

Н. В. Добреля, Т. А. Карацуба, Н. С. Гула, Ю. О. Дуняк,
Л. В. Бойцова, І. В. Данова, С. М. Тишкін, О. С. Хромов

Корекція порушень гемостазу при гострій масивній крововтраті ліпосомальними препаратами

*Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ*

Ключові слова: гостра масивна крововтрата, ліпосоми, Ліпофлавон, ліпосомальна форма цитохрому С, коагуляційний гемостаз

Використання нових видів озброєння в локальних конфліктах і велико-масштабних війнах, техногенні та природні катастрофи, транспортні аварії потребують вдосконалення організації допомоги пораненим та ураженим.

Причиною смерті потерпілих на етапах медичної евакуації є крововтрата (25 %), та крововтрата в поєднанні з травматичним шоком (19 %). Загалом крововтрата, шок і їхнє поєднання зумовлюють смерть від безпосередньої дії травми на етапах медичної евакуації понад 51 % поранених військовослужбовців. Слід зазначити, що бойова травма в 85 % випадків поєднується з кровотечею з ушкоджених тканин [1]. У мирний час навіть в умовах стаціонарного лікування поєднана дія травматичного шоку і крововтрати призводить до 60 % смертності при травмах [2].

Тяжкість крововтрати визначається її видом, швидкістю розвитку, об'ємом втраченої крові, ступенем гіповолемії та можливим розвитком шоку. Фізіологічними реакціями організму на крововтрату є централізація кровообігу, компенсаторна автогемодилуція, активація гемопоєзу, збільшення хвилинного об'єму крові, гіперкоагуляція.

На особливу увагу заслуговує гіперкоагуляція, що підвищує гемостатичний потенціал крові та сприяє підтриманню гемостазу в пошкоджених судинах. Однак при масивній крововтраті ця захисна реакція трансформується в важку патологію – ДВЗ-синдром (син-

дром дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові), коли рівновага між механізмами тромбоутворення та фібринолізу порушується [3]. Цьому сприяють тканинна гіпоксія, ацидоз, порушення мікроциркуляції, агрегація елементів крові, ендотоксикоз, значна травма тканин [4].

Мета дослідження – вивчення впливу ліпосомальних препаратів на систему згортання крові при гострій масивній крововтраті.

Матеріали та методи. Дослідження були проведені на 36 статевозрілих білих лабораторних щурах-самцях масою (220 ± 25) г, яких утримували на стандартному раціоні віварію без обмеження доступу до води. Методом випадкової вибірки тварин розподілили на 5 груп.

Щури I–V груп були використані для вивчення впливу гострої масивної крововтрати (ГМК) та її поповнення різними розчинами на систему згортання та кислотно-лужний стан крові. У 10 щурів I групи крововтрата не компенсувалася жодним розчином. Кров для аналізів була взята перед крововтратою та через 30 хв після кровопускання. Тваринам II–V груп через 30 хв після крововтрати внутрішньовенно вводили розчин у об'ємі, що відповідає об'єму втраченої крові. Кров для аналізів була взята перед крововтратою та через 30 хв після введення розчину. 8 щурам II групи вводили фізіологічний розчин, 6 щурам III групи – лецитинові ліпосоми (аналог ліпіну) у дозі 50 мг/кг, 6 тваринам IV групи – Ліпофлавон у дозі 50 мг/кг за ліпідом, 6 щурам V групи – ліпосомальну форму цитохрому С (ліпохром) у дозі 50 мг/кг за ліпідом.

Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до законодавства України [5], правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [6].

Знеболювання та операційна підготовка. Знеболювання у тварин проводили за допомогою суміші хлоралози та уретану (1:10 за масою, 2 мг/кг за хлоралозою, внутрішньоочеревинно). Тварин у хірургічній стадії наркозу розташовували на термостабілізованому операційному столі, у дистальні відділи кінцівок підшкірно вводили електроди для реєстрації електрокардіограми (ЕКГ) у другому стандартному відведенні. Надалі проводили хірургічну підготовку – трахеотомію, катетеризацію *a. carotis comm. sin., v. jugularis sin.*

Моделювання гострої масивної крововтрати у щурів. Кровопускання здійснювали в об'ємі 2,5 мл/100 г зі швидкістю 2 мл/хв з загальної сонної артерії, що загалом становить 33 % від загальної кількості циркулюючої крові [7–9]. Ізоволімічне поповнення крововтрати фізіологічним розчином або суспензією ліпосом проводили внутрішньовенно.

