

Шперлинг И.А.¹, Галака А.А.², Соловьев И.А.², Крупин А.В.¹, Романов П.А.¹, Шперлинг М.И.², Габриелян М.А.²

Эффективность восполнения острой экспериментальной кровопотери кровезаменителем с эритроцитами пуповинной крови человека

1 - ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, 195043, ул. Лесопарковая д.4, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация;
2 - ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, 194044, ул. Ак. Лебедева д.6, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Shperling I.A., Galaka A.A., Solovyev I.A., Krupin A.V., Romanov P.A., Shperling M.I., Gabrieljan M.A.

The efficiency of replenishment of acute blood loss by an experimental blood substitute comprising human's umbilical cord blood red blood cells

Резюме

С целью оценки эффективности экспериментального кровезаменителя, содержащего эритроциты пуповинной крови человека, проведен анализ динамики показателей сердечно-сосудистой и дыхательной систем, количественных показателей красной крови, выраженности гемолиза у собак в течение 24 часов после восполнения острой экспериментальной кровопотери около 50% от объема циркулирующей крови. Препаратом сравнения служила эритроцитарная масса человека, используемая в клинической практике. Установлено, что после восполнения кровопотери у собак развивалась гемолитическая анемия, менее выраженная после трансфузии кровезаменителя с эритроцитами пуповинной крови человека. Показатели деятельности сердечно-сосудистой и дыхательной систем восстанавливались до исходного уровня через 24 часа после восполнения кровопотери экспериментальным кровезаменителем с эритроцитами пуповинной крови человека при сохраняющихся изменениях после вливания эритроцитарной массы человека. Сравнительно более высокая эффективность экспериментального кровезаменителя объясняется структурно-функциональной стабильностью эритроцитов пуповинной крови. Сделано заключение о перспективности разработки кровезаменителей-переносчиков кислорода, содержащих эритроциты пуповинной крови человека.

Ключевые слова: острая кровопотеря, экспериментальный кровезаменитель, эритроциты пуповинной крови человека.

Summary

To assess the effectiveness of the experimental blood substitute containing erythrocytes of human umbilical cord blood, were analyzed the dynamics of indicators of cardiovascular and respiratory systems, quantitative indicators of red blood, the severity of hemolysis in dogs within 24 hours after equivalent replenishment of acute blood loss for about 50% of the volume of circulating blood. The comparative drug was the adult human packed RBCs, used in clinical practice. It was found that after replenishment of blood loss in dogs, hemolytic anemia developed less pronounced after transfusion of the blood substitute with erythrocytes of human umbilical cord blood. Indicators of cardiovascular and respiratory systems were restored to the baseline in 24 hours after replenishment of acute blood loss by an experimental blood substitute with human umbilical cord blood erythrocytes with persistent changes after transfusion of the adult human packed RBCs. The relatively higher efficiency of the experimental blood substitute is due to the structural and functional stability of erythrocytes in the umbilical cord blood. A conclusion was made about the prospects of development of blood substitutes-oxygen carriers containing human umbilical cord blood erythrocytes.

Key words: acute blood loss, an experimental blood substitute, human umbilical cord blood erythrocytes.

Введение

Одним из наиболее грозных последствий травматических повреждений является кровотечение. Уменьшение объема циркулирующей крови (ОЦК) вследствие массив-

ной кровопотери приводит к развитию гиповолемии и циркуляторной гипоксии, которая, в случае несвоевременно проведенной терапии, трансформируется в гемическую и смешанную. Затем происходит активация системы гемоста-

за, что способствует развитию диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, усугубляя гипоксию [1]. Результатом гипоксии является комплекс метаболических нарушений, угасание жизненно-важных функций и гибель организма. В связи с этим, основными задачами выполнения ОЦК при массивных кровотечениях являются: нормализация макро- и микрогемодинамики, повышение кислородной емкости крови, коррекция метаболических нарушений [2, 3].

