

ВЛИЯНИЕ РЕИНФУЗИИ НА ФЕНОМЕН ОБРАЗОВАНИЯ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАХ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ МАССИВНОЙ КРОВОПОТЕРЕ

В. Л. Кожура, Н. В. Кондакова, Т. А. Тлатова, А. К. Кирсанова

ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Научно-исследовательский
и учебно-методический Центр биомедицинских технологий ВИЛАР РАСХН, Москва

Impact of Reperfusion on the Micronucleus Generation Phenomenon in the Bone Marrow Red Blood Cells in Massive Blood Loss

I. L. Kozhura, N. V. Kondakova, T. A. Tlatova, A. K. Kirsanova

Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences; Research and Training Center of Biomedical Technologies, All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow

В экспериментах на белых нелинейных наркотизированных крысах-самцах массой 250–350 г. установлено, что реперфузия крови после острой массивной кровопотери значительно повышает (в целом в 8,4 раза по сравнению с контролем) количество эритроцитов с микроядрами (МЯ) в костном мозге, что свидетельствует о дестабилизации генома. Оптимальное время выхода полихроматофильных эритроцитов с МЯ составляет 24 ч после острой кровопотери и также после реинфузии. Внутриаартериальное введение мексидола (50 мг/кг) непосредственно перед реинфузией крови резко снижает количество клеток с МЯ практически до уровня контрольных животных. Наблюдающиеся эффекты по МЯ-тесту, в целом, соответствуют изменениям ПОЛ и общей антиоксидантной активности, что указывает на свободнорадикальный механизм этого феномена.

Experiments on non-inbred anesthetized albino male rats weighing 250–350 g have established that blood reperfusion after acute massive blood loss substantially increases the count of micronucleated (MN) erythrocytes in the rat bone marrow by 8.4 times as a whole as compared with the control, which suggests genomic destabilization. The optimum time of elaboration of MN polychromatic erythrocytes is 24 hours after acute blood loss or reinfusion. The intraarterial administration of mexidole (50 mg/kg) just before blood reinfusion drastically decreases the count of MN erythrocytes virtually to the that seen in control animals. The observed effects during micronucleus assay generally correspond to the changes in lipid peroxidation and overall antioxidative activity, pointing to the free radical mechanism of this phenomenon.

Кровопотеря является одной из наиболее частых причин гибели пострадавших при массовых техногенных катастрофах [1]. Актуальной медицинской и общепроцессуальной проблемой является внедрение новых технологий жизнеобеспечения в реаниматологическую практику для достижения полноценного восстановления функций организма после массивной кровопотери. Для решения этого вопроса необходима как можно более полная информация о процессах, развивающихся при критических состояниях [2, 3]. Результаты исследований, проведенных в последние годы, показывают, что критические состояния, в том числе при острой массивной кровопотере [4], относятся к свободнорадикальным патологиям, как и лучевая болезнь, экологические токсикозы, болезни сердечно-сосудистой системы, нейродегенеративные и онкологические заболевания, диабет, заболевания воспалительного генеза и т. д. Общим для них являются образование активных форм кислорода, свободных радикалов и низкомолекулярных эндогенных прооксидантов (перекись

водорода, липопероксиды, гипохлорная кислота, пероксинитрит) и ослабления системы антиоксидантной защиты организма [5,6]. Выявлено, что образование активных радикалов приводит к разрыву мембран, нарушению структуры хроматина клеток и, как следствие, — к появлению хромосомных aberrаций и накоплению мутаций [6–9].

Известно также, что кровопотеря вызывает активацию кроветворения и ускорение фаз митоза при гемопоэзе [10, 11], что, в свою очередь, может приводить к увеличению ошибок при репликации ДНК. Эти обстоятельства позволили нам предположить, что острая массивная кровопотеря индуцирует нестабильность генома, которая, как известно, опасна своими отдаленными последствиями (увеличение риска онкологических заболеваний, аномалий в развитии потомства, преждевременное старение, сокращение продолжительности жизни) [12]. Данные об изучении нарушения состояния генетического аппарата при кровопотере и реанимации в литературе отсутствуют.

