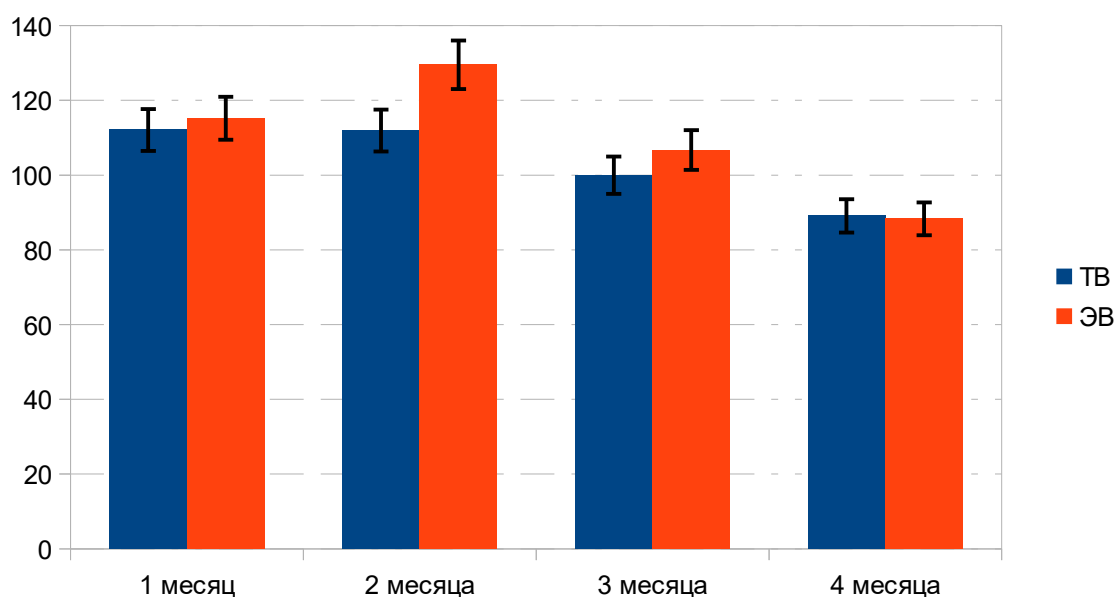


Рисунок 14. Показатели тромбинового (ТВ) и эхитоксового (ЭВ) времени при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду)

Примечание: данные на рисунке выражены в % относительно своей группы контроля.

Угнетение естественных антикоагулянтов наблюдалось в системе протеина

С (ПС). По сравнению с контролем 11,4% ( $p < 0,05$ ) уменьшилась активность данного показателя у крыс после четырех месяцев затравочного периода. Наблюдалось снижение показателя ПС на 22,5% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с третьей опытной группой.

Было отмечено нарастание содержания растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) на 27,3% ( $p < 0,01$ ) в сравнении с контролем. На 10,5% ( $p < 0,05$ ) возросло количество РФМК в плазме крыс данной группы по отношению к опытной №3.

Количество крыс с превышающим пороговое значение D-димера в 500 нг/мл было зафиксировано у 80% особей, что говорит об активации свертывающей системы с увеличением срока эксперимента, в то время как в третьей опытной группе данный показатель отмечен был у 5 (45,5%) особей (рисунок 15).

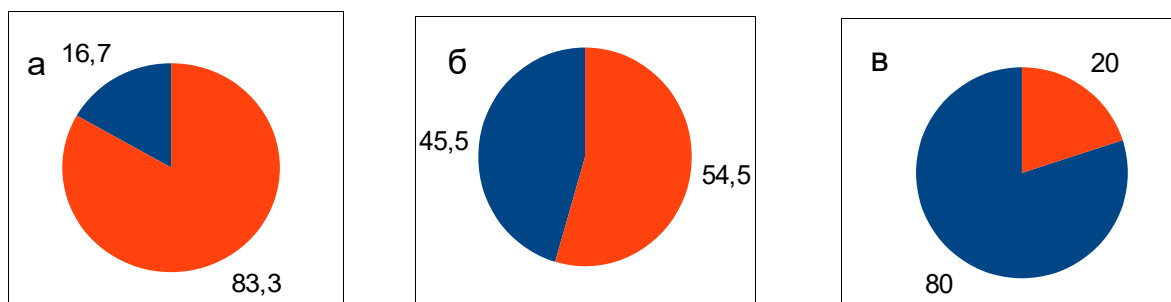


Рисунок 15. Распределение крыс с определяемым D-димером при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду) (%)

Примечание: а — опытная группа №2; б — опытная группа №3; в — опытная группа №4.

У животных данной четвертой опытной группы было увеличено количество ингибитора тканевого активатора плазминогена (ИАП-1) на 55,6% ( $p < 0,01$ ) в сравнении с контролем. На 20% ( $p < 0,05$ ) возрос данный показатель по сравнению с опытной группой №3 (рисунок 16). Данные значения указывают на тромбин-зависимое подавление фибринолитической активности плазмы крыс под

воздействием сероводородсодержащего газа по мере увеличения хронического эксперимента.

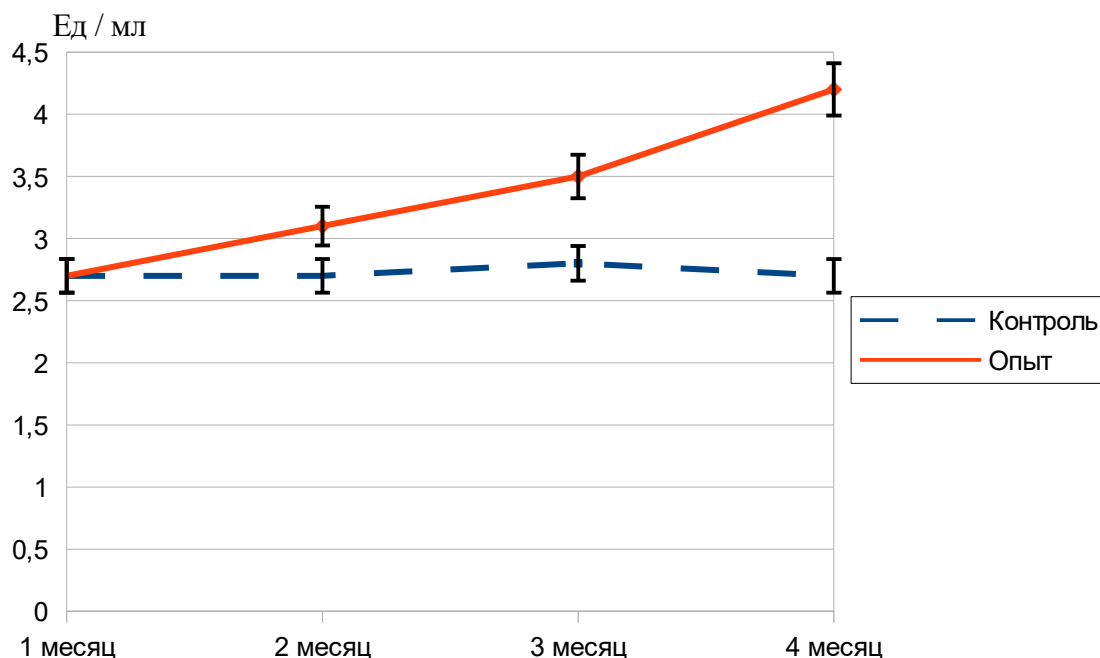


Рисунок 16. Содержание ИАП-1 при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду)

Замедление функционирования фибринолитической системы было отмечено по показателю фХПа-зависимого фибринового лизиса (фХПа-ЭЛ) на 18,7% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем. По отношению к третьей опытной группе данный показатель замедлился на 19% ( $p < 0,01$ ) (рисунок 17).

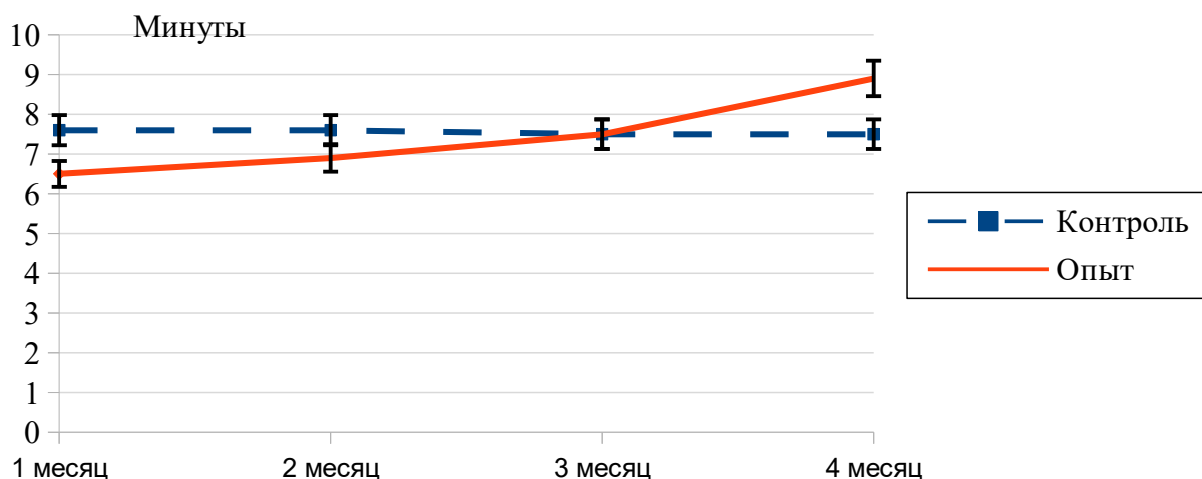


Рисунок 17. Изменение активности фXIIIa-зависимого эуглобулинового лизиса при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду)

Полученные результаты коагуляционных тестов в группе после четырех месяцев хронического воздействия сероводородсодержащего газа указывают на увеличение гиперкоагуляционных сдвигов в плазме крыс по сравнению с группой, после трех месяцев ингаляции. Данные параметров состояния эндотелия у животных данной группы говорят о функциональном нарушении клеток сосудистой выстилки и повреждении их, усиливающимся по мере увеличения срока действия газового загрязнителя.

### 3.5 Корреляционный анализ взаимосвязей показателей системы гемостаза и эндотелия крыс в течение 4-месячного воздействия сероводородсодержащего газа

Наличие множества прямых и обратных каналов связи обеспечивает адекватное функционирование системы гемостаза и сосудистого эндотелия. В результате проведенного анализа, была отмечена высокая взаимосвязь ряда параметров гемостазиологического профиля и сосудистого эндотелия (таблица 11).

Корреляционные взаимосвязи показателей системы гемостаза и эндотелия крыс на протяжении 4-месячного воздействия сероводородсодержащего газа (80 мг/м<sup>3</sup>)

Показатель	r	p
Тромбоциты-САТ	-0,733	0,159
САТ-ИАТ	0,956	0,011
САТ-ПС	-0,960	0,010
ИАТ-ПС	-0,893	0,041
Тромбоциты-ИАТ	-0,810	0,096
Тромбоциты-ПС	0,549	0,338
Тромбоциты-РФМК	-0,986	0,002
Тромбоциты-ЦЭК	-0,955	0,011
Тромбоциты-NO	0,402	0,503
ЦЭК-NO	-0,249	0,686
ЦЭК-ИАТ	0,745	0,148
ЦЭК-САТ	0,621	0,263
ЦЭК-ХIIa-ЭЛ	0,661	0,224
NO-САТ	-0,902	0,036
NO-ИАТ	-0,821	0,088
NO-ПС	0,986	0,002
АЧТВ-ПВ	0,998	0,001
АЧТВ-ЭВ	0,987	0,002
АЧТВ-ПС	0,964	0,008
АЧТВ-РФМК	-0,775	0,124
АЧТВ-КВ	0,974	0,005
КВ-ХIIa-ЭЛ	-0,921	0,026
КВ-ПВ	0,986	0,002
КВ-ПС	0,975	0,005
АЧТВ-ХIIa-ЭЛ	-0,934	0,020
АЧТВ-ИАП-1	-0,695	0,193
АЧТВ-ЦЭК	-0,522	0,367
АЧТВ-NO	0,397	0,508
АЧТВ-Тромбоциты	0,674	0,213
АЧТВ-САТ	-0,984	0,002



АЧТВ-ИАТ	0,874	0,053
КВ-ИАТ	-0,931	0,021
КВ-САТ	-0,993	0,001
ПВ-ИАТ	0,844	0,072
ПВ-ХIIа-ЭЛ	-0,910	0,032
ПВ-ЭВ	0,994	0,001
ПВ-ТВ	0,976	0,004
ПВ-ЦЭК	-0,476	0,418
ТВ-ЭВ	0,959	0,010
РФМК-ТВ	-0,833	0,087
ПС-ТВ	0,961	0,009
ПС-ИАП-1	-0,586	0,299
ТВ-ХIIа-ЭЛ	-0,955	0,011
ЭВ-ХIIа-ЭЛ	-0,870	0,053
ИАП-1-Тромбоциты	-0,998	0,001
ИАП-1-ХIIа-ЭЛ	0,832	0,081
САТ-ИАП-1	0,758	0,138
ИАП-1-ИАТ	0,834	0,073
ИАП-1-ЦЭК	0,949	0,014
ИАП-1-НО	-0,445	0,453
ХIIа-ЭЛ-РФМК	0,856	0,064
ХIIа-ЭЛ-ИАТ	0,963	0,009
ХIIа-ЭЛ-САТ	0,956	0,011
ХIIа-ЭЛ-Тромбоциты	-0,802	0,103
ХIIа-ЭЛ-ПС	-0,925	0,024
ХIIа-ЭЛ-НО	-0,857	0,063
ЭВ-ПС	0,956	0,011
ПВ-ПС	0,954	0,012
РФМК-ПС	-0,655	0,230
РФМК-ЦЭК	0,932	0,021
РФМК-ИАП-1	0,986	0,002
ТВ-ИАП-1	-0,753	0,142
ПВ-САТ	-0,973	0,005
ПВ-ИАТ	-0,860	0,062

NO-ТВ	0,903	0,036
NO-ЭВ	0,919	0,027
ТВ-ЦЭК	-0,605	0,280
ИАТ-ТВ	-0,948	0,014
САТ-ТВ	-0,991	0,001
ТВ-АЧТВ	0,986	0,002

Примечание:  $r$  - корреляционная взаимосвязь;  $p$  — достоверность различий результатов. Корреляционная связь признавалась сильной при  $r > 0,70$ ; средней - при  $0,50 < r < 0,69$ ; умеренной - при  $0,30 < r < 0,49$ ; слабой - при  $0,20 < r < 0,29$ ; очень слабой - при  $r < 0,19$ .

Так, однонаправленный характер изменений прослеживался со стороны метаболитов оксида азота (NO) и активности системы протеина С (ПС) ( $r = 0,986$ ;  $p = 0,002$ ), что говорит об увеличении активности в системе естественных антикоагулянтов при росте содержания NO в плазме животных.

В положительной корреляционной взаимосвязи находилась активность метаболитов оксида азота с показателями конечного этапа свертывания крови — тромбиновым ( $r = 0,903$ ;  $p = 0,036$ ) и эхитоксовым ( $r = 0,919$ ;  $p = 0,027$ ) временем, подчеркивая зависимость уровня функционирования эндотелия и активность тромбина.

В высокой обратной корреляционной зависимости находилась спонтанная агрегация тромбоцитов от количества метаболитов оксида азота ( $r = -0,902$ ;  $p = 0,036$ ). Метаболиты NO с индуцированной агрегацией коррелировали с почти равной силой, но на менее статистически значимом уровне ( $r = -0,821$ ;  $p = 0,088$ ). Данные исследования совпадают с имеющимися литературными фактами (Ивашкин В. Т., Драпкина О. М., 2011; Меньшикова Е. Б. с соавт., 2006; Каминская Г. О., 2004) о гипоагрегационном действии оксида азота, что наблюдалось на начальных этапах (первые два месяца) воздействия сероводородсодержащего газа.