В настоящее время наиболее эффективным способом коррекции гипоксического состояния при острой массивной кровопотере является трансфузия эритроцитарной массы человека (ЭрМЧ). Однако, несмотря на многолетнюю клиническую практику ее использования, не решены вопросы, касающиеся развития неблагоприятных клинических явлений, связанных с особенностями данного препарата. Посттрансфузионные осложнения (острые и отсроченные гемолитические реакции, анафилактический шок, отек легких, острая почечная недостаточность и др.) в результате переливания ЭрМЧ обусловлены разрушением части эритроцитов в сосудистом русле (внутрисосудистый гемолиз). Этот процесс связан как с изменением свойств мембран донорских эритроцитов вследствие хранения, так и с процессами, развивающимися в результате их контакта с эритроцитами реципиента (агглютинация), способствующими механическому разрушению клеток в мелких сосудах [4, 5]. Кроме того, разрушению донорских эритроцитов способствует воздействие на них факторов, формирующихся в результате развивающегося патологического процесса в организме больного (кислотно-основной и водно-солевой дисбаланс, эндотоксины и др.) [2]. Очевидно, что развивающийся гемолиз в тяжелых клинических ситуациях может привести к развитию гемолитической анемии и прогрессированию тяжести состояния пациента.

Кроме того, эритроциты содержат ряд вне- и внутриэритроцитарных факторов свертывания и фибринолиза (эритроцитин, ацклерин эритроцитов, фибринстабилизирующий фактор эритроцитов и др.), что при массивном гемолизе дополняет перечень причин нарушения геморегуляции. В свою очередь, внеэритроцитарный гемоглобин является токсическим агентом, повреждающим почечные каналы [6, 7].

Таким образом, поиск возможных путей снижения риска развития гемолиз-ассоциированных осложнений, развивающихся в результате трансфузий препаратов крови – переносчиков кислорода, является актуальным.

Одним из вариантов решения рассматриваемой проблемы является разработка кровезаменителей, содержащих молодые эритроциты. Достижения современных медицинских технологий позволили выделить эритроцитарную массу из пуповинной крови человека. Состав эритроцитарной популяции пуповинной крови представлен «молодыми» клетками, обладающими большей устойчивостью к различного рода критическим воздействиям. Это обосновало их применение с целью выполнения алло- и аутогемотрансфузий новорожденным детям при целом ряде патологических состояний, в том

числе, при врожденных пороках развития [8-12]. В настоящее время показания к применению эритроцитарной массы пуповинной крови человека регламентированы приказами Минздрава РФ от 25 ноября 2002 г. № 363 «Об утверждении Инструкции по применению компонентов крови» [4] и от 2 апреля 2013 г. № 183н «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов» [13].

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности экспериментального кровезаменителя, содержащего эритроциты пуповинной крови человека, при выполнении острой экспериментальной кровопотери у собак.

Материалы и методы

Требования к методам оценки эффективности кровезаменителей-переносчиков кислорода предусматривают использование собак в качестве экспериментальных животных, что обусловлено их сходством с человеком в отношении механизмов свертывания крови, сердечно-сосудистых и гемодинамических реакций на острую кровопотерю [14-17]. Вместе с тем, методология оценки эффективности кровезаменителей, содержащих клеточные компоненты крови, в рамках доклинических исследований не регламентирована, что диктует необходимость адаптации существующих методик к реальным условиям.

Учитывая хорошую управляемость и воспроизводимость экспериментальных моделей, базирующихся на подходе управляемой кровопотери [17], а также их высокую информативность в контексте решаемых в данном исследовании задач нами была использована экспериментальная модель острой кровопотери на основе классической модели острой кровопотери Уингерса [14, 18, 19].

Материалом исследования служили данные, полученные в результате экспериментов на 10 собаках-самцах метисах весом 15-25 кг, у которых моделировали острую кровопотерю в расчетном объеме до 50% ОЦК. Эксперименты проведены в соответствии с требованиями нормативно-правовой базы по работе с лабораторными животными и требованиями локального этического комитета.