Таблица 1

Результаты оценки цитогенетических повреждений (появление клеток полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ), содержащих микроядра (МЯ)) в костном мозге крыс при кровопотере и реинфузии и введении мексидола, на различных сроках исследования. Кровопотеря — АД 40 мм рт. ст. в течение 1 ч (контроль: ложнооперированные крысы)

№	Варианты опытов	Число крыс	Число ПХЭ	Число ПХЭ с МЯ	Выход МЯ на 1000 ПХЭ
А. 20 ч					
1	Кровопотеря	7	33 000	90	2,73±0,20
2	Кровопотеря + реинфузия	7	41 000	99	2,41±0,20
3	Кровопотеря + Мексидол + реинфузия	7	32 000	20	0,63±0,08
4	Контроль	7	30 000	4	0,13±0,03
Б. 22 ч					
1	Кровопотеря	7	29 000	74	2,55±0,10
2	Кровопотеря + реинфузия	7	49 000	148	3,02±0,23
3	Кровопотеря + Мексидол + реинфузия	6	26 000	20	0,77±0,06
4	Контроль	4	18 000	9	0,50±0,03
В. 24 ч					
1	Кровопотеря	7	34 000	121	3,56±0,13
2	Кровопотеря + реинфузия	7	32 000	134	4,19±0,17
3	Кровопотеря + Мексидол + реинфузия	7	28 000	22	0,79±0,07
4	Контроль	7	36 000	18	0,50±0,04
Г. 28 ч					
1	Кровопотеря	6	30 000	89	2,97±0,30
2	Кровопотеря + реинфузия	7	42 000	100	2,38±0,20
3	Кровопотеря + Мексидол + реинфузия	6	24 000	24	1,00±0,06
4	Контроль	7	30 000	17	0,57±0,06
Д. 30 ч					
1	Кровопотеря	7	32 000	64	2,00±0,42
2	Кровопотеря + реинфузия	7	28 000	69	2,46±0,25
3	Кровопотеря + Мексидол + реинфузия	6	30 000	27	0,90±0,13
4	Контроль	4	24 000	13	0,54±0,06
Е. 7 сут					
1	Кровопотеря	—	—	—	—
2	Кровопотеря + реинфузия	6	36 000	19	0,52±0,07
3	Кровопотеря + Мексидол + реинфузия	—	—	—	—
4	Контроль	6	32 000	6	0,19±0,03

Классическим методом оценки генетических повреждений является метод хромосомных aberrаций (ХА) [13, 14], однако в последние годы широкое распространение получил метод оценки нестабильности генома по появлению микроядер в дочерних клетках за счет ацентрических фрагментов хромосом или потери целых хромосом при нарушении центромеры (МЯ-тест), как более простой и быстрый, чем традиционный метафазный анализ хромосомных aberrаций, не уступающий ему по точности [13, 14] и позволяющий работать *in vivo* при слабых воздействиях [14–16]. В экспериментах *in vivo* наиболее удобной популяцией клеток для подсчета частоты появления микроядер являются полихроматофильные эритроциты (ПХЭ) костного мозга [17]. Они представляют собой предпоследний этап в процессе эритропоэза и одновременно конечный продукт серии делений бластовых клеток. Сразу после последнего митоза бластовой клетки дочерние клетки вступают в стадию безъядерных полихроматофильных эритроцитов, которые в дальнейшем претерпевают различные структурные и метаболические изменения и превращаются в нормохроматофильные (зрелые) эритроциты.

Проведенное нами исследование на разработанной в НИИ ОР РАМН [18] биотехнологической

модели кровопотери и реанимации с использованием крыс в качестве экспериментальных животных подтвердило наше предположение: острая массивная кровопотеря с длительным периодом артериальной гипотензии (АД — 40 мм рт. ст. в течение 1 ч) вызывала через 24 ч постгеморрагического периода достоверное увеличение в костном мозге крыс количества полихроматофильных эритроцитов с микроядрами по сравнению со спонтанным уровнем [19].

Цель работы — провести дальнейшее изучение феномена дестабилизации генома клеток костного мозга при острой массивной кровопотере и реинфузии с тестированием МЯ на разных сроках после кровопотери и реанимации, а также возможность коррекции возникающих цитогенетических повреждений. Для этого был использован синтетический препарат мексидол (2-этил-6-метил-3-оксипиридин сукцинат), относящийся к группе гетероциклических фенольных соединений с атомом азота в гетероцикле. Установлено, что мексидол является ингибитором свободнорадикальных процессов, активирует антиоксидантную систему ферментов, тормозит процессы перекисного окисления липидов клеток, обладает липид-регулирующими свойствами, оказывает мембраностабилизирующее и антиагрегантное действие [20].

Таблица 2

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантная активность (АОА) плазмы крови крыс через 24 часа после реанимации и влияние профилактического введения мексидола.

Определение методом хемилюминесценции (ХЛ):

ПОЛ — по ХЛ, индуцированной Fe^{2+} , АОА — по ХЛ, индуцированной H_2O_2 .