Следует отметить, что активность тромбоцитов находилась в высокой обратной корреляционной связи с показателями коагуляционных тестов. Наиболее сильная взаимосвязь отмечалась между САТ и ПВ ( $r = -0,973$ ;  $p = 0,005$ ), ИАТ и

ТВ ( $r = -0,948$ ;  $p = 0,014$ ), ИАТ и КВ ( $r = -0,931$ ;  $p = 0,021$ ). Полученные данные говорят о выраженной двусторонней зависимости тромбоцитарного и коагуляционного звеньев системы гемостаза и при увеличении активности тромбоцитов уменьшается время свертывания как по внешнему, так и по внутреннему путям.

Весьма выраженная положительная корреляционная связь наблюдалась между показателями коагуляционных тестов, отражающими разные пути активации свёртывания. Отмечена значимая взаимосвязь компонентов внешнего ПВ и внутреннего АЧТВ путей активации ( $r = 0,998$ ;  $p = 0,001$ ), ПВ и КВ ( $r = 0,986$ ;  $p = 0,002$ ). Данные указывают на однонаправленную тенденцию изменений фVII, фX, фV, фII (ПВ) и фXII, фXI, фIX, фVIII, прекалликреина и высокомолекулярного кининогена при фосфолипидной (АЧТВ) и стандартной каолиновой (КВ) активации.

На значительном уровне выражена прямая корреляционная связь между состоянием факторов протромбинового комплекса (ПВ) и скоростью превращения фибриногена в фибрин на конечном этапе коагуляции под влиянием тромбина стандартизированного (ТВ) и преобразованного в мейзотромбин ядом эфы (ЭВ). В прямой тесной ( $r = 0,9 - 1$ ) достоверно значимой взаимосвязи ПВ и ТВ ( $p = 0,004$ ), ПВ и ЭВ ( $p = 0,001$ ).

Анализ функциональной активности показателей коагуляционного и тромбоцитарного звеньев системы гемостаза выявил обратную выраженную связь на протяжении экспериментального периода. Так, в весьма тесной обратной корреляции находились ПВ и САТ ( $r = -0,973$ ;  $p = 0,005$ ), АЧТВ и САТ ( $r = -0,984$ ;  $p = 0,002$ ), ТВ и ИАТ ( $r = -0,948$ ;  $p = 0,014$ ). Данная динамика обусловлена тем, что с увеличением продолжительности периода воздействия сероводородсодержащего газа увеличивалась спонтанная (САТ) и индуцированная (ИАТ) агрегационная активность тромбоцитов, а время свёртывания плазменных факторов гемостатической системы уменьшалось.

Была отмечена отрицательная высокая корреляционная связь между

функциональной активностью тромбоцитов и состоянием естественных антикоагулянтов в плазме экспериментальных животных. По мере продолжительности затравочного периода увеличивался показатель ИАТ, но уменьшалась активность компонентов системы протеина С ( $r = -0,893$ ;  $p = 0,041$ ).

Подавляющий фибринолиз ингибитор активатора плазминогена (ИАП-1), отражает состояние и эндотелия, и тромбоцитов, и в определенной степени, активность тромбина (Алипов Н. Н., 2013; Балуда В. П., 1995; Васильев Н. А. с соавт., 2013; Шиффман Ф. Д. с соавт., 2007). Корреляционный анализ показал отрицательную высокую взаимосвязь данного показателя с числом тромбоцитов ( $r = -0,998$ ;  $p = 0,001$ ). По мере уменьшения числа пластинок крови к концу затравочного периода, связанного вероятно, с их потреблением, увеличивается активность ИАП-1, что можно объяснить следующим образом. После активации эндотелия увеличивающимся количеством тромбина по мере продолжительности воздействия газа, растет и секреция ИАП-1 эндотелиоцитами в кровь. Учитывая, что тромбоциты способны накапливать данный ингибитор в неактивной форме (Мазуров А. В., 2011), рост данного параметра в плазме указывает на реализацию процесса активации тромбоцитов в результате действия газа. Дегрануляция охватывает все большее число пластинок, мигрировавших из кровотока к эндотелию, посредством адгезии. Прямая сильная корреляционная связь ИАП-1 с циркулирующими в кровотоке эндотелиоцитами (ЦЭК) ( $r = 0,949$ ;  $p = 0,014$ ) указывает на вариант дисфункции эндотелия, усугубляющийся повреждением сосудистой выстилки (Петрищев Н. Н. с соавт., 2003) по мере увеличения ингаляции газом. В нашем исследовании ИАП-1 с системой протеина С (ПС) находился в отрицательной, средней взаимосвязи ( $r = -0,586$ ), что объясняется ингибирующим влиянием ПС на ингибитор, но уровень статистической значимости принятый в работе, исключает достоверность данной связи ( $p = 0,299$ ). Полученные данные позволяют сделать заключение, что в подавлении фибринолитической активности (посредством активации ИАП-1) при хроническом действии сероводородсодержащего поллютанта большее значение

имеет состояние эндотелия, чем естественных антикоагулянтов (ПС).

Динамика изменений показателя внутрисосудистой активации свёртывания (РФМК) находилась в прямой сильной корреляционной связи и с ЦЭК ( $r = 0,932$ ;  $p = 0,021$ ), и с ИАП-1 ( $r = 0,986$ ;  $p = 0,002$ ), что в условиях хронического эксперимента указывало на значимость интенсификации повреждения эндотелия в актуму каолином, так называемый фХIIa-зависимый эуглобулиновый лизис (фХIIa-ЭЛ) находился в прямой сильной взаимосвязи с показателем спонтанной ( $r = 0,956$ ;  $p = 0,011$ ) и индуцированной ( $r = 0,963$ ;  $p = 0,009$ ) агрегации тромбоцитов. По мере увеличения времени лизиса эуглобулиновой фракции, росла и степень функциональной активности пластинок крови. С возрастанием продолжительности хронического действия сероводородсодержащего газа удлинялось время параметра фХIIa-ЭЛ, а активность системы протеина С уменьшалась, о чем свидетельствовала отрицательная выраженная взаимосвязь данных показателей ( $r = -0,925$ ;  $p = 0,024$ ). Время лизиса и время образования фибринового сгустка находились в обратной тесной корреляционной связи по мере продолжительности хронического воздействия газового поллютанта. Данное обстоятельство отмечалось по корреляционным связям АЧТВ и фХIIa-ЭЛ ( $r = -0,934$ ;  $p = 0,020$ ), ПВ и фХIIa-ЭЛ ( $r = -0,910$ ;  $p = 0,032$ ), ТВ и фХIIa-ЭЛ ( $r = -0,955$ ;  $p = 0,011$ ). По мере сокращения времени коагуляции, время лизиса удлинялось.

Таким образом, по результатам корреляционного анализа динамики показателей в ходе хронического 4-месячного воздействия сероводородсодержащего газа наблюдались выраженные корреляционные взаимосвязи между параметрами свёртывающей, противосвёртывающей системы гемостаза, тромбоцитами и эндотелием, указывающие на высокий однонаправленный уровень организации системы, способствующие адаптивным возможностям систем в условиях хронического действия экзогенного поллютанта.

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

Учитывая высокую корреляционную взаимосвязь между параметрами коагуляционного, тромбоцитарного звеньев системы гемостаза и показателями состояния сосудистого эндотелия на протяжении хронического периода воздействия ССГ, было решено для подтверждения механизма действия поллютанта целенаправленно применить корректирующие средства.

Для исследования возможности коррекции выванных изменений ССГ животные были поделены на три группы и все подвергались воздействию газа 4 месяца. Животные опытной группы №4 из первой части эксперимента (4 месяца воздействия ССГ) были группой сравнения. Опытные группы получили название опытной №5 (применяли аптамер п/к, однократно в последний день эксперимента), №6 (применяли АСК per os, курсом один раз / сутки на протяжении 10 последних дней ингаляции ССГ), №7 (применяли одновременно аптамер + АСК).

Для коррекции изменений параметров системы гемостаза после воздействия сероводородсодержащего газа были применены средства, отличные по своим фармакологическим свойствам. С учётом повышения активности тромбина и агрегационной функции тромбоцитов в течение эксперимента, были выбраны антикоагулянт ДНК — аптамер ингибитор тромбина (31 ТВА) и антиагрегант с потенциальным воздействием на эндотелий — ацетилсалициловая кислота (АСК). По результатам проведенной работы, представленным в таблице №12, видно, что диапазон полученных изменений от каждого из средств не ограничивался рамками одного звена системы. Оптимизация физиологического состояния отмечалась по ряду параметров, особенно после одновременного применения АСК и аптамера.

Коррекция изменений параметров системы гемостаза и эндотелия, вызванных сероводородсодержащим газом (80 мг/м<sup>3</sup> по сероводороду), М±s

Показатели	Контроль (n=10)	Аптамер (n=15)	АСК (n=15)	Аптамер+АСК (n=15)
NO, мкМ/л	30,1±0,26	30,3±1,52	41,2±0,86 p<0,05	41,5±0,60 p<0,05
ЦЭК, x10 <sup>4</sup> /л	8,3±0,34	8,2±0,24	5,9±0,29 p<0,05	5,7±0,19 p<0,05
Тромбоциты, x 10 <sup>9</sup> /л	617±4,81	616±6,38	762±6,15 p<0,05	771±8,59 p<0,01
ИАТ, %	119,8±3,10	97,1±0,79 p<0,05	86,2±0,86 p<0,01	72,1±0,53 p<0,01
АЧТВ, сек	20,0±0,67	33,3±1,14 p<0,001	23,5±0,71 p<0,05	36,3±0,95 p<0,001
ПВ, сек	11,9±0,57	18,7±1,42 p<0,001	12,9±1,10 p<0,05	21,2±1,48 p<0,001
ТВ, сек	20,4±0,84	32,8±0,92 p<0,001	21,9±1,66 p<0,05	35,6±0,70 p<0,001
ПС, Ед	0,62±0,37	0,62±0,05	0,80±0,12 p<0,01	0,70±0,07 p<0,05
РФМК, мг/100 мл	4,2±0,39	3,3±0,35 p<0,05	3,9±0,53 p<0,05	3,0±0,28 p<0,05
D-Димер, особи	80%	40%	80%	50%
фХПа-ЭЛ, мин	8,9±0,18	7,4±0,44 p<0,01	7,8±0,44 p<0,01	5,5±0,14 p<0,01
ИАП-1, Ед/мл	4,2±0,39	3,0±0,33 p<0,05	3,7±0,15 p<0,05	2,8±0,26 p<0,01

Примечание: p — уровень статистической значимости показателей при сравнении с контрольной группой.

Содержание метаболитов оксида азота (NO) возросло в плазме животных на 36,9% (p < 0,05) после применения АСК, и - на 37,9% (p < 0,05) после АСК+31 ТВА, что говорит об уменьшении выраженности дисфункции внутренней сосудистой выстилки у крыс после 4-месячного действия сероводородсодержащего газа.

В плазме животных после курсового применения АСК отмечено

уменьшение числа циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) на 28,8% ( $p < 0,05$ ), и — на 31,3% ( $p < 0,05$ ) после АСК+31 ТВА. Данные свидетельствуют о повышении восстановительных возможностей со стороны эндотелия на фоне приёма АСК и стабилизации поврежденных клеточных мембран после хронического воздействия сероводородсодержащего газа.

Количество тромбоцитов возросло после курса АСК на 23,5% ( $p < 0,05$ ), АСК+31 ТВА — на 25% ( $p < 0,01$ ). Аптамер в самостоятельном применении на число тромбоцитов достоверно ( $p > 0,05$ ) не повлиял.

Учитывая высокую корреляционную взаимосвязь между спонтанной (САТ) и индуцированной (ИАТ) агрегацией тромбоцитов (таблица 11), исследование активности пластинок крови проведено по показателю ИАТ, так как данный тест отражает и потенциальные функциональные возможности тромбоцитов. Выраженность ИАТ уменьшилась после АСК на 28% ( $p < 0,01$ ), после АСК+31 ТВА — на 39,8% ( $p < 0,01$ ). В данном случае агрегационную активность пластинок крови в определенной степени понизил и аптамер — на 18,9% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 18).

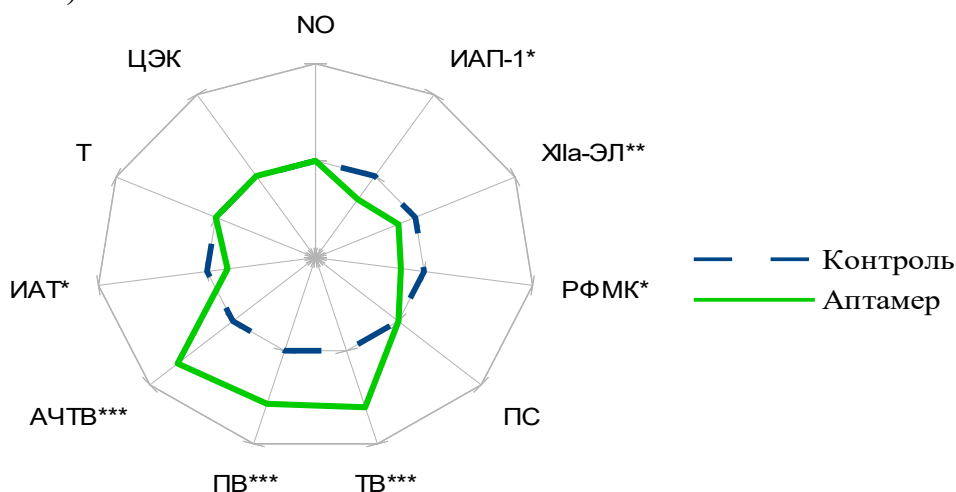


Рисунок 18. Коррекция изменений параметров системы гемостаза и эндотелия, вызванных сероводородсодержащим газом ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду) ДНК-аптамером ингибитором тромбина

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



Возможность коррекции внутреннего пути активации свёртывания было исследовано по показателю АЧТВ. Учитывая высокую силу корреляционной взаимосвязи между АЧТВ и КВ (таблица 11), выбор был сделан в пользу показателя в условиях, и стандартной (каолином), и фосфолипидной (кефалином) активации данного пути, наиболее естественном в живых системах. Так, замедление коагуляции наблюдалось после применения аптамера на 66,5% ( $p < 0,001$ ). Курсовой приём АСК животными также отразился на состоянии компонентов плазменного звена гемостаза в виде замедления АЧТВ на 17,5% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 19). Одновременное применение АСК и аптамера увеличило данный параметр на 81,5% ( $p < 0,001$ ).

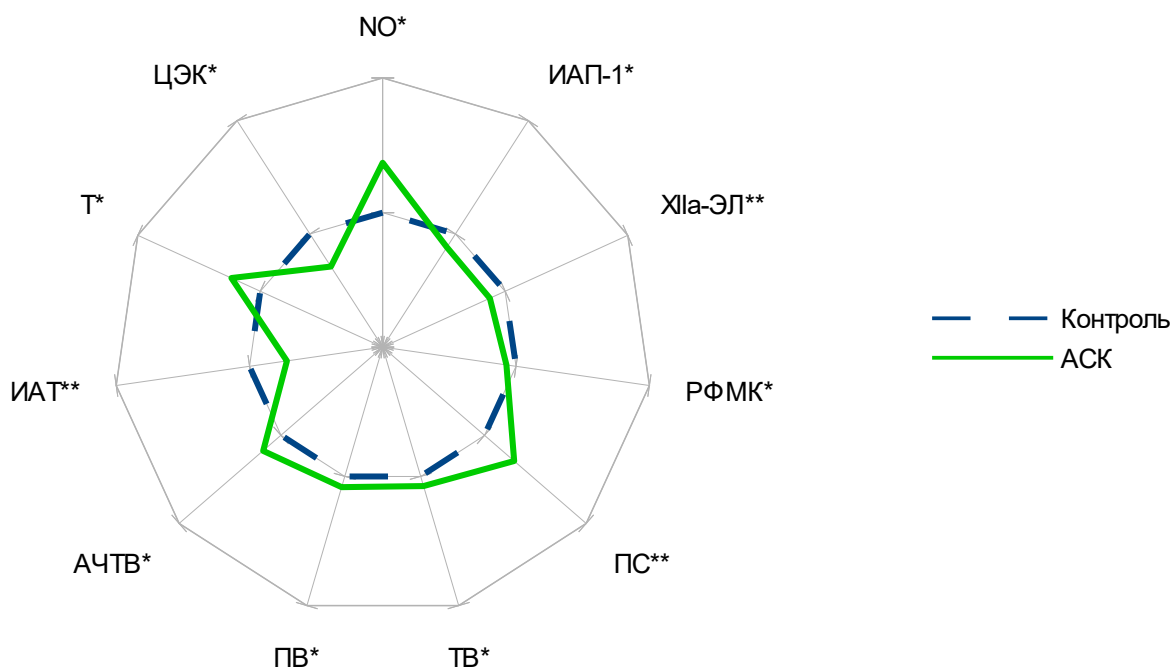


Рисунок 19. Коррекция изменений параметров системы гемостаза и эндотелия, вызванных сероводородсодержащим газом ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду) ацетилсалициловой кислотой (АСК)

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

Время коагуляции по внешнему пути, протромбиновое время (ПВ),

замедлилось после применения аптамера на 57,1% ( $p < 0,001$ ), после АСК — на 8,4% ( $p < 0,05$ ) и — на 78,2% после АСК+31 ТВА (рисунок 20). Данные указывают на способность АСК замедлять образование протромбиназного комплекса, но менее выраженную.