Исследование проводилось в оборудованной экспериментальной операционной при естественном освещении, нормальной температуре и влажности. За 12 часов до начала эксперимента животных не кормили и не поили, после проведения эксперимента доступ к воде и пище им не был ограничен.

Острую кровопотерю моделировали после общего обезболивания, производимого путем внутримышечного введения Sol. Zoletili 100 и Sol. Xilazini 2% в соотношении 1:5 из расчета 0,1 мл/кг веса. После заваливания животного набор (результат фармакологического действия анестетика) оно размещалось на хирургическом столе. Эксфузию крови осуществляли из катетеризированной бедренной артерии в расчетном объеме до 50% ОЦК под контролем показателей сердечной деятельности. Критериями прекращения эксфузии являлось появление групповых экстрасистол на кардиограмме при частоте сердечных сокращений более 170 уд/мин.

В зависимости от проводимого лечения, животные были распределены на группы по 5 особей: 1-я (опыт), 2-я (сравнение), в которых собакам после эксфузии крови внутривенно вводили экспериментальный кровезаменитель с эритроцитами пуповинной крови человека (ЭКЭМПКЧ) или ЭрМЧ соответственно. ЭКЭМПКЧ – препарат в виде раствора-композиции, состоящий из жидкой фракции (4% раствор модифицированного желатина с добавлением натрия хлорида, натрия гидроксида) и эритроцитарной массы пуповинной крови человека. Гематокрит ЭКЭМПКЧ составлял 52-55%. Препарат сравнения – ЭрМЧ – средство, используемое в клинической практике и по показателям биологической полноценности соответствующего государственному техническому регламенту «О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии» (утв. постановлением Правительства РФ от 26 января 2010 г. № 29) [21]. Гематокрит ЭрМЧ составлял 65-75%. С целью стандартизации условий эксперимента гематокрит обоих препаратов приводили к 40% добавлением соответствующих растворов: ЭКЭМПКЧ – 4% раствора модифицированного желатина с добавлением натрия хлорида, натрия гидроксида; ЭрМЧ – раствора Рингера. Соотношение объемов «кровопотери/восполнение» составляло 1 : 1. При этом, животным в группах «опыт» и «сравнение» внутривенно вводили 50% ЭКЭМПКЧ и 50% ЭрМЧ от общего расчетного объема восполнения кровопотери соответственно. Для восполнения оставшегося от расчетного объема восполнения кровопотери животным в опытной группе вводили 4% раствор модифицированного желатина с добавлением натрия хлорида, натрия гидроксида, а животным в группе сравнения – раствор Рингера. Кровезаменители вводили в следующем режиме: через 5 мин после окончания эксфузии крови в яремную вену животного дробно капельно с интервалами по 3-4 минуты и перерывом между интервалами по 2-3 минуты [14, 20]. Учитывая очевидную бинесовместимость крови собаки и человека ввиду особенностей различного антигенного состава эритроцитов, внимание на результатах проб на индивидуальную совместимость крови донора и реципиента не акцентировалось.

Все образцы препаратов и растворов были представлены ООО «Клеточные системы» (г. Москва).

Эффективность исследуемых образцов кровезаменителей оценивали по динамике функциональных и лабораторных показателей. Среднее артериальное давление (АД_{ср.}, мм.рт.ст.), частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), число дыхательных движений за 1 мин (ЧДД, ДД/мин) регистрировали с помощью многопараметрового ветеринарного монитора IM-10 (ZooMed, Россия); значения минутного объема крови (МОК, мл/мин), ударного объема (УО, мл) определяли расчетным методом [22-25]; количественные показатели крови: концентрацию гемоглобина (Hb, г/л), количество эритроцитов (Er, $\times 10^{12}/л$), гематокрит (Ht, %) определяли с помощью автоматического гематологического анализатора Abacus (Венгрия). Оценку интенсивности внутрисосудного гемолиза пу-

тем расчета индекса деструкции эритроцитов (ИДесЭ, усл. ед.) [26]. Для этого с помощью полуавтоматического фотометра «КФК-3» (Россия) гемиглобинцианидным методом определяли концентрацию внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ, г/л) в плазме крови [27, 28].