Дослідження системи згортання крові. Кров було зібрано з сонної артерії до початку кровопускання й через 30 хв після нього (група I) або через 30 хв після поповнення крововтрати (групи II–V) у пробірки з 3,8 % цитратом натрію (Vascutest Kima, Італія). Виділено плазму з використанням центрифуги MPW – 340 (Mechanika Precyzyjna, Польща). За допомогою коагулометра K-3002 OPTIC (Ksel Med, Польща) визначали тромбіновий час, протромбіновий час та активований парціальний тромбoplastиновий час.

Методи вивчення кислотно-лужного стану (КЛС) та газів артеріальної крові. Показники КЛС крові визначали на аналізаторі газів Gastat-mini (Techno Medica, Японія) за допомогою картриджів Gastat-mini 981 (Techno Medica, Японія) у крові, яку було зібрано з сонної артерії до початку крововтрати й через 30 хв після неї (група II) або через 30 хв після введення розчинів (групи III–VI).

Параметри, які вимірювали: концентрація водневих іонів (pH), парціальна напруга вуглекислоти в крові (pCO₂), парціальна напруга кисню (pO₂); параметри, які розраховували: бікарбонати плазми (HCO₃), насичення крові киснем (O₂SA), надлишок лугів крові (BE), суму аніонів буферних систем крові (BB).

Використані реактиви та розчини. У ході дослідження були використані: альфа-хлоралоза (Sigma, США), етилкарбамат (Уретан, Sigma, США), гепарин (ТОВ Фарма Лайф, Україна), кальцію хлорид (10 % розчин CaCl₂, Arterium, Україна), NaCl (Reaxim, Україна), лецитинові ліпосоми (ТОВ «Наномедтех», Україна), ліпофлавіон (ТОВ «Наномедтех», Україна), ліпохром (ТОВ «Наномедтех», Україна), КН₂РО₄ (Sigma, США), NaOH (Sigma, США). Для формування ліпосом було використано яєчний лецитин.

Аналіз та статистична обробка отриманих даних. Фактичний матеріал було оброблено методами варіаційної статистики. Проводили тест на нормальність розподілу Шапіро-Уїлка, нормально розподілені дані обчислювали за критерієм Стюдента для залежних вибірок з урахуванням тесту Левена на гомогенність вибірки. Дані представлені у вигляді середнього ± похибка середнього (M ± m). Статистично значущими вважалися зміни в довірчому інтервалі не менше ніж 95 % або p < 0,05.

Результати та їх обговорення. Гостра масивна крововтрата (ГМК) викликала загибель усіх тварин I групи протягом (49,7 ± 4,4) хв. Враховуючи це, поповнення проводили через 30 хв після кровопускання.

ГМК призводила до розвитку різноспрямованих порушень у системі згортання крові, які через 30 хв після кровопускання проявлялися підвищеною активністю системи згортання крові, а до кінця періоду спостереження – її зниженням.

Найвиразніше різноспрямовані зміни системи гемостазу відстежуються на прикладі протромбінового часу (ПТ), який характеризує зовнішній шлях згортання крові. Через 30 хв після кро-

вовтрати цей показник скорочується на 31,5 %, що свідчить про посилення коагуляційної активності крові, надалі він демонструє подовження на 29,7 %, характерне для стадії гіпокоагуляції з виснаженням факторів згортання та антикоагулянтів, виражених гіпофібриногенемії та тромбоцитопенії, а також посилення фібринолітичної активності [10]. Активований парціальний тромбoplastиновий час (АПТЧ), що відображає шлях внутрішньої активації згортання крові [11], навіть при відсутності вірогідних змін за короткий проміжок часу, свідчить про тенденцію до гіперкоагуляції через 30 хв після ГМК та достовірно вказує на гіпокоагуляцію в більш пізній час (рисунок).