Принимая во внимание прямую сильную корреляционную связь показателей тромбинового (ТВ) и эхитоксового (ЭВ) времени (таблица 14), состояние конечного этапа гемокоагуляции определяли под влиянием тромбина, стандартизированного по активности - по показателю ТВ. После применения аптамера отмечалось замедление на 60,8% ( $p < 0,001$ ) данного параметра по сравнению с контрольной группой. После приёма АСК было также отмечено увеличение ТВ на 7,4% ( $p < 0,05$ ). Выраженное замедление времени фибринообразования зарегистрировано после АСК+31 ТВА — на 74,5% ( $p < 0,001$ ) (рисунок 20).

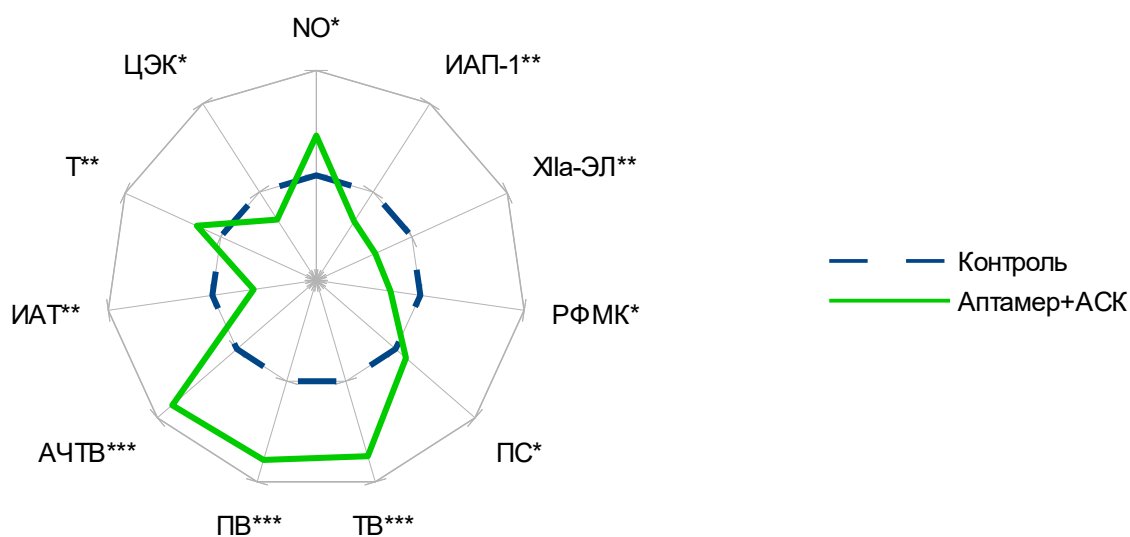


Рисунок 20. Коррекция изменений параметров системы гемостаза и эндотелия, вызванных сероводородсодержащим газом ( $80 \text{ мг/м}^3$  по сероводороду) применением АСК+ аптамера

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

На активность естественных противосвёртывающих компонентов системы протеина С (ПС) заметно повлияла АСК, увеличив данный показатель на 29% ( $p < 0,01$ ) (рисунок 19). Не изменилось состояние ПС после аптамера. Совместное применение АСК и ингибитора тромбина повысило активность показателя на 12,9% ( $p < 0,05$ ).

Содержание внутрисосудистого маркера тромбинемии, РФМК, на фоне приёма аптамера понизилось на 21,4% ( $p < 0,05$ ), после АСК — на 7,1% ( $p < 0,05$ ). Значительно уменьшилась концентрация данного показателя после приёма АСК+31 ТВА — на 28,6% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 20).

На фоне применения средств коррекции тромбоцитарно-сосудистого и коагуляционного звеньев системы геостаза была отмечена положительная динамика состояния параметров фибринолитической системы. Так, в таблице 14 показано, что продукт лизиса поперечношпиготого фибрина, D-димер, после применения аптамера превышал пороговое значение 500 нг/мл у 40% крыс, а после АСК+31 ТВА — у 50% животных.

Активность ингибитора активатора плазминогена-1 (ИАП-1) была понижена в группе применения аптамера на 28,6% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. АСК понизила значение показателя на 11,9% ( $p < 0,05$ ). После применения АСК+31 ТВА подавление активности ИАП-1 было отмечено на 33,3% ( $p < 0,01$ ) (рисунок 19). Данные указывают на подавление ингибирующего влияния данного показателя на фибринолиз, а также на уменьшение дисфункции эндотелия, так как содержание ИАП-1 в плазме отражает секреторную активность клеток внутренней выстилки сосудов (рисунок 20).

Ускорение фибринолиза было отмечено по показателю фХIIа-зависимого эуглобулинового лизиса (фХIIа-ЭЛ), который уменьшился в группе крыс после применения ДНК-аптамера на 16,9% ( $p < 0,01$ ) (рисунок 18). Сокращение времени лизиса сгустка в эуглобулиновой фракции было отмечено после курсового приёма АСК на 12,4% ( $p < 0,05$ ). Выраженное уменьшение фХIIа-ЭЛ было отмечено после применения АСК+31 ТВА на 38,2% ( $p < 0,01$ ) (рисунок 20).

В целом, после применения средств коррекции параметров системы гемостаза и эндотелия в группах 4-месячного воздействия сероводородсодержащего газа отмечалась положительная динамика состояния по ряду параметров. В результате применения антиагреганта АСК была отмечена оптимизация состояния не только тромбоцитов, но и эндотелиоцитов, времени коагуляции по внешнему и внутреннему путям. Приём подавляющего активность фIIa аптамера подавлял гиперагрегационную напряженность плоских пластинок крови, отражая последствия блокировки множественных эффектов тромбина. Указанные изменения заметнее были выражены после одновременного применения АСК и 31 ТВА, что дополнительно способствовало активации системы фибринолиза.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Процессы формирования тромбозов продолжают оставаться одной из социально направленных исследовательских задач медицины на сегодняшний день. Принимая во внимание возрастающий интерес к действию сероводорода на сердечно-сосудистую систему (Бариева Б. Ш., 1999; Эсаулова Т. А., 2009; Kohno et al., 1991; Moore et al., 2003; Russell M. J., Olson K. R., 2004; Ali M.Y. et al., 2006; Zhao et al., 2001; Petras M. et al., 2014; Roberta d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2013) и неоднозначность выявляемых реакций со стороны системы крови, в настоящем исследовании была проведена серия экспериментов с целью изучения характера реагирования параметров систем гемостаза и фибринолиза на хроническое воздействие сероводородсодержащего газа Астраханского месторождения.

В данной работе раскрывается многоуровневая реакция системы гемостаза на хроническое действие ССГ.

После первых двух месяцев затравки в плазме животных нарастало количество NO — метаболитов, во второй опытной группе оно было больше 48,7% ( $p < 0,001$ ), чем в контроле. При увеличении периода воздействия газа обозначилась тенденция к уменьшению NO — метаболитов, сократившись в четвёртой группе почти до контрольных величин, но на 3,2% ( $p < 0,01$ ) ниже цифр в третьей группе. Эти данные косвенно свидетельствуют об активации эндотелия на ранних сроках (1 и 2 месяца) эксперимента. В частности, стимулируются и конститутивные (cNOS), и индуцибельные (iNOS) формы NO-синтаз, учитывая накопление продуктов общего оксидативного стресса (Мажитова М. В., 2012; Беднов И. А., 2007; Лужников Е. А., 2002).

На повреждение эндотелия указывает также увеличение содержания слущенных циркулирующих эндотелиоцитов в плазме крыс через 4 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа - на 80,4% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольной группой.

В ходе оценки влияния газа на тромбоцитарное звено определилась тенденция к снижению количества тромбоцитов в периферическом кровяном русле исследуемых животных. Снижение статистически значимое наблюдалось после двух месяцев воздействия газа — на 5,1% ( $p < 0,05$ ), а после четырёх месяцев затравочного периода - на 19% ( $p < 0,05$ ).

Не значимое статистически изменение количества кровяных пластинок спустя месяц от начала затравки ССГ говорит о сохраняющихся компенсаторных возможностях организма, наличии резервного выброса исследуемых клеток из депо селезёнки (Алексеев Н.А., 2005, Wenz В., 1993, Sihler К.С., 2009; Kaushanskyk, 2005). А по мере продолжения влияния ССГ полученные данные указывают истощение защитного резерва организма.

Обладая высоковыраженной липофильностью в первый месяц, ССГ проявлял антиагрегационные свойства. Без дополнительных молекул-переносчиков, ССГ проникает через мембрану тромбоцитов посредством повышения подвижности липидных молекул (Салихов М. Н., 1990г; Тризно Н.Н., 1989, 1993, 2003; Резник Н. Л., 2009), препятствуя сначала высвобождению содержимого гранул, накапливаясь в тромбоцитах, «оттягивая» момент их активации, который проявится позднее в виде уже хорошо изученной «реакции высвобождения» (Bawaz М., Langer Н, May А. Е., 2005). Действие газа на тромбоциты в нашем исследовании проявляется уменьшением показателей агрегации пластинок крови: индуцированной - на 23,2% ( $p < 0,01$ ) и спонтанной - на 58,2% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольной группой.

Одновременно ССГ оказывает повреждающее действие и на эндотелиальную выстилку сосудов (Шишкина Т.А., 2009). Известно, что при эндотелиальной дисфункции происходит непосредственно повышение проницаемости эндотелия, а значит — и увеличение расстояния между эндотелиоцитами, что влечёт за собой смену электрозаряда клеток с отрицательного на положительный, обеспечивая инфильтрацию лимфоцитами эндотелия (Панченко Е. П., 2005). Всё это создаёт все условия для выброса

тканевого фактора и мембранного белка клеточной адгезии Р—селектина (Bombeli, T, Schwartz B. R, Harlan. J. M. 1998; Gawaz M, Langer H, 2005; Begmeier W, 2007;). Поврежденный эндотелий запускает процесс гемостаза (Gertz с соавт, 1981). Характерные для этого механизма последующие процессы адгезии тромбоцитов к сосудистой стенке запаздывают: ИАТ увеличивается с  $18,1 \pm 0,52$  до  $22,3 \pm 0,56$  секунд через 1 месяц действия газа. Антиагрегационным действием обладают и NO — метаболиты, количество которых возросло в данный период. В то же время запускается механизм потребления плазменных факторов коагуляционного каскада, о чём говорит удлинение в первой опытной группе КВ на 17,2% ( $p < 0,01$ ), АЧТВ — на 15,8% ( $p < 0,01$ ), ПВ — на 11,9% ( $p < 0,01$ ), ТВ — на 12,1% ( $p < 0,01$ ), ЭВ — на 15,2% ( $p < 0,01$ ). Процесс высвобождения тканевого фактора произошёл уже после обнажения субэндотелиального слоя и увеличения расстояния между эндотелиоцитами и послужил одним из пусковых моментов к началу потребления плазменных факторов и сдвигу гемостатического баланса в прокоагулянтную сторону. В первый и второй месяцы эксперимента недостаточно активируются тромбином через обратные связи фVIII, фIX, фXI, фXII. Первые порции образующегося тромбина инактивируются тромбомодулином, с которым он образует комплекс и фиксируется на эндотелии (Patrono C., Vachmann F. et. al., 2004). В таком инактивированном состоянии прямая функция тромбина преобразовывать фибриноген в фибрин исключена. Но в тысячи раз увеличена другая — активировать антикоагулянт протеин С (Панченко Е. П., Добровольский А. Б., 1999; Dahlback B., Villoutreix V. O., 2005). 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. В четвёртой опытной группе

существенно укорачивается время параметров плазменного звена гемостаза, особенно показателей тромбинового (на 10,9%,  $p < 0,05$ ) и эхитоксового (на 11,7%,  $p < 0,05$ ) времени. Данные показатели указывают именно на конечный этап свёртывания крови, когда под влиянием тромбина (стандартизованного в тесте ТВ и преобразованного в мейзотромбин в тесте ЭВ) происходит превращение фибриногена в фибрин (Баркаган З. С, Момот А. П., 2008).

Замедление на первых сроках эксперимента времени свёртывания происходило в результате активации системы фибринолиза. В нашем исследовании это видно на показателе фХIIа-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 (Грицюк А. И. с соавт., 1994; Шиффман Ф. Дж., 2000).

Запуск процесса гемостаза происходит неодновременно и в неравной степени в сосудистой системе организма (Альфонсов В. В. с соавт., 1973; Люсов В. А., 1973). С этой позиции имеет значение и наша методика исследования именно венозной крови, учитывая значение тромбоцитарной реакции в венозной крови.

В начальный период своего токсического воздействия ССГ оказывает антиагрегационный эффект. Это видно по замедлению времени ИАТ на 23,2% ( $p < 0,01$ ) в первой опытной группе. В это время тормозится дегрануляция



тромбоцитов из-за накапливающегося ССГ, а также роста NO-метаболитов. По мере увеличения периода токсического воздействия ССГ, активизируются тромбоциты после запуска активации фосфолипазы А2 и последующего эйкозаноидного пути, для которого субстратом служит арахидоновая кислота, в результате чего увеличивается генерация тромбоксана А2, а следовательно и агрегационная функция тромбоцитов. Об этом говорит ускорение ИАТ на 20% ( $p < 0,01$ ) и увеличение САТ на 80,3% ( $p < 0,001$ ) в четвёртой группе по сравнению с контрольной. Дополнительно усиливает готовность к агрегации известное свойство тромбоцитов при активации образовывать циркулирующие комплексы с лейкоцитами благодаря Р-селектину, появляющемся на их поверхности (Begmeier W., Wagner D., 2007; Croce K, Sakuma M., Simon P. Y., 2008). Так, ускорилось время ИАТ на 29,4% во второй опытной группе по сравнению с первой. В четвёртой группе этот показатель стал на 7,8% быстрее, чем в третьей группе.

Специфичность реакции системы гемостаза на ССГ проявляется в виде длительной сохранности функциональной активности тромбоцитов, повышения её в отличие от типично протекающего ДВС — синдрома, когда в кровотоки попадают уже участвовавшие в тромбообразовании пластинки крови (Алексеев Н. А., 2005; Мазур Э. М., 2007).

Можно заключить, что  $H_2S$  обладает тромбинной активностью. С момента активации тромбоцитов, начала дегрануляции, в микроциркуляторном русле становится эффективной, индуцированная тканевым фактором и, возможно, фактором Виллебранда, коагуляция, где запускается механизм тромбообразования через активацию факторов плазменного звена гемостаза. Формируется образование тромбина сначала в малом количестве, но достаточном для активации и продолжения самосборки. Через реакции обратной связи тромбин активизирует фV, фVIII, фXIII. Но одновременно делает активным и протеин С, который, обладая противосвёртывающими свойствами, инактивирует фVa и фVIIIa, а следовательно и фибринолиз впоследствии (Кузник Б. И., 2015; Mann, 1990, Rosing, 1997). Это ещё одна из причин того, что на начальных этапах воздействия

ССГ быстро активизируется фибринолитическая система. В рамках данного исследования проводилось изучение активности системы протеина С у крыс на протяжении всего затравочного периода. Прослеживалась тенденция к увеличению активности этого показателя. Сначала - на 35,7% ( $p < 0,05$ ) в первой опытной группе, потом возрастание активности замедлилось, увеличившись на 37,1% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольной группой. В группе после 4-х месяцев воздействия ССГ уровень ПС уменьшился на 11,4% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем. Закономерно, что с увеличением активности тромбина, уменьшалась и активность протеина С.