Оценку изменения перечисленных параметров осуществляли до эксфузии крови, после ее окончания и через 24 часа после восполнения кровопотери.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы Statistica 10. Отличия между выборками оценивали с помощью критерия Манна-Уитни (U). Достоверность различий считали при $p < 0,05$. В таблицах числовые значения представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение показателя в группе, m – среднее квадратическое отклонение.

Результаты и обсуждение

Эксфузия крови у собак в расчетном объеме до 50% от ОЦК вызывала относительно исходных значений снижение АД_{ср} на 60,4% (до $34,5 \pm 0,8$ мм.рт.ст., $p < 0,05$), УО – на 22,7% (до $24,6 \pm 4,0$ мл, $p < 0,05$), повышение ЧСС на 82% (до 147 ± 8 уд/мин, $p < 0,05$), МОК – на 68,2% (до $4395,2 \pm 1400,0$ мл/мин, $p < 0,05$), ЧДД – на 202% (до 51 ± 3 в мин, $p < 0,05$). Длительность вливания препаратов составляла 30-40 мин, при этом в течение первых 5 мин трансфузии отмечалось резкое увеличение ЧДД до 60-62 в мин, что объясняется физиологической реакцией на гемолитическую ситуацию в организме вследствие развивавшегося иммунного конфликта в ответ на трансфузию крови человека собаке. Далее ЧДД уменьшалась к моменту окончания периода трансфузии и приходила к исходным значениям после переливания ЭКЭМПКЧ при сохраняющихся изменениях у собак в группе сравнения. Показатели деятельности сердечно-сосудистой системы восстанавливались к исходу периода наблюдения у животных в опытной группе на фоне сохраняющихся изменений гемодинамики у животных после введения ЭрМЧ.

Экспериментальная кровопотеря вызывала изменение количественных показателей крови у животных во всех группах. Трансфузия кровезаменителей вызвала развитие гемолитической анемии в течение всего периода наблюдения (1 сут), однако степень ее выраженности была существенно ниже после вливания ЭКЭМПКЧ. Исследования плазмы крови после окончания трансфузии препаратов у собак регистрировали интенсивное разрушение эритроцитов: значения ИДесЭ достоверно ($p < 0,05$) превышали исходные значения в 47,5 раз и 68,7 раз, а к окончанию 1-х сут после восполнения кровопотери – в 6 и 26 раз после вливания ЭКЭМПКЧ и ЭрМЧ соответственно (таблица 1).

Известно, что в кровеносном русле среди всех циркулирующих эритроцитов до 5-6% клеток находятся в предгемолитическом состоянии [6]. Вместе с тем, при воздействии на эритроциты различных факторов, в том числе иммунных, токсических, физических (механические, термические, радиационные и др.), доля эритроцитов, находящихся в предгемолитической стадии, существенно повышается, что обусловлено ускоренным

Таблица 1. Количественные показатели крови у собак в динамике после однократного выполнения кровопотери в расчетном объеме около 50% ОЦК, М±m

Препарат	Показатель	Сроки исследования			
		До эксфузии	После эксфузии	После восполнения кровопотери	Через 24 ч после восполнения кровопотери
ЭКЭМПКЧ	Ег, × 10 ¹² /л	6,89±0,39	3,23±0,31	4,09±0,23*	5,18±0,79*
	Ht, %	47,7±2,8	21,8±1,9	27,4±4,9*	33,9±5,4*
	ИДесЭ, усл. ед.	0,16±0,03	0,16±0,02	7,6±0,6*	0,9±0,33*
ЭрМЧ	Ег, × 10 ¹² /л	7,24±0,77	3,56±0,55	3,21±0,21	2,19±0,45
	Ht, %	43,9±5,2	21,4±2,2	19,6±1,1	15,6±1,3
	ИДесЭ, усл. ед.	0,15±0,03	0,15±0,02	10,3±0,8	3,93±1,08

«старением» эритроцитов [6]. Учитывая очевидный факт биологической несовместимости эритроцитов человека и компонентов крови собаки, можно говорить о некотором подобии теста на комплексную стабильность эритроцитов, входящих в состав исследуемых кровезаменителей. Результаты исследования показали более значимый физиологический эффект эритроцитов пуповинной крови по отношению к таковому у эритроцитов заготовленной донорской крови.