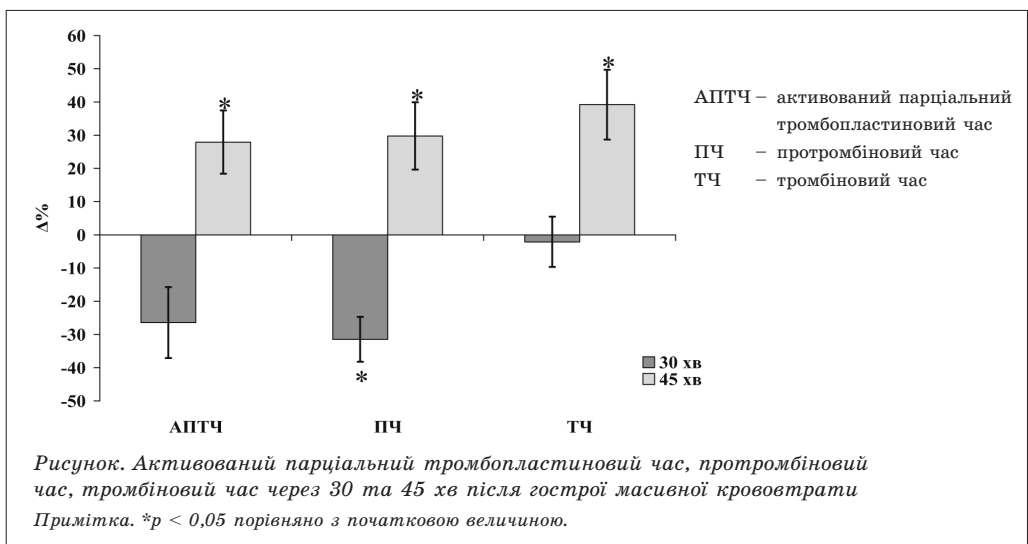
Серед факторів, що сприяють порушенням у системі гемостазу, ацидоз є одним з найважливіших предикторів коагулопатії в травмованих хворих [12], до того ж збільшення проявів ацидозу підвищує ймовірність смерті [13–15]. Через 30 хв після кровопускання поряд із зазначеними порушеннями спостерігали розвиток декомпенсованого метаболічного ацидозу. На користь цього свідчили характерні зміни параметрів кислотно-лужного стану крові (табл. 1). Інші показники також свідчили про розвиток метаболічного ацидозу: відбувалося зменшення напруги CO_2 , зростав дефіцит буферних лугів (ВЕ) в артеріальній крові. Згубними наслідками ацидозу при ГМК є порушення активності ферментів, зменшен-

ня концентрації фібриногену, подовження часу згортання крові та збільшення часу кровотечі [16].

При ізоволемічному поповненні крововтрати фізіологічним розчином зберігаються порушення функціонального стану системи згортання крові та кислотно-лужного стану (табл. 1, 2). Через 1 год після кровопускання в тварин цієї групи спостерігали декомпенсований метаболічний ацидоз. Такі зміни сприяють посиленню тканинної гіпоксії, зниженню продукції АТФ, гіперполяризації клітинних мембран, кальцієвому перевантаженню клітин, порушенню окиснювального фосфорилування. Внаслідок цього виникає ще більший дефіцит кисню, збільшується киснева заборгованість [17]. Метаболічний ацидоз у поєднанні з ознаками гіпокоагуляції, які спостерігали в цієї групи тварин, можуть свідчити про розвиток ДВЗ-синдрому.

Додавання ліпосомальних препаратів до інфузійного середовища значною мірою сприяло усуненню такого ускладнення. Так, внутрішньовенне введення через 30 хв після крововтрати суспензії ліпосомальних препаратів (ліпосоми або Ліпофлакон) у фізіологічному розчині призводило до більш повноцінної корекції порушень системи згортання крові та КЛС у тварин.

Введення ліпохрому в зазначеній дозі також практично усувало зміни функціонального стану системи згортання крові та порушення кислотно-



Таблиця 1

Параметри кислотно-лужного стану артеріальної крові за умов гострої масивної крововтрати та застосування ліпосомальних препаратів