За первые два месяца воздействия сероводородсодержащего газа увеличились показатели АЧТВ (на 24,7%,  $p < 0,001$ ), ПВ (на 22,7%,  $p < 0,01$ ), ТВ (на 11,9%,  $p < 0,01$ ), КВ (на 20,3%,  $p < 0,001$ ) и ЭВ (на 29,5%,  $p < 0,001$ ). Данные изменения произошли на фоне активации естественной противосвёртывающей системы протеина С и фибринолитической системы путём секреции активаторов плазминогена эндотелием в условиях хронического действия газа, провоцирующими дисфункцию эндотелия (Derwall M. et al., 2011; Hermann A. et al., 2012).

В дальнейшем, по мере продолжительности влияния ССГ нарастает количество тромбина в плазме. Активированный тромбин становится самостоятельным и дополнительным активатором тромбоцитов, путём воздействия на их рецепторы (D'Emmanuele di Villa Bianca R. et al., 2013). Тромбоциты, в свою очередь, в сложившихся условиях становятся более чувствительными к тромбину. Последний помимо стимуляции клеточного звена гемостаза увеличивает и прокоагулянтный потенциал плазменного звена (Jandrotperus M., Bouton, M. C., 1996). А именно, преобразует фибриноген в фибрин, на что указывает уменьшение времени свёртывания АЧТВ на 16,8% ( $p < 0,05$ ) в третьей группе по сравнению со второй. Тромбин активизирует ИАП-1 на 14,8% ( $p < 0,05$ ) уже во второй опытной группе по сравнению с контролем, что повлекло за собой снижение активности плазмина, замедление фибринолиза (на

9,2%,  $p < 0,05$ ) во второй группе и накопление РФМК (на 15,2% ( $p < 0,05$ ) в третьей группе и на 27,3% ( $p < 0,01$ ) - в четвертой), D-димера (у 16,7% (2 особи) животных превышал пороговое значение в 500 мкг/мл во второй группе, и у 80% особей - в четвертой опытной группе).

К четвертому месяцу ингаляции ССГ происходит истощение фибринолитической системы, особенно под влиянием активации синтеза ИАП-1, ингибитора активатора плазминогена-1 сосудистой эндотелиальной прослойкой. Его продукция (и последующее торможение лизиса фибриновых отложений) активируется тромбином и экзотоксином, которым в нашем исследовании является ССГ. Затем он депонируется в тромбоцитах в неактивированной форме (Грицюк А. И. с соавт., 1994; Тимербаев В. Н. с соавт., 2013; Шиффман Ф. Дж, 2000).

Запускаемый тромбином ИАП-1 является белком острой фазы. Активность данного показателя возрастала по мере продолжительности воздействия ССГ, увеличившись по сравнению с контрольной группой в четвертой опытной на 55,6% ( $p < 0,01$ ), замедляя процессы фибринолиза.

С увеличением времени хронического воздействия сероводородсодержащего газа увеличивалась активность ИАП-1, уменьшалась активность плазминогена, вследствие ингибирования последнего (косвенно по показателю ИАП-1) (Грицюк А. И., Амосова Е. Н., 2004; Куприна А. А., Упницкий А. А., 2004). Через месяц ингаляции ССГ, в первой опытной группе, время лизиса по внутреннему пути активации плазминогена (по показателю фХIIa-ЭЛ) было ускорено на 14,5% ( $p < 0,01$ ). Через 3 месяца, в третьей группе, время лизиса замедлилось на 8,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению со второй группой. По истечении 4-месячного периода затравки время лизиса замедлилось на 18,7% ( $p < 0,01$ ) в сравнении с контролем. Данная динамика колебания времени лизиса сгустка не менялась при добавлении стрептокиназы, что позволило убедиться в значении плазминогена в этой реакции. Ускорение времени лизиса сгустка в группе, подвергшейся одному месяцу затравки газом, говорит о возросшем потреблении

имеющихся запасов плазминогена, о включении срочных механизмов адаптации и активации фибринолиза. Но увеличение активности ингибитора этого процесса, ИАП-1, приводит к постепенному снижению активности плазминогена. Время лизиса эуглобиновой фракции увеличивается, а скорость реакции замедляется.

Известной весомой ролью в активации процессов гемостаза обладает ионизированный кальций ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Во — первых, с участием которого происходит связывание и активизация фVII и тканевого фактора на тромбоцитах, активизация и фXI, фIX. И активирование протромбинового комплекса- фV и фX. Также этот элемент укрепляет фибриновый сгусток (Кузник Б. И., 2010; Зубаиров Д. М., 2000). Имеются подтверждения влияния  $\text{H}_2\text{S}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -обменник и снижение величины  $\text{Ca}^{2+}$ -токов через них с последующим повышением содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в экстрацеллюлярном пространстве (Смаглий Л. В., 2015; Gu Y, Shi S., 2016; ).

Во — вторых, увеличение содержания кальция может быть реализовано и за счёт тромбоцитов. После их активации ионизированный кальций свободно поступает из гранул тромбоцитарных в плазму, добавляя, таким образом, условий для изменения коагуляционного потенциала плазмы в сторону увеличения.

В-третьих, сероводород провоцирует развитие ацидоза, которое выступает в роли самостоятельного повреждающего фактора. Как известно, сам по себе ацидоз увеличивает количество  $\text{Ca}^{2+}$  (Demaret D., Mialuire I., 1974). В дальнейшем кровь меняет свой гемостатический потенциал.

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 21 указаны только сильные прямые и обратные связи. Полный перечень исследований приведен в таблице 11. В прямой сильной корреляции находились показатели повреждения эндотелиоцитов и маркеры тромбинемии. Так, ЦЭК и и РФМК ( $r = 0,932$ ;  $p = 0,021$ ), ЦЭК и ингибитор активатора фибринолиза (ИАП-1) ( $r = 0,949$ ;  $p = 0,014$ ), указывающие на то, что

на фоне хронического воздействия ССГ увеличивалась степень повреждения эндотелия, стимулирующая активацию тромбина, ведущего к высвобождению ИАП-1 тромбоцитами и эндотелием в плазму. В обратной сильной корреляционной связи на фоне действия газа находилось количество циркулирующих в плазме эндотелиоцитов и тромбоцитов ( $r = -0,955$ ;  $p = 0,011$ ), указывающие на усиление процессов адгезии и потребления тромбоцитов на фоне усиливающегося повреждения эндотелия (рисунок 21).

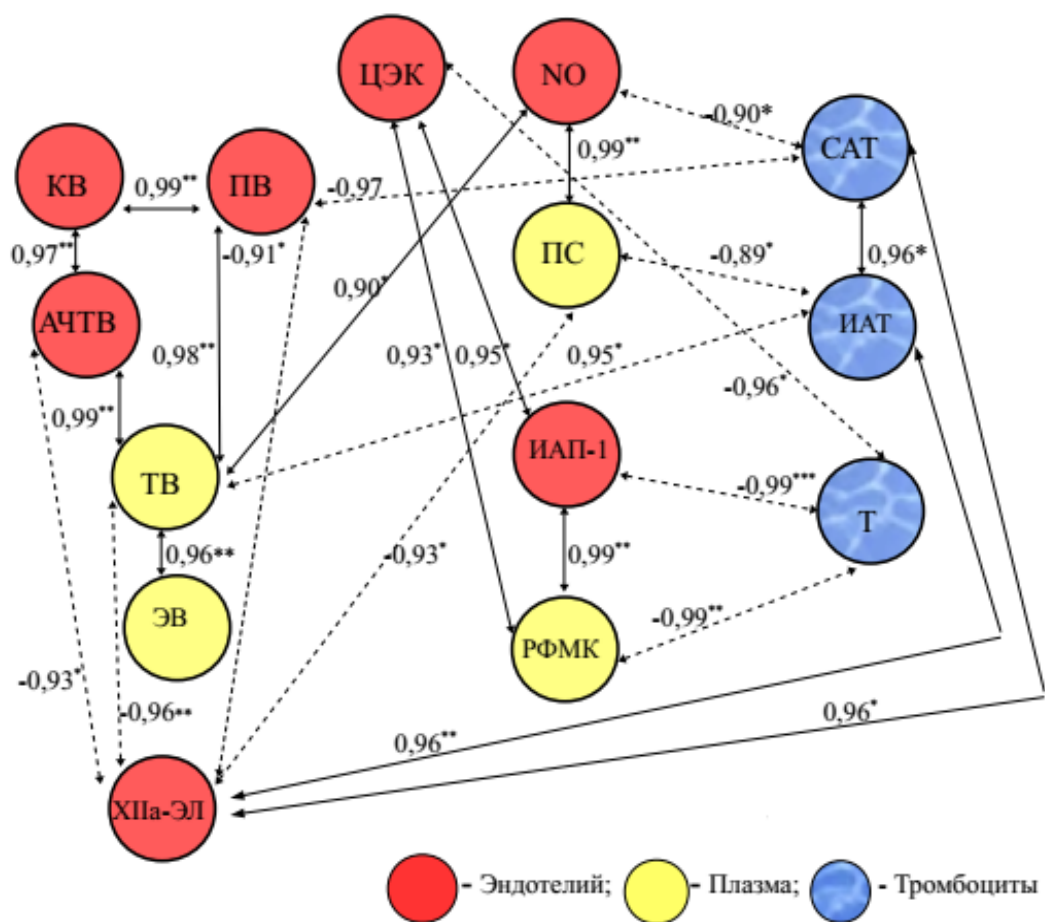


Рисунок 21. Корреляционные взаимосвязи между параметрами системы гемостаза и эндотелия на фоне хронического воздействия сероводородсодержащего газа ( $80 \text{ мг/м}^3$ )

Примечание:  $\longleftrightarrow$  - прямая связь;  $\dashrightarrow$  - обратная связь.

\*-  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,002$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

Динамика изменения NO — метаболитов на фоне 4-месячного периода затравки находилась в прямой сильной взаимосвязи с естественными антикоагулянтами системы протеина С ( $r = 0,986$ ;  $p = 0,002$ ), активность которых на ранних сроках действия ССГ (1-2 месяца) увеличивалась, а на поздних (3-4 месяца) — уменьшалась, что способствовало росту гиперкоагуляционной напряженности плазмы крыс. В прямой сильной корреляции метаболиты оксида азота находились с показателями конечного этапа фибринообразования, тромбиновым ( $r = 0,903$ ;  $p = 0,036$ ) и эхитоксовым ( $r = 0,919$ ;  $p = 0,027$ ) временем, что проявлялось увеличением параметров на ранних и — уменьшением на поздних сроках действия поллютанта.

Показатели функционального состояния эндотелия (NO) и тромбоцитов (САТ) находились в обратной высокой корреляционной связи ( $r = - 0,902$ ;  $p = 0,036$ ), что отражалось в увеличении степени агрегации на фоне понижения содержания метаболитов оксида азота по мере увеличения периода затравки ССГ.

В обратной выраженной корреляционной связи на протяжении хронического эксперимента находились параметры тромбоцитарного и плазменного звеньев системы гемостаза. Так, САТ и показатель внешнего пути коагуляции (ПВ) ( $r = - 0,973$ ;  $p = 0,005$ ), индуцированная агрегация тромбоцитов (ИАТ) и ПС ( $r = - 0,893$ ;  $p = 0,041$ ), ИАТ и ТВ ( $r = - 0,948$ ;  $p = 0,014$ ) коррелировали с обратной выраженной силой связи. Агрегационная активность тромбоцитов росла на фоне уменьшения времени свёртывания и понижения активности естественных антикоагулянтов по мере продолжительности действия ССГ.

Активность системы фибринолиза снижалась, в отличие от системы свёртывания, с увеличением продолжительности хронического эксперимента. В обратной выраженной взаимосвязи находились фХIIa-ЭЛ и АЧТВ ( $r = - 0,934$ ;  $p = 0,020$ ), фХIIa-ЭЛ и ПВ ( $r = - 0,910$ ;  $p = 0,032$ ), фХIIa-ЭЛ и ТВ ( $r = - 0,955$ ;  $p = 0,011$ ). Скорость лизиса эуглобулинового сгустка значительно коррелировала с функциональной активностью тромбоцитов. С увеличением срока ингаляции ССГ увеличивалось и время фХIIa-ЭЛ, и степень индуцированной агрегации пластинок

крови (ИАТ) ( $r = 0,963$ ;  $p = 0,009$ ) (рисунок 15).

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

Для изучения механизма воздействия поллютанта на живом организме, учитывались данные литературы об активирующем тромбоцитарную фосфолипазу А2 действии сероводорода *in vitro* (D'Emmanuele di Villa Bianca R. et al., 2013). Учитывая повышение агрегационной готовности через 4 месяца воздействия ССГ, была выбрана ацетилсалициловая кислота (АСК) в качестве средства коррекции данного звена системы гемостаза. Принималась во внимание способность её прерывать следующий за активацией фосфолипазы А2 каскад реакций арахидоновой кислоты путем блокировки циклооксигеназы — 1 (ЦОГ-1), участвующей в данной цепи реакций.

Кроме того, исследования последних лет расширили представление об антиагрегационном механизме АСК, описав ее участие в синтезе NO (Цепелев В. Ю. с соавт., 2009; Gilroy D. W., 2005; Paul – Clarc M. et al., 2004). Путём модификации метаболизма циклооксигеназы АСК стимулирует синтез 15-эпилипксина А4 тромбоцитами, который активирует эндотелиальную (eNOS) и индуцибельную (iNOS) NO — синтазы, повышая продукцию оксида азота (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. Наличие специфического антидота, низкая

аллергогенность и высокая точная направленность действия дают значительные преимущества аптамерам перед схожими по функциям антителам и антикоагулянтам прямого действия (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 проведённого исследования хронического воздействия сероводорода стало очевидным положительное преимущественное влияние АСК на тромбоцитарное, а аптамера — на плазменное, вовлекающее впоследствии и клеточные звенья гемостаза. АСК увеличила число тромбоцитов на 23,5% ( $p < 0,05$ ) в четвёртой опытной группе. В то же время одновременное применение АСК и аптамера способствовало увеличению пластинок крови - на 25% ( $p < 0,01$ ). Несмотря на специфическое ингибирование тромбина, на фоне снижения прокоагулянтных свойств плазмы, в виде снижения выброса из гранул тромбоцитов коагулостимулирующих веществ, ярче и быстрее проявляются эффекты инактивации тромбина. И здесь наблюдается если не потенцирование, то суммация эффектов воздействия двух средств. Аптамер на число тромбоцитов существенно не повлиял. Положительным оказалось его гипоагрегационное действие: степень ИАТ уменьшилась на 18,9% ( $p < 0,05$ ). АСК+аптамер понизили ИАТ на 39,8% ( $p < 0,01$ ). Данные указывают на влияние аптамера на данный параметр. Через блокирование тромбина, ингибируются реакции образования фибрина из фибриногена, активация фV, фVIII, фXIII, а также тромбиноиндуцированная агрегация тромбоцитов, которая происходит путем воздействия на PAR - рецепторы пластинок крови (Hung D. T., Wheaton V. Y. Coughlin S. R. 1991; Kahn M. L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M. J., 1999 Coughlin S. R., 2005; Bahau W. F., 2007). При одновременном применении двух средств АСК, стабилизирует мембрану тромбоцитов в условиях отсутствия активации со стороны тромбина, что проявляется в более выраженных гипоагрегационных изменениях.

Кроме того, в группе применения АСК у крыс уменьшилась выраженность



дисфункции эндотелия, что проявилось в увеличении NO — метаболитов в плазме крыс 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 (Oberle S., 1998; Nagele E. et al., 2005) на фоне действия ССГ.