Заключение

Таким образом, восполнение острой кровопотери у собак в расчетном объеме до 50% ОЦК образцом кровезаменителя с ЭКЭМПКЧ по эффективности и характеру влияния на показатели сердечно-сосудистой и дыхательной систем, количественные показатели красной крови экспериментальных животных было существенно бо-

лее положительным относительно эффектов препарата сравнения – ЭрМЧ. Несмотря на сходства оказываемых эффектов ЭКЭМПКЧ и ЭрМЧ на организм животных, опытный образец кровезаменителя с эритроцитами пуповинной крови человека показал большую эффективность как с точки зрения сохранения «стабильности» своей клеточной составляющей в сосудистом русле, так и с позиции поддержания волемической функции крови [29, 30, 31]. Это объясняется более стабильной структурно-метаболической организацией эритроцитов пуповинной крови и, как следствие, сохранением эластичности мембран, лучшей деформируемостью и устойчивостью к гемолиз-индуцирующим факторам [32]. Анализ результатов исследования указывает на перспективность разработки кровезаменителей-переносчиков кислорода, содержащих эритроциты пуповинной крови человека для восполнения кровопотери различной этиологии.■

Литература:

1. Кричевский Л. А., Рыбаков В. Ю., Гусева О. Г., [и др.] Ранняя диагностика критических перфузионных расстройств кровообращения. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (3): 25-30.
2. Гольдберг Е.Д., Новицкий В.В., Уразова О.И. *Патофизиология системы крови*. В.В. Новицкий (ред.), Е.Д. Гольдберг (ред.), О.И. Уразова (ред.) Патофизиология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. 21-148.
3. Шанин В.Ю., ред. *Патофизиология. Руководство для слушателей и врачей Военно-медицинской академии и военно-медицинских институтов*. СПб.: «ЭЛБИ-СПБ»; 2005. 639.
4. Приказ Минздрава РФ от 25 ноября 2002 г. № 363 «Об утверждении Инструкции по применению компонентов крови». М.; 2002.
5. Жибурт Е.Б., Мадзаев С.Р., Вергопуло А.А., [и др.] *Гемоконпонентная терапия: плюсы и минусы*. *Здравоохранение*. 2015; 11: 40-47.
6. Шиффман Ф.Дж., ред. *Патофизиология крови. Перевод с английского. М – СПб.: Изд. «БИНОМ» – «Невский диалект»; 2000. 448.*
7. Грицюк А. И., Амосова Е. Н., Грицюк И. А. *Практическая гемостазиология*. Киев: Здоровье; 1994. 256.
8. Тутков К.В. Аутотрансфузия эритроцитов пуповинной крови детям с врожденными пороками развития при раннем хирургическом вмешательстве. *Анестезиология и реаниматология*. 2014; 6: 38-43.
9. Khodabux C.M., van Beckhoven J.M., Scharenberg J.C., [et al.] Processing cord blood from premature infants into autologous red-blood-cell products for transfusion. *Vox Sang*. 2011; 100 (4): 367-73.
10. Morris K.P., Naqvi N., Davies P. [et al.] A new formula for blood transfusion volume in the critically ill. *Arch. Dis. Child*. 2005; 90: 724-728.
11. Заготовка, хранение и применение аутологичной эритроцитной массы из пуповинной крови для терапии анемии у новорожденных (медицинская технология) / Сухих Г.Т., Федорова Т.А., Байбарина Е.Н., Антонов А.Г., Кучеров Ю.И., Розачевский О.В., Тутков К.В. [и др.] М.; 2011.
12. Chakrabarty, P., Rudra, S. Autologous or allogenic uses of umbilical cord blood whole or RBC transfusion - a