| Період | Показник | | | | | |
|--|-------------------|---------------------------------|--|-------------------------|-------------------|-------------------|
| | pH | pCO ₂ , мм рт.ст. | HCO ₃ ⁻ , ммоль/л | O ₂ SA, % | BE, ммоль/л | ВВ, ммоль/л |
| Початкова величина (n = 8) | 7,465 ± 0,003 | 38,62 ± 0,60 | 20,52 ± 0,42 | 99,29 ± 0,01 | -0,75 ± 0,04 | 46,99 ± 0,36 |
| Гостра масивна крововтрата, 30 хв (n = 6) | 7,322 ± 0,003* | 34,64 ± 0,45* | 18,37 ± 0,56* | 90,40 ± 0,02 | -2,40 ± 0,09* | 39,80 ± 0,27 |
| Гостра масивна крововтрата + фізіологічний розчин, 60 хв (n = 6) | 7,333 ± 0,004* | 36,50 ± 0,24** | 19,40 ± 0,44 | 98,50 ± 0,03# | -5,40 ± 0,06** | 42,50 ± 0,38** |
| Гостра масивна крововтрата + ліпосоми, 60 хв (n = 6) | 7,433 ± 0,002# | 25,20 ± 0,28** | 16,80 ± 0,34** | 99,20 ± 0,03# | -2,70 ± 0,05* | 43,20 ± 0,34 |
| Гостра масивна крововтрата + Ліпофлавон 60 хв (n = 6) | 7,455 ± 0,001# | 32,50 ± 0,24** | 22,30 ± 0,32# | 99,20 ± 0,03# | 0,00 ± 0,04** | 47,90 ± 0,45 |
| Гостра масивна крововтрата + ліпохром (n = 6) | 7,442 ± 0,003# | 35,64 ± 0,29 | 24,21 ± 0,28 | 99,34 ± 0,02# | 1,30 ± 0,07# | 49,34 ± 0,41# |

Примітка. Тут і в табл. 2: *p < 0,05 порівняно з початковою величиною;
#p < 0,05 порівняно з групою ГМК.

Таблиця 2

Функціональний стан системи згортання крові за умов гострої масивної крововтрати та застосування ліпосомальних препаратів

| Група тварин | Показник | | |
|---|----------------|-------------|--------------|
| | АПТЧ, с | ПЧ, с | ТЧ, с |
| Початкова величина (n = 16) | 39,4 ± 4,0 | 41,0 ± 3,7 | 47,2 ± 4,1 |
| Гостра масивна крововтрата, 45 хв (n = 6) | 50,4 ± 4,8 | 53,2 ± 5,4* | 65,7 ± 6,9 |
| Гостра масивна крововтрата + фізіологічний розчин (n = 6) | 168,9 ± 12,6** | 35,7 ± 0,9 | – |
| Гостра масивна крововтрата + ліпосоми (n = 6) | 45,3 ± 6,7 | 37,8 ± 2,7 | 94,3 ± 9,3** |
| Гостра масивна крововтрата + ліпофлавон (n = 6) | 23,7 ± 2,7 | 39,6 ± 8,5# | 48,2 ± 5,5 |
| Гостра масивна крововтрата + ліпохром (n = 6) | 23,73 ± 2,70* | 39,6 ± 4,5# | 48,2 ± 5,5 |

лужного стану крові (табл. 1, 2). Разом з тим, зменшення на 39,4 % активованого парціального тромбінового часу свідчить про можливе збереження гіперкоагуляції.

Тільки при використанні порожніх ліпосом з боку системи згортання зберігалися ознаки гіпокоагуляції, що проявлялося в значному подовженні тромбінового часу (табл. 1).

Перспективи застосування ліпосомальних препаратів при ГМК зумовлені здатністю ліпосом впливати на осно-

вні ланки патогенезу [18–19]. Нормалізація КЛС при крововтраті після інфузії ліпосомальних препаратів підтверджує доцільність такої терапії, а зміни параметрів системи згортання крові потребують подальшого вивчення.

Висновки

Гостра масивна крововтрата із загальної сонної артерії в об'ємі 2,5 мл/100 г маси щурів зі швидкістю 2 мл/хв викликає розвиток декомпенсованого геморагічного шоку. Розвиток шоку

супроводжується різноспрямованими змінами коагуляційного гемостазу: у ранньому періоді спостерігаються ознаки гіпер-, а на пізніх етапах – гіпокоагуляції, що слід розцінювати як початок ДВЗ-синдрому.

Введення ліпосомальних препаратів (ліпосом, Ліпофлакону, ліпохрому) значною мірою сприяє усуненню порушень гемостазу та запобігає розвитку декомпенсованого метаболічного ацидозу.