На факторы плазменного звена гемостаза аптамер оказал существенное значение через ингибирование тромбина. Увеличились показатели АЧТВ под влиянием АСК+аптамер 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% ( $p < 0,001$ ).

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

Влияние АСК на плазменные факторы гемостаза является следствием уменьшения активирующего влияния тромбоцитов через стабилизацию тромбоцитарного звена, плюс связывание кальция плазмы. Уменьшая каталитическую активацию тромбоксаном А<sub>2</sub> метаболизм арахидоновой кислоты, укрепляются мембраны тромбоцитов и угнетается «реакция высвобождения», которая в активной форме происходит после четырёх месяцев воздействия сероводородсодержащего газа (CUIRE, 2001; Явелов И. С., 2006; Курлянская Е. К. с соавт., 2007; Кропачева Е. С., 2008; Аверков О.В., 2009; Лупанов В. П., 2009; Faraday V. et al., 2007). АСК устраняет одно из условий активации плазменных факторов — тромбоцитарные факторы. Но остаётся другое условие — посредством обратных связей самим тромбином (Струкова Е. А., 1989; Vode 1997; Guinto 1997; Fentch 1995; Stubbs, 1993), который, исходя из наших данных, синтезирован уже в данной опытной группе в достаточном количестве. Данное условие имеет ещё большее значение. Этим объясняется положительный эффект аптамера, главная функция которого состоит в ингибировании тромбина.

Под влиянием аптамера увеличилось на 57,1% ( $p < 0,001$ ) протромбиновое время, на 66,5% ( $p < 0,001$ ) - АЧТВ, ТВ — на 60,8% ( $p < 0,001$ ) — показатели

коагуляционного звена системы гемостаза.

Значительнее цифры, указывающие на сдвиг гемостатического баланса из прокоагулянтной в антикоагулянтную сторону получились на фоне одновременного применения АСК и аптамера. Возрос показатель АЧТВ на 81,5% ( $p < 0,001$ ). Протромбиновое время увеличилось на 78,2% ( $p < 0,001$ ), тромбиновое время — на 74,5% ( $p < 0,001$ ).

Одновременное воздействие АСК и аптамера на два звена гемостаза: клеточный и коагуляционный при хронической ингаляции ССГ повлияли в результате на третье — фибринолитическое. В группе применения аптамера отмечено снижение активности ИАП-1, преимущественно индуцируемой тромбином, на 28,6% ( $p < 0,05$ ). Достоверно уменьшилась активность данного ингибитора после одновременного применения АСК+аптамер - на 33,3% ( $p < 0,01$ ).

Менее изменилась динамика фХII-а-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. Возможно, происходит высвобождение активаторов плазминогена, которые активируют фибринолиз и разрушают образующийся фибрин. Подавляется функциональная активность фибриногена, приводящая к ингибированию образования фибрина, а, следовательно, и — продуктов его деградации — D - димеров.

Таким образом, одновременное применение АСК и аптамера в группе после четырёх месяцев воздействия ССГ направило гемостатический потенциал в антикоагулянтную сторону. Активность протеина С (ПС) после применения АСК увеличилась на 29% ( $p < 0,01$ ). Аптамер на данный показатель не повлиял.

Увеличение активности ПС в группе применения АСК объясняется отсутствием ингибирования главного активатора — тромбина, его продолжающимся стимулирующим действием на протеин С.

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 поперечносшитого 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 месяцы) и выраженная гиперкоагуляция - в более поздний период (34 месяцы).

2. Через 1 месяц хронического воздействия ССГ (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 плазминогена), фибринолитической системы (фХIIa-зависимый эуглобулиновый лизис) и гипофункции тромбоцитов (снижение степени спонтанной и индуцированной агрегации тромбоцитов).

3. Через 2 месяца хронического воздействия ССГ 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 фХIIa-зависимого эуглобулинового лизиса) на фоне формирующейся тромбоцитопении.

4. Через 3 месяца хронического воздействия ССГ 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 фХIIa-зависимого эуглобулинового лизиса) и эндотелия (снижение активности тканевых активаторов плазминогена, NO - синтаз).

5. Через 4 месяца хронического воздействия ССГ 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 фХIIа-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.

## 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 (С, S)
РФМК -	растворимые фибрин-мономерные комплексы
САТ -	спонтанная агрегация тромбоцитов
ССГ -	промышленный природный сероводородсодержащий газ Астраханского месторождения
Т -	количество тромбоцитов
ТВ -	тромбиновое время
ТФ -	тканевой фактор
УИА -	универсальный индуктор агрегации
ФХIIa-ЭЛ -	фХIIa-зависимый эуглобулиновый лизис
ЦЭК -	циркулирующие (десквамированные) эндотелиоциты
ЭВ -	эхитоксовое время бедной тромбоцитами плазмы
NO -	суммарные метаболиты оксида азота
31 ТВА -	thrombin binding aptamer, 31-цепочечный ДНК аптамер – ингибитор тромбина

### Список литературы

1. Абакумов, М. М. Оксид азота и свертывающая система крови в клинике / М. М. Абакумов, П. П. Голиков // Вестник РАМН. - 2005. - № III. - С. 53-56.
2. Агаджанян, Н. А. Экологические аспекты бронхолегочной патологии Волжского Поволжья / А. Н. Агаджанян, И. Н. Полуниин, Г. А. Трубников. - Астрахань, АГМА, 2000. - 168 с.
3. Адф-индуцированная агрегация тромбоцитов у больных с ишемическим инсультом / Н. О. Сараева, Е. О. Андреева, Н. Т. Ковалева, Т. В. Плужникова // Гематология и трансфузиология. - 2012. - № Приложение. - С. 135.
4. Азнаурьян, М. С. Вопросы сульфидной бальнеотерапии // М. С. Азнаурьян // Тезисы докладов межкурортной науч. - практ. конференции. Сочи, 1973. – С.120-122.
5. Айтбаев, Т. Х. Изолированное и комбинированное действие малых концентраций сероводорода и сернистого ангидрида в условиях хронического эксперимента / Т. Х. Айтбаев // Вопросы гигиены труда в нефтяной и нефтеперерабатывающей промышленности. - Алма - Ата. - 1986. - С. 95-108.
6. Алипов, Н. Н. Основы медицинской физиологии / Н. Н. Алипов // - М.: Практика, 2013. – 496 с.
7. Альфонсов, В. В. Влияние различных сдвигов рН на свертывание крови, фибринолиз и агрегацию тромбоцитов в опытах *in vitro* / В. В. Альфонсов, Е. В. Альфонсова, Л. А. Забродина // Учёные записки ЗабГУ. Серия: Естественные науки. 2010. №1. - С. 5-12.
8. Антиагрегантная терапия в предоперационном периоде при коронарном шунтировании / О. Л. Барбараш, Г. П. Плотников, С. В. Иванов и др. // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. - 2014. - Т. 7, № 5. - С. 4-8.
9. Аптамеры биофармацевтические препараты диагностики и терапии нового поколения / Т. Н. Замай, А. С. Замай, А. Б. Салмина, Е. А. Пожиленкова // Сибирское медицинское обозрение. - 2011. - №5.- С. 3-9.



10. Асейчев, А. В. Механизм активации АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов под действием окислительно модифицированного фибриногена / А. В. Асейчев, О. А. Азизова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2004. - Т. 197, № 3. - С. 238-241.

11. Багликов, А. Н. Значение приверженности пациентов к лечению при длительном приеме ацетилсалициловой кислоты у пациентов, перенесших острый коронарный синдром: результаты исследования / А. Н. Багликов, В. В. Рафальский // Кардиология. - 2012. - Т. 52, № 9. - С. 22-28.

12. Баев, В. М. Синдром неспецифических гемореологических нарушений (феномены высокой и низкой вязкости крови) / В. М. Баев // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2001. - № 2. - С. 39-42.

13. Балуда, В. П. Физиология системы гемостаза / В. П. Балуда, Балуда М.В., Диянов И. И., Телешуков И. К. // - М., 1995. - 252 с .

14. Баркаган, З. С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот // М.: Ньюдиамед-АО, 2008. – 292 с.

15. Башков, Г. В. Роль гепарина и активатора плазминогена тканевого типа в адаптации системы гемостаза к условиям высокогорья / Г. В. Башков, Е. А. Лужников // Клиническая токсикология. — М.: Медицина, 1999. — 416 с.

16. Беднов, И. А. Показатели гемической гипоксии и структурной организации сыворотки крови при хроническом воздействии серосодержащего газа / И. А. Беднов, А. Д. Стемпковский // Астраханский медицинский журнал. - 2007. - № 2. - С. 31.

17. Боев, В. М. Сернистые соединения природного газа и их действие на организм / В. М. Боев, Н. П. Сетко // М.: Медицина. - 2001. - 216 с.

18. Бокарев, И. Н. Безопасность разных форм ацетилсалициловой кислоты в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний / И. Н. Бокарев, Л. В. Попова // Consilium Medicum. - 2014. - Т. 16. № 5. - С. 79-84.

19. Бокарев, И. Н. Лабораторные методы исследования системы свертывания крови / И. Н. Бокарев, А. М. Доронина, Т. В. Козлова. // М.: Медицина. - 2011. - 15

с.

20. Боровков, Н. Н. Ацетилсалициловая кислота остается «золотым стандартом» антиагрегантной терапии стабильной стенокардии / Н. Н. Боровков, Н. Ю. Боровкова // Справочник поликлинического врача. - 2014. - № 2. - С. 26-28.

21. Брагин, Л. Х. Влияние длительного нахождения в искусственных гиперкапнических средах на функцию внешнего дыхания и газообмен / Л. Х. Брагин, Ю. И. Воронков, А. Г. Гончарова // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2000. - № 2. - С. 36-39.

22. Бромберг, Б. Б. Агрегационная способность тромбоцитов у больных с острым панкреатитом / Б. Б. Бромберг, В. Ф. Киричук, В. Ф. Свирин // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2009. - №3. - С. 438 -440.

23. Бурмистров, Е. Н. Клиническая лабораторная диагностика. Основные исследования и показатели / Е. Н. Бурмистров // Справочник. - 2002. - 19 с.

24. Бучин, В. Н. Системные основы стресса у работников газовой промышленности / В. Н. Бучин, М. В. Лазько // Вест. новых мед. технологий. - 2002. - Т9, № 2. - С. 56-58.

25. Бышевский, А. Ш. Биохимические компоненты свёртывания крови / А. Ш. Бышевский, О. А. Терсенов, С. Л. Галян // Свердловск: Изд-во Уральского университета. - 1990. - 212 с.

26. Варианты детоксикационных технологий при острых экзо- и эндотоксикозах / Е. А. Лужников, Ю. С. Гольдфарб, М. М. Поцхверия и др. // Матер. науч.-практ. конф. «Заместительное лечение и детоксикация в специализированной интенсивной терапии». — М.: ГВКГ им. Н.Н. Бурденко, 2003. — С. 22-26.

27. Васильев, С. А. Клинико-лабораторная диагностика нарушений функций тромбоцитов / С. А. Васильев, А. Л. Мелкумян, А. Л. Берковский // Москва. - 2013. - 77 с.

28. Вазомоторная функция эндотелия у здоровых лиц: связь с типами характера / В. Ф. Киричук, Е. С. Оленко, А. И. Кодочигова и др. // Физиология человека. - 2015. - Т. 41. № 3. - С. 106-111.

29. Вахов, Е. В. Анализ профессиональной заболеваемости ОАО «Пермский моторный завод» / Е. В. Вахов, О. С. Власова // Материалы Всероссийской науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора 16–18 мая. - Пермь, 2012. - Том 1. - С. 104-106.

30. Вдовин, В. М. Состояние системы гемостаза при различных видах гипоксического и гиперкапнического воздействия: Автореф. дис. канд. мед. наук / В. М. Вдовин. - Барнаул, 2006. – 23 с.

31. Влияние Астраханского газоперерабатывающего завода на загрязнение воздуха производственных помещений и территории / О. В. Бойко, А. Х. Ахминеева, В. И. Бойко, Н. И. Гудинская // Гигиена и санитария. - 2016. - Т. 2. - №95. - С.167-71.

32. Влияние различных режимов однократной гипертермической нагрузки на гемостазиологический профиль крыс в эксперименте *in vitro* / С. В. Москаленко, И. И. Шахматов И. И., В. И. Киселёв, В. Ю. Николаев // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 11 (часть 3) – С. 362-365.

33. Бучин, В. Н. Комплексное социально-гигиеническое исследование здоровья населения в отдельном регионе: Автореф. дисс. докт. мед. наук / В. Н. Бучин. - Москва, 1997. - 34с.

34. Влияние комплекса ацетилсалициловой кислоты и диквертина на агрегацию тромбоцитов и гемореологические параметры у крыс с ишемией головного мозга / М. Б. Плотников, А. В. Ямкин, О. И. Алиев, Н. А. Тюкавкина // Экспериментальная и клиническая фармакология: двухмесячный научно теоретический журнал, 2005. – Т. 68. - №2. – С. 33–35.

35. Влияние сероводорода на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека / И. В. Петрова, О. А. Трубачева, О. С. Мангатаева и др. // Российский физиологический журнал. - 2015. - № 10. - С. 1191-1201.

36. Влияние факторов газоперерабатывающего производства на организм и реабилитационные меры / Р. И. Мангушев, В. С. Полякова, А. И. Луда, Е. Н.

Юрикова // В кн. Неотложные состояния, возникающие при воздействии компонентов газового конденсата Астраханского месторождения, их профилактика и лечение (Сборник научных трудов), ч. 2 - Саратов, 1989. - С. 42-44.

37. Воробьева, Н. М. Новые пероральные антикоагулянты и ацетилсалициловая кислота в лечении венозных тромбоэмболических осложнений / Н. М. Воробьева, Е. П. Панченко // Атеротромбоз. - 2013. - №1. - С. 53-65.

38. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов V - VIII группы / А. Л. Бандиан, Н. В. Волкова, Г. Д. Грехова и др. // Справ. изд. – Л.: Химия, 1989. – 592 с.

39. Ганичева, Л. М. Биофармацевтические аспекты разработки, производства и применения лекарственных препаратов / Л. М. Ганичева, Г. П. Вдовина // Вестник ВолГМУ. - 2012. - Т. 43. - №3. - С. 3-9.

40. Гемостазиологический профиль крыс в постгипертермическом периоде после общей гипертермии высокого уровня / В. Ю. Николаев, И. И. Шахматов, В. И. Киселёв и др. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 11 (часть 6) – С. 1068-1071.

41. Герасимов, А. А. Последние достижения в коррекции функционального состояния эндотелия / А. А. Герасимов // Современные проблемы науки и образования. - 2015. - №3. URL: <https://science education.ru/ru/article/viewid=19398>.

42. Гигиена труда и состояние здоровья рабочих, занятых переработкой природного газа / В. И. Бойко, Ю. И. Доценко, А. Х. Ахминеева, О. В. Бойко // Гигиена и санитария . - Т. 96. - №6. - 2017. - С. 541-548.

43. Гигиеническая оценка формирования нарушения здоровья детского населения при комплексном воздействии факторов окружающей среды в углехимических центрах Кузбасса / Е. В. Коськина, Л. А. Глебова, А. В. Бачина и др. // Фундаментальная и клиническая медицина. - 2016. - №1. - С. 57-63.

44. Гипоксическая гипоксия как фактор, активирующий систему гемостаза / Шахматов И. И., Вдовин В. М., Бондарчук Ю. А. и др. // Бюллетень сибирской

медицины. - 2007. - №1. - С. 67-72.

45. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. - Пер. с англ. - М. - 1999. - 459 с.

46. Гольдфарб, Ю. С. Медикаментозные способы профилактики осложнений гемосорбции у больных с экзо- и эндотоксикозами / Ю. С. Гольдфарб, И. А. Бурькина, К. К. Ильяшенко // Матер. IV республ. конф. «Сорбенты медицинского назначения и механизмы их лечебного действия». — Донецк. - 1988. — С. 256-257.

47. Давыдова, А. С. Эскорт-аптамеры: новые инструменты для направленной доставки лекарственных препаратов в клетки / А. С. Давыдова, М. А. Воробьева, А. Г. Веняминова // Acta Naturae (русск. Верс). - 2011. - №4.