Показатель	Интенсивность, в усл. ед.		
	Интakтные крысы	Гипотензия + реинфузия	Гипотензия + Мексидол + реинфузия
ПОЛ	291,5±26,2 (100 ± 9,0) %	401,2 ± 7,5 (138,0 ± 2,6) %	324,2±27,0 (111,2 ± 8,9) %
АОА	173,6 ± 14,0 (100 ± 8,1) %	202,4 ± 2,0 (85,8 ± 0,9) %	188,9 ± 6,3 (91,9 ± 3,0) %

Материалы и методы

Использованы белые нелинейные крысы-самцы массой 250—350 г, однотипные по тесту в приподнятом крестообразном лабиринте. Животные содержались в стандартных условиях и получали стандартную диету. Крыс наркотизировали нембуталом (25 мг/кг массы, внутривенно), катетеризировали хвостовую артерию и через нее за 15 мин до кровопотери вводили гепарин (500 МЕ/кг). В эксперименте животные были разделены на 4-е группы: контрольная (наркотизированные ложнопериоперированные); с кровопотерей; с кровопотерей и реинфузией крови; с кровопотерей, введением мексидола и реинфузией.

Острую массивную кровопотерю создавали путем забора крови через катетер в хвостовой артерии крысы и доводили давление крови до уровня АД=40 мм рт. ст. Объем кровопотери составлял в среднем 2,75 мл/100 г массы тела. Гипотензию поддерживали в течение 1 часа. Реинфузию осуществляли путем введения собственной крови. Мексидол вводился в хвостовую артерию в дозе 50 мг/кг непосредственно перед реинфузией крови.

Костный мозг на наличие микроядер в полихроматофильных эритроцитах исследовали в интервале 20—30 часов и 7 сут после кровопотери и в том же интервале после реанимации. Мазки костного мозга для подсчета микроядер готовились по [24, 25] в нашей модификации, по 3 мазка от каждой крысы. Для каждого из вариантов эксперимента на каждую временную точку использовалось по 6—9 крыс, анализировали по 4000—6000 ПХЭ от каждой крысы.

Параллельно на тех же животных была проведена оценка интенсивности свободнорадикальных процессов в плазме крови на 24-часовом сроке после реанимации методом хемилюминесценции (ХЛ) (на люминометре 1420 02). Об интенсивности процессов ПОЛ судили по максимальной светосумме (сумме импульсов), которая при индуцированной Fe^{2+} ХЛ достигалась через 5 мин. Антиоксидантную активность (АОА) оценивали по светосумме ХЛ, индуцированной H_2O_2 через 2 мин [23, 24].

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде средней арифметической ± стандартной ошибки средней [25].

Результаты и обсуждение

Для повышения точности регистрации эффектов по МЯ-тесту необходимо определение оптимального времени максимального выхода ПХЭ с микроядрами [17, 21, 22]. По данным разных авторов, ПХЭ созревают в течение 10—33 ч. Рефрактерный интервал, т. е. время между каким-либо воздействием на организм и первым наблюдаемым ростом частоты ПХЭ с микроядрами в костном мозге лежит в пределах от 8 до 12 часов. Ис-

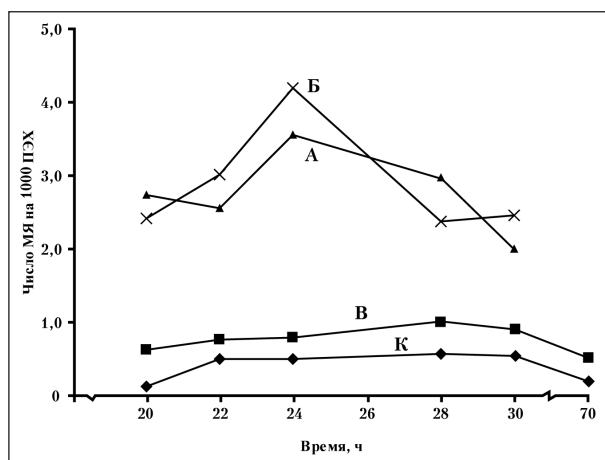


Рис. 1. Зависимости выхода ПХЭ с МЯ от времени тестирования МЯ в костном мозге крыс в разных вариантах опытов. А — кровопотеря; Б — кровопотеря с реинфузией; В — введение мексидола перед реинфузией; К — контроль.

следуемые факторы могут по-разному влиять на длительность созревания ПХЭ. В связи с этим нами были выбраны сроки исследования 20, 22, 24, 28, 30 ч и 7 сут для всех вариантов опытов. Полученные данные приведены в табл. 1 (А—Е). Для удобства сравнения разных вариантов опытов на рисунке представлены зависимости выхода ПХЭ с микроядрами на 1000 просчитанных клеток ПХЭ в костном мозге от времени после окончания гипотензии (кривая А) или реанимации без мексидола (кривая Б) и с введением мексидола (кривая В). Как видно, уровень естественного фона микроядер у контрольных (К) наркотизированных и ложнопериоперированных крыс практически не отличается от исходного и составляет величину ~ 0,5 МЯ на 1000 клеток. Максимальный выход микроядер при кровопотере и реанимации наблюдается на 24-часовом сроке исследования и составляет величину, превышающую уровень контроля в ~ 7 раз. При проведении мероприятий по реанимации выход МЯ еще больше возрастает — на 20% по сравнению со значением для кровопотери и в 8,4 раза — по сравнению с контролем. Постепенное снижение выхода МЯ на больших сроках исследования может иметь разные объяснения и требует специального исследования [13]. Следует отметить, что факторы, замедляющие митоз, увеличивают время максимального выхода МЯ: до 28—30 ч при действии γ -излучения и до 36 ч и более — при действии различных мутагенов.