1. Военно-полевая хирургия локальных войн и вооруженных конфликтов: Руководство для врачей / Под ред. Е. К. Гуманенко, И. М. Самохина. – Москва : ГОЭТАР-Медиа, 2011. – С 135–148.
2. Корик В. Е. Политравма мирного времени / Корик В. Е., Дудинский Р. П., Панасенко С. И. // Военная медицина. – 2008. – С. 15–19.
3. Li Y. Creating a pro-survival and anti-inflammatory phenotype by modulation of acetylation in models of hemorrhagic and septic shock / Li Y., Alam H. B. // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – № 710. – P. 107–133.
4. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation / Levi M., Toh C. H., Thachil J., Watson H. G. // *British Journal of Haematology*. – 2009. – V. 145, Iss. 1. – P. 24–33.
5. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» / Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2006. – № 27. – С. 990, стаття 230. – (Бібліотека офіційних видань).
6. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей від 18.03.1986: Верховна Рада України, офіційний веб-портал: Міжнародні документи (Рада Європи) [Електронний ресурс]. –Режим доступу: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/main?find=1&sp=i&user=c393&text=%F2%E2%E0%F0%E8%ED&x=10&y=5>.
7. Experimental Models of Hemorrhagic Shock: A Review / Fülöp A., Turóczy Z., Garbaisz D. [et al.] // *European Surgical Research*. – 2013. – № 50. – P. 57–70.
8. McGill M. W. Biological Effects of Blood Loss: Implications for Sampling Volumes and Techniques / McGill M. W., Rowan A. N. // *ILAR J.* – 1989. – № 31 (4). – p. 5–20.
9. Experimental Trauma Models: An Update / Frink M., Andruszkow H., Zeczek Ch. [et al.] // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2011. – 15 p. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2011/797383.pdf>.
10. Мачабели М. С. Тромбогеморрагическая теория общей патологии / Мачабели М. С. // *Успехи физиол. наук.* – 1986. – Т. 17, № 2. – С. 56.
11. Баркаган З. С. Диагностика и контролируемая терапия нарушенный гемостаза / Баркаган З. С., Момот А. П. – Москва : Ньюдиамед, 2001. – 296 с.
12. Predicting life-threatening coagulopathy in the massively transfused trauma patient: hypothermia and acidoses revisited / Cosgriff N., Moore E. E., Sauaia A. [et al.] // *J. Trauma*. – 1997. – № 42. – P. 857–861.
13. Updates in the management of severe coagulopathy in trauma patients / Lynn M., Jeroukhimov I., Klein Y., Martinowitz U. // *Intensive Care Med.* – 2002. – № 28, Suppl 2. – P. S241–247.
14. Mikhail J. The trauma triad of death: hypothermia, acidosis, and coagulopathy / Mikhail J. // *AACN Clin Issues Crit Care Nurs.* – 1999. – № 10. – P. 85–94.
15. Moore F. A. The next generation in shock resuscitation / Moore F. A., McKinley B. A., Moore E. E. // *Lancet* 2004. – № 363. – P. 1988–1996.
16. Martini W. Z. The effects of hypothermia on fibrinogen metabolism and coagulation function in swine / Martini W. Z. // *Metabolism*. – 2007. – № 56. – P. 214–221.
17. Carroel R. G. Prevention of "irreversible" hemorrhagic shock by the preservation of cellular integrity / R. G. Carroel, S. G. Jams. // *Med. Hypotheses*. – 1987. – V. 24, № 1. – P. 69–75.
18. Baue A. E. Multiple Organ Failure: Pathophysiology, Prevention, and Therapy / A. E. Baue, E. Faist, D. Fry. – 2000. New York: Springer. – 712 p.
19. Risk factors for trauma-induced coagulopathy- and transfusion-associated multiple organ failure in severely injured trauma patients / K. Balvers, M. R. Wirtz, S. van Dieren [et al.] // *Frontiers in medicine*. – 2015. – № 2. – P. 1–11.

Н. В. Добреля, Т. А. Карацуба, Н. С. Гула, Ю. О. Дуняк, Л. В. Бойцова, І. В. Данова, С. М. Тишкін, О. С. Хромов

Корекція порушень гемостазу при гострій масивній крововтраті ліпосомальними препаратами

Мета дослідження – вивчення впливу ліпосомальних препаратів на систему згортання крові при гострій масивній крововтраті.

Проведені дослідження показали, що гостра масивна крововтрата з загальної сонної артерії в об'ємі більшому, ніж 33 % об'єму циркулюючої крові супроводжувалася розвитком шокового стану та загибеллю тварин (щурів) протягом 49 хв.

Гостра масивна крововтрата викликала розвиток декомпенсованого геморагічного шоку. Розвиток шоку супроводжувався різноспрямованими змінами коагуляційного гемостазу: у ранньому

періоді спостерігали ознаки гіпер-, а на пізніх етапах – гіпокоагуляції, що слід розцінювати як початок ДВЗ-синдрому.