48. Даршт, В.В. Роль морфофункциональных нарушений малого круга кровообращения в расстройствах системной гемодинамики при остром отравлении природным газом / В. В. Даршт, В. А. Воронцов // Трансбронхиальная региональная электроплетизмография легких/ Новосибирск. - 1986.- С. 68-77.

49. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови / Н. Н. Петрищев, О. А. Беркович, Т. Д. Власов и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №1. – С. 50-52.

50. Долгов, В. В. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. - Т. I / В. В. Долгов, В. В. Меньшиков. - М.: ГЭОТАРМедиа, 2012. — 928 с.

51. Елисеев, Р. Н. Антиагреганты в практике лечения сердечно — сосудистых заболеваний / Р. Н. Елисеев, С. И. Миронченко // Успехи современного естествознания. - 2011. - №8. - С. 102а.

52. Емелина, Е. И. Баланс пользы и риска при терапии антиагрегантами / Е. И. Емелина // Сердце: журнал для практикующих врачей. - 2015. - Т. 14. - № 1 (81). - С. 34-40.

53. Зубаиров, Д. М. Молекулярные основы свёртывания крови и тромбообразования / Д. М. Зубаиров. - Казань: ФЭН, 2000. - 367 с.

54. Ивашкин, В. Т. Клиническое значение оксида азота и белков теплового

шока. 2-е изд. / В. Т. Ивашкин, О. М. Драпкина. - М.: Гэотар-Медиа, 2011. - 376с.

55. Изменение биохимических показателей крови на фоне регуляторов экспрессии эндотелиальной NO-синтазы при кобальтовой интоксикации / С. Г. Дзугкоев, И. В. Можаяева, Л. В. Гиголаева и др. // Патологическая физиология и экспериментальная медицина. – 2014. – Т. 58. – № 4. – С. 66-70.

56. Изменения показателей гомеостаза в реабилитационном периоде при острых отравлениях химической этиологии / Бадалян А. В., Лужников Е. А., Гольдфарб Ю. С. и др. // Анестезиология и реаниматология. - 2013. - №3. - С.43-50.

57. Изменения показателей системной гемодинамики в магистральных сосудах у животных в эксперименте и возможность их коррекции при помощи электромагнитного терагерцевого облучения на частотах молекулярного спектра излучения и поглощения атмосферного кислорода / В. Ф. Киричук, О. Н. Антипова, В. В. Великанов, Т. С. Великанова // БМИК. - 2012. - №6. - С. 442-445.

58. Ингибирование активности тромбина ДНК-аптамерами / А. Б. Добровольский, С. Г. Хаспекова, В. А. Спиридонова и др. // Бюллетень эксперим. биологии и медицины. - 2009. – Т. 147. - №7. – С.41- 46.

59. Использование лабораторных животных в токсикологическом эксперименте (методические рекомендации) / Под редакцией П. И. Сидорова. - М., 2002. – 98с.

60. Использование физиогемотерапии для повышения эффективности комплексной детоксикации организма при острых отравлениях / Ю. С. Гольдфарб, А. В. Бадалян, Ш. Л. Мелконян и др. // III научно-практ. конф. ГВКГ им. Н. Н. Бурденко «Внепочечные методы очищения крови в специализированной медицинской помощи». — М. - 1997. – С. 19-21.

61. Исследование реологических свойств крови и их связь с легочной гипертензией у больных хроническими пылевыми бронхитами / А. Ю. Гичкин, В. Е. Перлей и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 8. – С. 30–31.

62. К вопросу об острой интоксикации сероводородом / М. И. Сарин, Н. В.

Сарина, Н. Д. Тополянский и др. // Клиническая медицина. – 1972. - №1. – С. 99-101.

63. Калиева, И. А. Характеристики ЭЭГ у рабочих ТНК «Казхром» в динамике рабочей смены / И. А. Калиева // Мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. молод. уч. и специалистов Роспотребнадзора, Караганда, 16–18 мая, 2012. - Т. 1. - С. 259-262.

64. Калинин, Р. Е. Эффективность различных вариантов антикоагулянтной терапии при тромбозе глубоких вен нижних конечностей в рутинной клинической практике / Р. Е. Калинин, И. А. Сучков, А. Б. Агапов // Флебология. - 2017. - Т. 11. - №1. - С. 21-27.

65. Киричук, В. Ф. Влияние ТГЧ-излучения на частотах оксида азота на постстрессорные изменения гемодинамики у белых крыс / В. Ф. Киричук, Т. С. Великанова, А. Н. Иванов // Региональное кровообращение и микроциркуляция. - 2010. - №3. - С. 70-76.

66. Киричук, В. Ф. Особенности физико-химических показателей и проницаемости мембран эритроцитов у практически здоровых людей различных возрастных групп / В. Ф. Киричук, А. Ю. Костин // Современные наукоемкие технологии. - 2004. - №3. - С. 111-111.

67. Козлов, А. А. Лабораторная диагностика системы гемостаза / А. А. Козлов, Л. В. Натрус, П. А. Черново. – М.: Литтерра, 2011. - 136 с.

68. Константинова, Е. В. Современные возможности реперфузионной терапии инфаркта миокарда и ишемического инсульта / Е. В. Константинова, Н. А. Шостак, М. Ю. Гиляров // Клиницист. - 2015. - №1. - С. 4-12.

69. Коррекция тромбозмболических осложнений при эндоваскулярных эмболизациях / Л. В. Рожченко, А. Ю. Иванов, Н. В. Дрягина и др. // Трансляционная медицина. - 2016. - Т.3. - №1. - С. 98-105.

70. Крыжановский, С. М. Антиагреганты: проблема комплаенса // С. М. Крыжановский, В. И. Шмырев // Врач. - 2011. - №9. - С. 62-65.

71. Кузник, Б. И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии / Б. И. Кузник // Монография. - Чита: Экспресс-

издательство, С., 2010. - 832 с.

72. Кузник, Б. И. Развитие идей Д. М. Зубаирова Читинской школой гемостазиологов / Б. И. Кузник // Казанский медицинский журнал. - 2015. - Т. 96. - №5. - С. 709-715.

73. Кузник, Б. И. Свертываемость и фибринолитическая активность лимфы / Б. И. Кузник, Ю. М. Левин // Гематология и трансфузиология - 2012. - Т. 57. - №5. - С. 42-47.

74. Лазько, А. Е. Влияние газообразных серосодержащих поллютантов на систему микроциркуляции / А. Е. Лазько, А. П. Ярошинская // Материалы конференции. Издательский дом "Астраханский университет". - Астрахань. - 2008. - С. 24-29.

75. Лагута, П. С. Применение ацетилсалициловой кислоты у кардиологических больных: существующие проблемы и новые показания / П. С. Лагута // Атеротромбоз. - 2014. - № 1. - С. 5-21.

76. Лахин, А. В. Аптамеры: проблемы, пути их решения и перспективы / А. В. Лахин, В. З. Тарантул, Л. В. Генинг // Acta Naturae (русскоязычная версия). - 2013. - Т. 19. - №4. - С. 36-48.

77. Лужников, Е. А. Физиогемотерапия острых отравлений / Е. А. Лужников, Ю. С. Гольдфарб / М.: Медпрактика - М, 2002. — 200 с.

78. Льюис, С. М. Практическая и лабораторная гематология / С. М. Льюис, Б. Бэйн, И. Бэйтс; пер. с англ. под ред. А.Г. Румянцева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 672 с.

79. Лычева, Н. А. Влияние различных видов и режимов гипотермических воздействий на состояние системы гемостаза у крыс / дисс. на соиск. уч. ст. к. б. н. // ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет». Томск, 2015. - 197 с.

80. Мазуров, А. В. Физиология и патология тромбоцитов / А. В. Мазуров. - М.: Литерра, 2011. - 480 с.

81. Мажитова, М. В. Модуляция содержания конечных метаболитов NO в



плазме крови белых крыс под влиянием серосодержащего газа Астраханского месторождения / М. В. Мажитова, Д. Л. Теплый, Н. Н. Тривно // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2010. - №5. - С. 70.

82. Мажитова, М. В. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная защита разных отделов центральной нервной системы на этапах постнатального онтогенеза белых крыс в норме и при действии промышленных серосодержащих поллютантов / дисс. на соиск. уч. ст. д. б. н. // ГОУ ВПО "Астраханский государственный университет". Астрахань, 2012. - 277 с.

83. Метельская, В. А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке / В. А. Метельская, Н. Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.

84. Милош, Т. С. Состояние эндотелия сосудов и прооксидантно-антиоксидантный баланс у беременных крыс в условиях эндотоксинемии / Т. С. Милош, Н. Е. Максимович // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – Т. 59. – № 1. – С. 59-63.

85. Момот, А. П. Патология гемостаза: принципы и алгоритмы клинколабораторной диагностики / А. П. Момот. // СПб.: ФормаТ, 2006. – 208 с.

86. Морфологическая оценка распределения ДНК-аптамера ингибитора тромбина 31 RE в органах с обезвреживающей и выделительной функцией / Т. А. Шишкина, Д. М. Никулина, В. А. Спиридонова и др. // Естественные науки. - 2016. - №4. - С. 57-63.

87. Нарушение гемореологических показателей при тяжелых отравлениях азалептином и финлепсином / К. К. Ильяшенко, Е. А. Лужников, В. Б. Хватов и др. // X Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». — М., 2003. — С. 459.

88. Николаев, В. Ю. Система гемостаза у крыс при различных режимах однократной гипертермической нагрузки / В. Ю. Николаев // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – Т. 54. - № 4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=14114>.

89. Николаевский, В. А. Изучение влияния ацетилсалициловой кислоты в широком диапазоне доз на кислотную резистентность клеточной мембраны эритроцитов в экспериментах *in vivo* и *in vitro* / В. А. Николаевский, П. А. Федосов, А. И. Сливкин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2013. - № 2. - С. 206-209.

90. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.

91. Ольховский, И. А. Особенности агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с мутацией в гене *jak2*: гендерные отличия и эффект ацетилсалициловой кислоты / И. А. Ольховский, М. А. Столяр // Гематология и трансфузиология, 2014. Т. 59. - №1. - С. 11-14.

92. Онищенко, Г. Г. Гигиеническая индикация последствий для здоровья при внешнесредовой экспозиции химических факторов / Г. Г. Онищенко, Н. В. Зайцева, М. А. Землянова // Материалы IV ежегодного всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – Пермь: Книжный формат, 2011. – 532 с.

93. ОТС анальгетики-антипиретики для приема внутрь: механизм действия и профиль безопасности / Ю. Б. Белоусов, К. Г. Гуревич, С. В. Чаусова // Лечащий врач. - 2015. - № 1. - С. 79.

94. Оценка рисков для организмов человека, создаваемых химическими веществами: обоснование ориентировочных величин для установления предельно допустимых уровней экспозиции по показателям влияния на состояние здоровья. Гигиенические критерии качества окружающей среды 170. - МПХБ, ВОЗ, Женева, 1995.

95. Пантелеев, М. А. Активация контактного пути свертывания крови на циркулирующих микровезикулах может объяснить гиперкоагуляцию при разбавлении плазмы / А. М. Челушкин, М. А. Пантелеев, Т. А. Коваленко и др. // Биологические мембраны. - издательство Наука - М., 2017. - Т. 34. - №2. - С. 1745- 1755.

96. Пантелеев, М. А. Практическая коагулология / М. А. Пантелеев, С. А.

Васильев, Е. И. Синауридзе и др. - М.: Практическая медицина, 2011. — 192 с.

97. Пожилова, Е. В. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид азота в физиологии и патологии клетки / Е. В. Пожилова, В. Е. Новиков // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. - 2015. - Т. 14. - №4. - С. 35-41.

98. Почему дефициты факторов внутреннего пути свертывания приводят к гемофилии / Ф. И. Атауллаханов, А. И. Воробьев, А. А. Бутылин и др. // Проблемы гематологии. - 2003. - № 1. - С. 7-13.

99. Радзивил, Г. Г. Реологические свойства крови у больных в терминальных состояниях / Г. Г. Радзивил, Г. Д. Минскер // Анестезиол. и реаниматол. - 1985. — № 2. — С. 22-27.

100. Разработка технологии идентификации биомаркеров с помощью аптамеров на примере плоскоклеточного рака легкого и аденокарциномы / Г. С. Замай, О. С. Коловская, Ю. Е. Глазырин и др. // Сибирское медицинское обозрение. - 2012. - №6. - С. 9-13.

101. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. - М.: МедиаСфера, 2000. - 312 с.

102. Решетников, Р. В. Классификация G-квадруплексных ДНК по углу вращения квадруплекса и планарности G-квартетов / Р. В. Решетников, А. М. Копылов, А. В. Головин // Acta Naturae (русскаяязычная версия). - 2010. - №4. - С. 80-89.

103. Резаев, А. А. Интенсивность свободнорадикального окисления у рабочих АППЗ в зависимости от производственного стажа / А. А. Резаев, Е. В. Кудрявцева, И. Н. Надеждина // Среда обитания и здоровье населения: Материалы Всеросс. Научно-практической конференции. - Оренбург. - 2001. - Т. 2. - С. 105-107.

104. Ройтман, Е. В. Биореология, клиническая гемореология, основные понятия, показатели, оборудование (лекция) / Е. В. Ройтман // Клинич. лабор.

Диагностика. - 2001. - № 5. - С. 25- 32.

105. Роль метаболического ацидоза в развитии сдвигов в системе гемостаза и полиорганной недостаточности у больных сахарным диабетом / Н. Д. Авсеенко, Е. В. Альфонсова, Л. А. Забродина, О. Н. Стасюк // Учёные записки ЗабГУ. Серия: Естественные науки. - 2013. - Т. 48. - №1. - С. 122-130.

106. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. - М.: Профиль-2С, 2010. - 358 с.

107. Рязанова, Е. А. Комплексное воздействие факторов риска на здоровье работников предприятия металлургической промышленности / Е. А. Рязанова // Актуальные проблемы общей и военной гигиены: Материалы Всерос. науч.-практ. конф. (22 апреля 2011 года). – СПб., 2011. – С. 134.

108. Саифуллина, С. И. К вопросу о действии фтористого водорода, фосфина и сероводорода на организм крыс / С. И. Саифуллина // Вопросы гигиены труда и профессиональных заболеваний рабочих химической промышленности. – А.-Ата, 1978. – Т. XXXII. - 188 с.

109. Селиверстова, Д. В. Ацетилсалициловая кислота в первичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний / Д. В. Селиверстова, О. В. Евсина // Сердце: журнал для практикующих врачей. - 2014. - Т. 13. - № 5 (79). - С. 298-302.

110. Серосодержащие газы, их действие на организм и пути дезинтоксикации в эксперименте / Н. Н. Тривно, Ф. Р. Асфандияров, И.А. Беднов., А. К. Аюпова / Астрахань: Изд- во Астрахан. гос. мед. Акад., 2005. – 116 с.

111. Сидорова, И. Антикоагулянты нового поколения обещают прорыв в профилактике инсульта / И. Сидорова // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. - 2013. - №3. - С. 94-59.

112. Синкевич, Д. А. Концепция «Сосудистого возраста» как новый подход к оценке сердечно-сосудистого риска / Д. А. Синкевич, К. В. Протасов, А. А. Дзизинский // Сиб. мед. журн. (Иркутск). - 2011. - №6. - С. 9-13.

113. Современные антикоагулянты в профилактике развития инсульта у пациентов с фибрилляцией предсердий / Г. Гендлин, С. Борисов, А. Мелехов и др. // Врач. - 2012. - №4. - С. 2-7.

114. Сократов, Н. В. Патогенетические механизмы изменений системы гемостаза при нарушении функциональной способности почек / Н. В. Сократов: автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук: (14.00.16) Рос. ун-т дружбы народов. - М., 2004. - 38 с.

115. Солун, М. Н. Нарушения системы гемостаза и антитромбогенной активности сосудистой стенки и их роль в патогенезе диабетических ангиопатий / М. Н. Солун, В. Ф. Киричук, Н. И. Дихт // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 2 – С. 32-34.