- review. *Mymensingh Med J.* 2013; 22 (1): 210-217.
13. Приказ Минздрава РФ от 2 апреля 2013 г. № 183н «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов». М.; 2013.
 14. Миронов А.Н., ред. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, ч.1. М.: Гриф и К; 2012. 812-827.
 15. Hall K.E., Sharp C.R., Adams C.R., Beilman G.A. *Novel trauma model: naturally occurring canine trauma. Shock* 2014; 41: 25-32. doi: 10.1097/SHK.000000000000058.
 16. Fleischer S., Sharkey M., Mealey K., [et al.] *Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model. AAPS J* 2008; 10: 110-119. doi: 10.1208/s12248-008-9011-1.
 17. Valparaiso A.P., Vicente D.A., Bograd B.A., [et al.] *Modeling acute traumatic injury. J Surg Res.* 2014; 194(1): 220-232. doi: 10.1016/j.jss.2014.10.025.
 18. Wiggers C.J. *Physiology of Shock. Irreversible shock.* New York: Commonwealth Fund; 1950; 121-146.
 19. Gutierrez G., Reines H.D. Wulf-Gutierrez M.E. *Clinical review: Hemorrhagic shock. Critical Care.* 2004; 8: 373-381. doi 10.1186/cc2851.
 20. Vesterinen H.M., Sena E.S., Egan K.J., Hirst T.C., Churolov L., Currie G.L., [et al.] *Meta-analysis of data from animal studies: a practical guide. J Neurosci Methods.* 2014; 221: 92-102. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.09.010.
 21. Приложение №1 постановления Правительства РФ от 26 января 2010 г. № 29 «Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезаменяющих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии». М.; 2010.
 22. Вейн А.М., ред. *Вегетативные расстройства: клиника, диагностика, лечение.* М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003; 752: 57.
 23. Филимонов В.И., ред. *Руководство по общей и клинической физиологии.* М.:МИА, 2002; 958.
 24. Пестряев В.А., Кинжалова С.В., Макаров Р.А. *Определение минутного объема крови в покое по показателям артериального давления, частоты пульса, веса и роста и обоснование нового индекса минутного объема крови. Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2012; 3: 85-86.
 25. Ярочкин В.С., Багдасаров В.В., Багдасарова Е.А. [и др.] *Патофизиологические критерии и патогенез постинфузионных осложнений при острой кровопотере. Хирургия.* 2010; 7: 41-48.
 26. Шперлинг И.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., [и др.] *Структурно-функциональный статус эритроцитов периферической крови при остром воздействии оксида углерода. Токсикологический вестник.* 2006; 6: 2-6.
 27. Тонкошкурова О.А., Дмитриев А.И., Дмитриева Р.Е. *Определение концентрации внеэритроцитарного гемоглобина плазмы (сыворотки) крови гемиглобинцианидным методом. Клиническая лабораторная диагностика.* 1996; 2: 21-22.
 28. Долгов В.В., Ованесов Е.Н., Щетникович К.А. *Фотометрия в лабораторной практике.* СПб; 2004: 66-79.
 29. Darling R.C., Smith C.A., Asmussen E., Cohen F.M. *Some properties of human fetal and maternal blood. Journal of Clinical Investigation.* 1941; 20(6): 739-747. doi: 10.1172/JCI1101267.
 30. Akinsheye I., Alsultan A., Solovieff N., [et al.] *Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. Blood.* 2011; 118(1): 19-27. doi: 10.1182/blood-2011-03-325258.
 31. Whittsett C., Vaglio S., Grazzini G. *Alternative blood products and clinical needs intr transfusion medicine: review article. Stem Cells International.* 2012. Article ID 639561, 14 p. doi:10.1155/2012/639561.
 32. Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. [и др.] *Патология эритроцита при экзогенной интоксикации. Тамск,* 2006; 122.