Уведення ліпосомальних препаратів (ліпосом, Ліпофлаону, ліпосомальної форми цитохрому С – ліпохрому) до інфузійного середовища призводило до 100 % виживання тварин упродовж усього періоду спостереження (60 хв) та значною мірою сприяло усуненню порушень гемостазу та запобігало розвитку декомпенсованого метаболічного ацидозу.

Ключові слова: гостра масивна крововтрата, ліпосоми, Ліпофлаон, ліпосомальна форма цитохрому С, коагуляційний гемостаз

Н. В. Добреля, Т. А. Карацуба, Н. С. Гула, Ю. О. Дуняк, Л. В. Бойцова, І. В. Данова, С. М. Тишкін, А. С. Хромов

Коррекция нарушений гемостаза при острой массивной кровопотере липосомальными препаратами

Цель исследования – изучение влияния липосомальных препаратов на систему свертывания крови при острой массивной кровопотере.

Проведенные исследования показали, что кровопускание из общей сонной артерии в объеме больше, чем 33% объема циркулирующей крови, приводило к возникновению декомпенсированного геморрагического шока, сопровождавшегося гибелью животных (крыс) в течение 49 мин.

Развитие шока сопровождалось разнонаправленными изменениями коагуляционного гемостаза: в раннем периоде наблюдали признаки гипер-, а на поздних этапах – гипкоагуляции, что следует расценивать как начало ДВС-синдрома. Все оцениваемые индикаторные показатели состояния свертывающей системы крови через 30 мин после кровопотери уменьшились: протромбиновое время – на 31,5 %, тромбиновое время – на 39,2 %, активированное парциальное тромбопластиновое время – на 27,9 %, что свидетельствовало об усилении коагуляционной активности крови. Через 45 мин после кровопотери все эти показатели были значительно увеличены, что характерно для стадии гипкоагуляции. Наблюдалось развитие субкомпенсированного метаболічного ацидоза с уменьшением напряжения CO₂ и дефицитом буферных оснований в артериальной крови.

Введение липосомальных препаратов (ліпосом, Ліпофлаона, ліпосомальної форми цитохрому С – ліпохрому) в инфузионную среду приводило к 100 % выживаемости животных в течение всего периода наблюдения (60 мин), во многом способствовало устранению нарушений гемостаза и предотвращало развитие декомпенсированного метаболічного ацидоза.

Ключевые слова: острая массивная кровопотеря, липосоми, Ліпофлаон, ліпосомальна форма цитохрому С, коагуляційний гемостаз

N. V. Dobrelja, T. A. Karazuba, N. S. Gula, Y. O. Dunyak, L. V. Boytsova, I. V. Danova, S. M. Tishkin, O. S. Khromov

The correction of hemostatic disorders with liposomal drugs in acute massive blood loss

This study was aimed to investigate a haemostatic activity of the liposomal drugs in acute massive blood loss.

The received data showed that acute massive exsanguination from the common carotid artery above 33 % of blood volume resulted to the development of decompensated hemorrhagic shock accompanied by death of the animals (rats) within 49 min.

The shock development was accompanied with the multidirectional changes in coagulation haemostasis: hypercoagulation in the early period and hypocoagulation in the later stages, which should be regarded as the onset of disseminated intravascular coagulation (DIC). All measured indicators of the blood coagulation status were decreased 30 min after blood loss: prothrombin time – by 31,5 %, thrombin time – by 39,2 %, activated partial thromboplastin time – by 27,9 %, indicating the blood coagulation activity strengthening. All these indicators became significantly increased 45 min after blood loss, which is typical for the hypocoagulation stage. The subcompensated metabolic acidosis was developed with decrease in CO₂ tension and lack of buffer bases in the arterial blood.

The infusion of saline solution with the liposomal drugs (liposomes, Lipoflavon, liposomal form of cytochrome C – Lipochrom) led to 100 % survival of animals throughout the follow-up period (60 min), contributed significantly to the elimination of hemostasis disorders, and prevents the development of decompensated metabolic acidosis.

Key words: acute massive blood loss, liposomes, Lipoflavon, liposomal cytochrome C, coagulation hemostasis

Надійшла: 4 грудня 2015 р.

Контактна особа: Хромов Олександр Станіславович, головний науковий співробітник, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 02 88. Електронна пошта: askhromov@mail.ru