116. Спиридонова, В.А. Структура аптамерных ДНК/РНК – как основа для создания лекарственных препаратов и регуляторных элементов / В. А. Спиридонова // Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Москва, 2011. – 50 с.

117. Срубиллин, Д. В. Состояние эндотелия сосудов у крыс при хронической интоксикации дихлорэтаном / Д. В. Срубиллин, Д. А. Еникеев, В. А. Мышкин В. А. // Современные проблемы науки и образования. - 2016. - №5. - С. 136.

118. Стеринсон, Л. З. Анализ токсико-аллергических реакций при приеме мацестинских процедур / Л. З. Стеринсон, В. М. Керимов, Б. Л. Ихно // Вопросы сульфидной бальнеотерапии. Тез. докл. межкурорт, научно-практ. конф. - Сочи. - 1973. - С. 118-120.

119. Сульфидная бальнеотерапия в комплексном лечении хронических заболеваний / В. М. Кузнецов, Л. З. Стеринсон, С. Т. Скороход и др. // Сборник научных трудов. – Сочи. - 1987. – С.139-143.

120. Течение экспериментального инфаркта миокарда в условиях угнетения и усиления синтеза NO / Ф. Ф. Рахматуллина, А. Г. Насырова, А. Л. Зефирова, А. Г. Насырова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - издательство РАМН-М., 2005. - Т. 139. - №4. - С. 371-375.

121. Тимербаев, В. Н. Развитие представлений об иницировании свёртывания крови от А. А. Шмидта до Д. М. Зубаирова / В. Н. Тимербаев, С. В. Киселёв // Казанский медицинский журнал. - 2013. - Т. 94. - №5. - С. 755-760.
122. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология: учебник / под ред. Р. У. Хабриева, Н. И. Калетиной. – М.: ГОЭТАР–Медиа, 2010. – 752 с.
123. Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду. Программа ООН по окружающей среде (ЮНЕП). Международный регистр потенциально токсичных химических веществ (МРПТХВ) / Под общей ред. А. А. Каспарова // М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1986. - 428 с.
124. Тризно, Н. Н. Динамика вазомоторной дисфункции эндотелия при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа / Н. Н. Тризно, Т. А. Шишкина, М. Н. Тризно // Астраханский медицинский журнал. - 2007. - Т. 2. - №4. – С.30-37.
125. Тризно, Н. Н. Морфологические особенности биожидкостей организма крыс при хроническом воздействии серосодержащего газа / Н. Н. Тризно, И. А. Беднов, А. А. Резаев // Вестник новых медицинских технологий - 2003. - № 1-2. - С. 23-24.
126. Филиппова, О. И. Методы исследования функциональной активности тромбоцитов (обзор литературы) / О. И. Филиппова, А. В. Колосков, А. А. Столица // Трансфизиология. - 2012. - Т. 13. - С. 493-515.
127. Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев // М.: Медицина, 2005. - 832 с.
128. Хаертдинов, Н. Н. АТФ-зависимые калиевые каналы как мишень действия сероводорода в миокарде лягушки / Н. Н. Хаертдинов, Е. В. Герасимова, Г. Ф. Ситдикова // Естественные науки – 2012. – Т. 38. – №. 1. – С. 206-209.
129. Хорев, Н. Г. Новые оральные антикоагулянты / Н. Г. Хорев, А. П. Момот, Д. А. Залозный // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2010. - №4. - С. 31-47.
130. Хроническое влияние природного газа Астраханского месторождения

на антиоксидантную активность и Redox- потенциал плазмы крови и ткани мозга в эксперименте / М. В. Мажитова, Д. Л. Теплый, Н. Н. Тризно и др. // Естественные и технические науки. - 2011. - Т. 56. - №6. - С. 149-153.

131. Цепелев, В. Ю. Роль антиагрегантных препаратов в коррекции эндотелиальной дисфункции / В. Ю. Цепелев и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2009. – №4. - С. 149-153.

132. Цепелев, В. Ю. Эндотелиопротективные эффекты ацетилсалициловой кислоты / В. Ю. Цепелев, А. В. Бабко // Фармация из века в век: труды научно-практической конференции — Спб. - 2008. – Ч. 5: Синтез биологически активных веществ для создания фармацевтических субстанций. Фармакологические исследования. - С. 180-183.

133. Шахматов, И. И. Реакции системы гемостаза на стрессорные воздействия и возможности их коррекции: Автореф. дис. док. мед. наук / И. И. Шахматов. - Алт. гос. мед. ин-т. - Барнаул, 2011. – 42 с.

134. Шахматов, И. И. Состояние системы гемостаза при различных видах гипоксического воздействия / И. И. Шахматов, В. М. Вдовин, В. И. Киселев // Бюллетень СО РАМН. - 2010. – Т. 30. - №2. - С. 131-137.

135. Шиффман, Ф. Дж. Патофизиология крови / Ф. Дж. Шиффман. - Пер. с англ. - М.: Издательство БИНОМ, 2007. - 448 с.

136. Шишкина, Т. А. Особенности реакции микроциркуляторного русла лёгких на действие неблагоприятных факторов среды / Т. А. Шишкина, Л. И. Наумова, И. Ю. Чекунова // Морфологические ведомости. - 2009. - Т. 1. - №1-2. - С. 156-158.

137. Штефель, В. О. О сроках воздействия при моделировании интоксикаций в токсиколого-гигиенических исследованиях / В. О. Штефель // Гигиена и санитария. – 1996. - №8. – С.70-72.

138. Шубик, Ю. В. Особенности профилактики тромбоэмболических осложнений у больных с фибрилляцией предсердий в России / Ю. В. Шубик // Вестник аритмологии. - 2017. - №87. - С. 5-6.

139. Эсаулова, Т. А. Молекулы средней массы как показатель интоксикоза у работников Астраханского газового комплекса и критерий эффективности проводимых лечебно-оздоровительных мероприятий / Эсаулова Т.А. // Вестник новых медицинских технологий.-2009.- Т. XVI. - №1. - С. 50-51.
140. Эсаулова, Т. А. Гематологический показатель интоксикации как маркер интоксикоза и критерий эффективности проводимых лечебно-оздоровительных мероприятий у работников Астраханского газового комплекса / Т. А. Эсаулова // Кубанский научный медицинский вестник. - 2009. - №2 - С.141-143.
141. Эсаулова, Т. А. Особенности формирования экологически обусловленной патологии у работников крупного газоперерабатывающего производства. Профилактика, реабилитация: автореф. дис. ... докт. мед. наук / Т. А. Эсаулова. - Астрахань, 2009. - 46 с.
142. Этот загадочный тромбоцит / А. О. Якименко, А. Н. Свешникова, Е. О. Артёменко, М. А. Пантелеев // Природа. - Москва. - 2014. - №2. - С. 3-8.
143. Яковлев, А. Н. Антиагреганты в кардиологии: выбор оптимальной терапии для каждого пациента / А. Н. Яковлев // Медицинский совет. - 2015. - №12. - С. 34-43.
144. Ярошинская, А. П. Влияние серосодержащих поллютантов на морфофункциональное состояние мембран эритроцитов у рабочих АГПЗ молодого возраста / А. П. Ярошинская // Успехи современного естествознания. - Москва. - 2003. - № 9. - С. 56.
145. Ярошинская, А. П. Функционально-морфологическое состояние плазмы крови и эритроцитов человека в юношеском, взрослом и зрелом возрастах в норме и в условиях воздействия серосодержащих поллютантов: Автореф. дис. ... докт. биол. наук / А. П. Ярошинская. - Астрахань, 2011. - 36 с.
146. A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA / K. Y. Wang, S. McCurdy, R. G. Shea et al. // Biochemistry. - 1993. - Vol. 32. - P. 1899–1904.
147. Administration of hydrogen sulfide via extracorporeal membrane lung



ventilation in sheep with partial cardio-pulmonary bypass perfusion: a proof of concept study on metabolic and vasomotor effects / M. Derwall, R. C. Francis, K. Kida et al. // *Crit Care*. - 2011. - Vol. 15. - P. 51.

148. Al-Hashimi, H. M. RNA dynamics: it is about time / H. M. Al-Hashimi, N. G. Walter // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 2008. - №18. - P. 321–329.

149. AlphaScreen-based characterization of the bifunctional kinase / RNase IRE1alpha: a novel and atypical drug target / M. Bouche-careilh, M. E. Caruso, P. Roby et al. // *J. Biomol Screen.* - 2010. - №15. P. 406-417.

150. Awtry, E. H. Aspirin / E. H. Awtry, J. Loscalzo // *Platelets*. Second edition / Ed. A. D. Michelson. - Academic Press, Elsevier inc, Amsterdam, 2007. - P. 1099-1125.

151. An aptamer targeting the apical-loop domain modulates pri-miRNA processing / C. E. Lunse, G. Michlewski, C. S. Hopp et al. // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* - 2010. - Vol. 49. - P. 4674-4677.

152. Asif, M. J. Utilization of hyperbaric oxygen therapy and induced hypothermia after hydrogen sulfide exposure / M. J. Asif, M. C. Exline // *Respir. Care*. - 2012. - Vol. 57, №2. - P. 307-310.

153. Asif, M. J. Utilization of hyperbaric oxygen therapy and induced hypothermia after hydrogen sulfide exposure / M. J. Asif, M. C. Exline // *Respiratory Care*. - 2012. - Vol. 57, №2. - P. 307-310.

154. Born, G. Quantitative investigation into aggregation of blood platelets / G. Born // *J. Physiol.* -1962. — Vol. 162. — P. 67- 72.

155. Brunori, M. Nitric oxide, cytochrome-c oxidase and myoglobin / M. Brunori // *Trends Biochem Sci.* - 2001. - №26. - P. 21–23.

156. Bunka, D. H. Development of aptamer therapeutics / D. H. Bunka, O. Platonova, P. G. Stockley // *Curr. Opin. Pharmacol.* - 2010. - №10. - P. 557-562.

157. Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca<sup>2+</sup> sparks to Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels / J. H. Jaggar, C. W. Leffler, S. Y. Cheranov et al. // *Circ. Res.* - 2002. - Vol. 91. - P. 610–617.

158. Chen, K. Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and

where does it go? A quantitative perspective / K. Chen, R. N. Pittman, A. S. Popel // *Antioxid. Redox Signal.* - 2008. - №10. - P. 1185–1198.

159. Chen, X. Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine β-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine / X. Chen, K. H. Jhee, W. D. Kruger // *J. Biol. Chem.* - 2004. - №279. - P. 52082–52086.

160. Cheng, A. K. Design and testing of aptamer-based electrochemical biosensors for proteins and small molecules / A. K. Cheng, D. Sen, H. Z. Yu // *Bioelectrochemistry.* - 2009. №77. P. 1–12.

161. Combinatorial synthesis of thrombin-binding aptamers containing isoguanine / S. R. Nallagatla, B. Heuberger, A. Haque, C. J. Switzer // *Comb. Chem.* - 2009. - Vol.11. - P. 364–369.

162. Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery / G. D. Webb, L. H. Lim, V. M. Oh et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2008. - Vol. 324. - P. 876–882.

163. Cooper, M. A. Optical biosensors in drug discovery / M. A. Cooper // *Nat. Rev. Drug. Discov.* - 2002. - №1. P. 515–528.

164. Cooperative multicomponent selfassembly of nucleic acid structures for the activation of DNzyme cascades: a paradigm for DNA sensors and aptasensors / J. Elbaz, M. Moshe, B. Shlyahovsky, I. Willner // *Chemistry.* - 2009. - Vol.15. - P. 3411–3418.

165. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the complex of human α-thrombin with a modified thrombin-binding aptamer / I. Russo Krauss, A. Merlino, A. Randazzo et al. // *Acta. Crystallographica Sec. F.* - 2010. - Vol. 66. - P. 961–963.

166. Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium / D. C. Dorman, F. J. Moulin, B. E. McManus et al. // *Toxicol. Sci.* // 2002. - Vol. 65, №1. - P. 18-25.

167. Dausse, E. Aptamers: a new class of oligonucleotides in the drug discovery pipeline? / E. Dausse, S. Da Rocha Gomes, J. J. Toulmé // *Curr. Opin. Pharmacol.* -

2009. - №9. - P. 602-607.

168. Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotideaptamer (NX1838) in rhesus monkeys / C. E. Tucker, L. S. Chen, M. B. Judkins et al. // *J. Chromatography B Biomed Sci Appl.* - №732. - P. 203-212.

169. Different duplex/quadruplex junctions determine the properties of anti-thrombin aptamers with mixed folding / K. I. Russo, V. Spiridonova, A. Pica et al. // *Nucleic Acids Research.* — 2016. — Vol. 44, №2. — P. 983–991.

170. Dintenfass, L. Blood microrheology viscosity factors in blood flow, ischemia and thrombosis / L. Dintenfass // London, Butterworth. - 1974. - 327 p.

171. Effect of aspirin on constitutive nitric oxide synthase and the bioavailability of NO / M. Madajka, M. Korda, J. White, T. Malinski // *J. Thromb. Res.* – 2003. – V. 110 (5–6). – P. 317–321.

172. Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome / P. Kamoun, M. C. Belardinelli, A. Chabli et al. // *Am. J. Med. Genet A.* - 2003. - Vol. 116A. - P. 310–311.

173. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats / F. H. Khadour, D. Panas, P. Ferdinandy et al. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* - 2002. - Vol. 283, №3. - P. 1108-1115.

174. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasburg: Council of Europe, 1986. – 51 p.

175. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide / M. Whiteman, L. Li, I. Kostetski et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2006. - Vol. 343. - P. 303– 310.

176. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents / Patrono C, Bachmann F, Baigent C et al. // *Eur. Heart J.* - 2004. - Vol. 25, №2. - P. 166-181.

177. Fluorescent strip sensor for rapid determination of toxins / L. Wang, W. Chen, W. Mai et al. // *Chem. Commun.* - 2011. - Vol. 47. - P. 1574–1576.

178. Fukami, K. Hydrogen Sulfide and T-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Channels in Pain Processing, Neuronal Differentiation and Neuroendocrine Secretion / K. Fukami, F. Sekiguchi, A. Kawabata // *Pharmacology*. - 2017. - Vol. 99, №3-4. P. 196-203.
179. Fukuto, J. M. Interactive endogenous small molecule (gaseous) signaling: implications for teratogenesis / J. M. Fukuto, M. D. Collins // *Curr. Pharm. Des.* - 2007. - Vol. 13. - P. 2952–2978.
180. Gando, S. Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome / S. Gando // *Crit Care Med.* – 2010. - Vol. 38. - P. 35 – 43.
181. General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulants / R. De Caterina, S. Husted, L. Wallentin, F. Andreotti // *Thrombosis and Haemostasis*. - 2013. – №4. - P. 569 – 580.
182. Gilroy, D.W. New insights into the anti-inflammatory actions of aspirin-induction of nitric oxide through the generation of epi-lipoxins / D.W. Gilroy // *J. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2005. – V.100. – № 1. – P.49-54.
183. Gold, L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents / L. Gold // *J. Biol. Chem.* - 1995. - Vol. 270. - P. 13581–13584.
184. Granatier, J. Van der Waals complexes of Cu, Ag, and Au with hydrogen sulfide: the bonding character / J. Granatier, M. Urban, A. J. Sadlej // *J. Phys. Chem.* - 2007. - Vol. 111. - P. 13238–13244.
185. Guidotti, T. L. Hydrogen sulfide intoxication / T. L. Guidotti // *Handb. Clin. Neurol.* - 2015. - Vol.131. - P. 111-33.
186.  $\text{H}_2\text{S}$  and  $\text{HS}^-$  donor NaHS releases nitric oxide from nitrosothiols, metal nitrosyl complex, brain homogenate and murine L1210 leukaemia cells / K. Ondrias, A. Stasko, S. Cacanyiova et al. // *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* - 2008. - Vol. 457, №2. P. 271 – 279.
187.  $\text{H}_2\text{S}$  generated by heart in rat and its effects on cardiac function / B. Geng, J. Yang, Y. Qi et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2004. - Vol. 313. - P. 362-368.
188. Heme regulation in traumatic brain injury: relevance to the adult and

developing brain / E. F. Chang, C. P. Claus, H. J. Vreman et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 2005. - №25. - P. 1401–1417.

189. Hermann, A. *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology* / A. Hermann, G. F. Sitdikova, T. M. Weiger // Springer – Verlag Berlin Heidelberg. - 2012. - P. 163-201.

190. Highly modular structure and ligand binding by conformational capture in a minimalistic riboswitch / E. Duchardt-Ferner, J. E. Weigand, S. R. Schmidtke et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2010. - Vol. 49. - P. 6216–6219.

191. Hill, W. G. Role of leaflet asymmetry in the permeability of model biological membranes to protons, solutes, and gases / W. G. Hill, R. L. Rivers, M. L. Zeidel // *J. Gen. Physiol.* - 1999. - Vol.114. - P. 405–414.

192. Hirano, K. Role of protease-activated receptors in the vascular system / K. Hirano, H. Kanaide // *J. Atheroscler. Thromb.* - 2003. Vol. 10. - P. 211–225.

193. Hou, S. Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules / S. Hou, S. H. Heinemann, T. Hoshi // *Physiology (Bethesda)*. - 2009. - Vol. 24. - P. 26–35.

194. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and sour gas effects on the eye. A historical perspective / T. V. Lambert, V. M. Goodwin, D. Stefani, L. Strosher // *Science of The Total Environment*. - 2006. - Vol. 367, №1. - P. 1-22.

195. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats / Y. Z. Zhu, Z. J. Wang, P. Ho et al. // *J. Appl. Physiol.* - 2007. - Vol. 102. - P. 261–268.

196. Hydrogen sulfide increases excitability through suppression of sustained potassium channel currents of rat trigeminal ganglion neurons / X. Feng, Y. L. Zhou, X. Meng et al. // *Mol. Pain*. - 2013. - Vol. 9, №1. - P. 4.

197. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic / G. A. Benavides, G. L. Squadrito, R. W. Mills et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. - 2007. - Vol.104. - P. 17977–17982.

198. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of

rats / Y. Cheng, J. F. Ndisang, G. Tang et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* - 2004. - Vol. 287. - P. H2316–H2323.

199. Hydrogen sulphide is involved in testosterone vascular effect / M. Bucci, V. Mirone, A. Di Lorenzo et al. // *Eur. Urol.* - 2009. - Vol. 56. - P. 378–383.

200. Hydrogen sulphide pathway contributes to the enhanced human platelet aggregation in hyperhomocysteinemia / R. d'Emmanuele di Villa Bianca, E. Mitidieri, M. N. Minno et al. // *PNAS.* - 2013. - Vol. 110, № 39. - P. 15812-15817.

201. Hypoxemia and blunted hypoxic ventilatory responses in mice lacking heme oxygenase-2 / T. Adachi, K. Ishikawa, W. Hida et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2004. - P. 514–522.

202. Inhibition of human blood platelet aggregation and the stimulation of nitric oxide synthesis by aspirin / K. Chakraborty, G. A. Khan, P. Banerjee et al. // *J. Platelets.* - 2003. - V. 14 (7–8). - P. 421–427.

203. Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats / X. Wang, F. C. Barone, N.V. Aiyar, G. Z. Feuerstein // *Stroke.* - 1997. - Vol. 28. - P. 152–161.

204. Intravenous hydrogen sulfide does not induce hypothermia or improve survival from hemorrhagic shock in pigs / T. Drabek, P. M. Kochanek, J. Stezoski et al. // *Shock.* - 2011. - Vol. 35, №1. - P. 67- 73.

205. Jacobsen, E. D. Disseminated Intravascular Coagulation / E. D. Jacobsen // *Hematology.* - 2010. - Vol. 5, Part 1. - P. 2-12.

206. Kamoun, P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals / P. Kamoun // *Amino Acids.* - 2004. - Vol. 26. - P. 243–254.

207. Kashfi, K. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras / K. Kashfi, K. R. Olson // *Biochemical Pharmacology.* - 2013. - Vol. 85, №5. - P. 689–703.

208. Keefe, A. D. Aptamers as therapeutics / A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2010. - Vol. 9. - P. 537-550.

209. Kimura, H. Hydrogen sulfide: from brain to gut / H. Kimura // *Antioxid.*

Redox. Signal. - 2010. - Vol. 12. P. 1–13.

210. Kimura, H. Hydrogen sulfide: Its production, release and functions. / H. Kimura // *Amino Acids*. - 2011. - Vol. 41, №1. - P. 113–121.

211. Ku, D. Expression of thrombin receptors in human atherosclerotic coronary arteries leads to an exaggerated vasoconstrictory response in vitro / D. D. Ku, J. J. Dai // *Cardiovasc. Pharmacol.* - 1997. - Vol. 30. - P. 649–657.

212. Lewis, R. J. Sax's dangerous properties of industrial materials / R. J. Lewis, G. B. Copley // 9th ed. Albany, NY: Van Nostrand Reinhold. - 1996. - P. 1843-1844.

213. Lewis, J. Chronic low-level hydrogen sulfide exposure and potential effects on human health: a review of the epidemiological evidence / J. Lewis // *Critical Reviews in Toxicology*. - 2014. - №45. P. 1-31.

214. Lewis, R. J. Chronic low-level hydrogen sulfide exposure and potential effects on human health: a review of the epidemiological evidence / R. J. Lewis, G. B. Copley // *Crit. Rev. Toxicol.* - 2015. - Vol. 45, №2. - P. 93-123.

215. Linden, M. D. Platelet Physiology / M. D. Linden // *Haemostasis: Methods and protocols, methods in molecular biology*. - 2013. - № 13. – P. 13-30.

216. Live Cell Monitoring of hiPSC Generation and Differentiation Using Differential Expression of Endogenous microRNAs / Kamata M, Liang M, Liu S et al. // *PLoS ONE*. - 2010. - Vol. 5, №7. - P. e11834.

217. Microfluidic electrochemical aptameric assay integrated on-chip: A potentially convenient sensing platform for the amplified and multiplex analysis of small molecules / Y. Du, C. Chen, M. Zhou // *Anal. Chem.* - 2011. - Vol. 83, №5. - P. 1523-1529.

218. Murphy, M. E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels / M. E. Murphy, J. E. Brayden // *J. Physiol.* -1995. - Vol. 486. - P. 47-58.

219. Neonatal colonic inflammation sensitizes voltage-gated Na(+) channels via upregulation of cystathionine  $\beta$ -synthetase expression in rat primary sensory neurons /

R. Qu, J. Tao, Y. Wang et al. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* - 2013. - Vol. 304, №9. - P. 763-772.

220. Neonatal colonic inflammation sensitizes voltage-gated Na(+) channels via upregulation of cystathionine  $\beta$ -synthetase expression in rat primary sensory neurons / R. Qu, J. Tao, Y. Wang et al. // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology Published.* - 2013. - Vol. 304, №9. - P. G763 G772.

221. Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis / H. M. Abu-Soud, J. Wang, D. L. Rousseau et al. // *J Biol Chem.* - 1995. - №270. - P. 22997–23006.

222. Neurotoxicological effects associated with short-term exposure of Sprague-Dawley rats to hydrogen sulfide / M. F. Struve, J. N. Brisbois, R. A. James et al. // *Neurotoxicology.* - 2001. - Vol. 22. - P. 375-385.

223. Novel method for measuring S-nitrosothiols using hydrogen sulfide / X. Teng, T. S. Isbell, J. H. Crawford et al. // *Methods Enzymol.* - 2008. - Vol. 441. - P. 161172.

224. NPAS2: a gas-responsive transcription factor / E. M. Dioum, J. Rutter, J. R. Tuckerman // *Science.* - 2002. - Vol. 298. - P. 2385–2387.

225. Oberle, S. Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells. A novel antioxidant pathway / S. Oberle // *Circ. Res.* – 1998. – V. 82. – P. 1016–1020.

226. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa / J. Furne, J. Springfield, T. Koenig et al. // *Biochem. Pharmacol.* - 2001. - Vol. 62. - P. 255–259.

227. Padmanabhan, K. An ambiguous structure of a DNA 15-mer thrombin complex / K. Padmanabhan, A. Tulinsky // *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* - 1996. - Vol. 52. - P. 272–282

228. Paul-Clarc, M. J. 15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation / M. J. Paul-Clark, T. Van Cao, N. Moradi-Bidhendi // *J. Exp. Med.* – 2004. – V. 200 (1). – P. 69–78.



229. PET Imaging of Tissue Factor in Pancreatic Cancer Using  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled Active Site-Inhibited Factor VII / C. H. Nielsen, T. E. Jeppesen, L. K. Kristensen et al. // *J. Nucl. Med.* - 2016. - Vol. 57, №7. - P. 1112-1119.
230. Petersen, L. C. The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase / L. C. Petersen // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Bioenergetics.* - 1977. - Vol. 460, № 2. - P. 299–307.
231. Platelet – active drugs. The relationships among dose, effectiveness, and side effects / B. Coller, J. E. Dalen, G. A. FitzGerald et al. // *Chest.* - 2001. - Vol. 119. - P. 39S-63S.
232. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues / J. E. Doeller, T. S. Isbell, G. Benavides et al. // *Anal. Biochem.* - 2005. - Vol. 341. - P. 4051.
233. Predmore, B. L. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine / B. L. Predmore, D. J. Lefer, G. Gojon // *Antioxid. Redox. Signal.* - 2012. - Vol.17, №1. - P. 119–140.
234. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells / H. Kataoka, J. R. Hamilton, D. D. McKemy et al. // *Blood.* - 2003. - Vol. 102. - P. 3224–3231.
235. Receptoractivating peptides distinguish thrombin receptor (PAR-1) and protease activated receptor 2 (PAR-2) mediated hemodynamic responses in vivo / W. M. Cheung, P. Andrade-Gordon, C. K. Derian, B. P. Damiano // *Can J. Physiol. Pharmacol.* - 1998. - №76. P. 16–25.
236. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? / M. Y. Ali, C. Y. Ping, Y. Y. Mok et al. // *Br. J. Pharmacol.* - 2006. - Vol. 149. - P. 625–634.
237. Reiffenstein, R. J. Toxicology of hydrogen sulfide / R. J. Reiffenstein, W. C. Hulbert, S. H. Roth // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* - 1992. - Vol. 32. - P. 109–134.
238. Reiffenstein, R. J. Toxicology of hydrogen sulfide. / R. J. Reiffenstein, W.

C. Hulbert, S. H. Roth. // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. - 1992. - Vol. 32. - P. 109–134.

239. Rieder, U. Folding of a transcriptionally acting preQ1 riboswitch / U. Rieder, C. Kreutz, R. Micura // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. - 2010. - Vol. 107. - P. 10804–10809.

240. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin / L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham et al. // *Nature*. - 1992. - №355. - P. 564–566.

241. Shimamoto, K. Fluorescent probes for hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and sulfane sulfur and their applications to biological studies / K. Shimamoto, K. Hanaoka // *Nitric Oxide*. - 2015. - Vol. 46. - P. 72-79.

242. Single-well monitoring of protein-protein interaction and phosphorylation-dephosphorylation events / M. Arcand, P. Roby, R. Bosse et al. // *Biochemistry*. - 2010. - №49. - P. 3213-3215.

243. Sitdikova, G. F. Gasotransmitters in regulation of neuromuscular transmission / G. F. Sitdikova, A. L. Zefirov // *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology*. – Springer Berlin Heidelberg, 2012. – P. 139-161.

244. Smith, R. P. Hydrogen sulfide poisoning / R. P. Smith, R. E. Gosselin // *J. Occup. Med.* - 1979.- Vol. 21, №2. - P. 93-97.

245. Sulfide-binding hemoglobins: effects of mutations on active-site flexibility / S. Fernandez-Alberti, D. E. Bacelo, R. C. Binning et al. // *Biophys. J.* - 2006. Vol. 91. - P. 1698–1709.

246. Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia / E. Blackstone, M. B. Roth // *Shock*. - 2007. - №27. - P. 370–372.

247. Takano, Y. Chemical tools for the study of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and sulfane sulfur and their applications to biological studies / Y. Takano, K. Shimamoto, K. Hanaoka // *J. Clin Biochem Nutr.* - 2016. - Vol. 58, №1. - P. 7-15.

248. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver / S. Fiorucci, E. Distrutti, G. Cirino, J. L. Wallace // *Gastroenterology*. - 2006. - Vol.

131. - P. 259–271.

249. The potential of aptamers as anticoagulants / S. M. Nimjee, C. P. Rusconi, R. A. Harrington, B. A. Sullenger // *Trends Cardiovasc. Med.* - 2005. - Vol.15. - P. 41–45.

250. The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin / L. R. Paborsky, S. N. McCurdy, L. C. Griffin et al. // *J. Biol. Chem.* - 1993. - Vol. 268. - P. 20808–20811.

251. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang // *EMBO J.* - 2001. - Vol. 20. - P. 6008–6016.

252. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. *Arterioscler* / T. Minami, A. Sugiyama, S. Q. Wu et al. // *Thromb. Vasc. Biol.* - 2004. - Vol. 24. - P. 41–53.

253. Thrombin induces endothelial type II activation in vitro: IL-1 and TNF- $\alpha$ -independent IL-8 secretion and E-selectin expression / G. Kaplanski, M. Fabrigoule, V. Boulay et al. // *J. Immunol.* - 1997. - Vol. 158. - P. 5435–5441.

254. Transport of volatile solutes through AQP1 / G. J. Cooper, Y. Zhou, P. Bouyer et al. // *J. Physiol.* - 2002. - №542. - P. 17–29.

255. Tsubota, M. Role of Hydrogen Sulfide, a Gasotransmitter, in Colonic Pain and Inflammation / M. Tsubota, A. Kawabata // *Yakugaku Zasshi.* - 2014. - Vol. 134, №12. - P.1245-1252.

256. Tuerk, C. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase / C. Tuerk, L. Gold // *Science.* - 1990. - Vol. 249. - P. 505–510.

257. Ultrafast dynamics show that the theophylline and 3-methylxanthine aptamers employ a conformational capture mechanism for binding their ligands / S. W. Lee, L. Zhao, A. Pardi, T. Xia // *Biochemistry.* - 2010. - Vol. 49. - P. 2943–2951.

258. Upregulation of cystathionine beta-synthetase expression by nuclear factor- $\kappa$ B activation contributes to visceral hypersensitivity in adult rats with neonatal

maternal deprivation / L. Li, R. Xie, S. Hu et al. // *Mol. Pain.* - 2012. - Vol. 8. - P. 89.

259. Upregulation of cystathionine beta-synthetase expression by nuclear factor-kappa B activation contributes to visceral hypersensitivity in adult rats with neonatal maternal deprivation / L. Li, R. Xie, S. Hu, Y. Wang et al. // *Mol. Pain.* - 2012. - Vol. 8. - P. 89.

260. Urinary diversion following cystectomy / U. Nagele, K-D. Sievert, A. S. Merseburger et al. // *EAU. Update Series.* – 2005. – № 3. – P. 129–137.

261. Using a functional enzyme model to understand the chemistry behind hydrogen sulfide induced hibernation / J. P. Collman, S. Ghosh, A. Dey, R. A. Decréau // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* - 2009. - Vol. 106, №52. - P. 22090–22095.

262. Vertebrate phylogeny of hydrogen sulfide vasoactivity / R. A. Dombkowski, M. J. Russell, A. A. Schulman et al. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* - 2005. - Vol. 288. - P. R243–R252.

263. Wallace, J. L. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter / J. L. Wallace, R. Wang // *Nature Reviews Drug Discovery.* - 2015. - Vol. 14, №5. - P. 329–345.

264. Wang, R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed / R. Wang // *Physiological Reviews.* - 2012. - Vol. 92, №2. - P. 791–896.

265. Wang, R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. / R. Wang // *Physiological Reviews.* - 2012. - Vol. 92, №2. - P. 791–896.

266. Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter ? / R. Wang // *The FASEB Journal.* - 2002. - Vol. 16, №13, P. 1792–1798.

267. Zeng, Y. Principles of micro-RNA production and maturation / Y. Zeng // *Oncogene.* - 2006. - Vol. 25. - P. 6156-6162.