Введение мексидола непосредственно перед процедурой реанимации приводит к резкому снижению выхода МЯ почти до уровня МЯ в контроле (кривая В на рисунке). Обращает внимание тенденция к более позднему наступлению оптимума выхода МЯ в опытах с мексидолом, что указывает на нормализующее действие этого антиоксиданта на кинетику созревания эритроцитов, нарушенную при кровопотере.

Параллельное исследование уровня антиоксидантного статуса организма показывает (табл. 2), что у животных, перенесших 1-часовую гипотензию и реанимацию, через 24 ч происходит увеличение продукции ПОЛ на 38% ($p < 0,01$) и снижение общей антиоксидантной активности (АОА) на ~14% ($p < 0,1$) относительно соответствующих показателей в контроле. Применение мексидола непосредственно перед реинфузией обеспечивает на том же сроке более низкий уровень ПОЛ — 118% ($p < 0,02$) от интактного контроля и более высокий уровень АОА — 90,3% по сравнению с реанимацией без применения мексидола. Наблюдающиеся эффекты статистически достоверны.

Таким образом, применение мексидола на раннем этапе реанимации приближает показатели антиоксидантного статуса организма (ПОЛ и об-

щей АОА) к уровню у контрольных животных, одновременно уменьшая выход ПХЭ с МЯ.

Выводы

1. Применение микроядерного тестирования позволяет выявить на цитогенетическом уровне дестабилизацию клеточного генома в костном мозге при острой массивной кровопотере и дальнейшее усиление эффекта при реинфузии крови.

2. Внутриаертиальное введение мексидола непосредственно перед реинфузией крови оказывает выраженный цитопротекторный эффект на полихроматофильные эритроциты костного мозга, снижая количество клеток с микроядрами в первые сутки после острой массивной кровопотери, практически, до уровня у контрольных животных. Наблюдающиеся эффекты по цитогенетическому показателю — МЯ-тесту в целом соответствуют изменениям в показателях ПОЛ и АОА.

3. Полученные результаты дают обоснования для выбора оптимальной стратегии биомедицинской технологии восстановления жизненных функций организма при острой массивной кровопотере, обеспечивающей безопасность отдаленных последствий мероприятий по выводу организма из критического состояния.

Литература

1. Брюсов П. Г. Острая кровопотеря: классификация, определение величины и тяжести. Воен.-мед. журн. 1997; 1: 46–52.
2. Неговский В. А., Гурвич А. М. Постреанимационная болезнь — новая нозологическая единица. В кн.: Реальность и значение. Экспериментальные, клинические и организационные проблемы общей реаниматологии: Сб. тр., посвящ. 60-летию ин-та. М.; 1996. 3–10.
3. Неговский В. А., Мороз В. В. Актуальные вопросы реаниматологии. Анестезиология и реаниматология 1999; 1: 6–9.
4. Кожура В. Л. Актуальные проблемы нейробиологии массивной кровопотери. Вестн. РАМН 1997; 10: 10–13.
5. Ланкин В. З., Тихазе А. К., Кухарчук В. В., Беленков Ю. Н. Биоантиоксиданты — универсальные лекарства? В кн.: Антиоксиданты в профилактике и комплексной терапии свободнорадикальных патологий: Сб. тр. науч. симпози. 9 Рос. нац. конгр. Человек и лекарство. М.: РКНПК МЗ РФ; 2002. 3–18.
6. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. В. Окислительный стресс. Биохимические аспекты. М.; 2002.
7. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука; 1972.
8. Vladimirov Yu. A. Free Radicals, aging and degenerative diseases. N-Y; L.: Alan R. Liss. Inc; 1986: 141–145.
9. Кожура В. Л., Носова Н. В. Влияние длительной массивной кровопотери на изменение генома клеток коры головного мозга и гипоталамуса. В кн.: Экспериментальные, клинические и организационные проблемы общей реаниматологии: Сб. тр., посвящ. 60-летию ин-та. М.; 1996. 23–32.
10. Чертков И. Л., Гурвич О. А. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. М.: Медицина; 1984.
11. Шмаров Д. А., Митерев Г. Ю., Кучма Ю. М. и др. Параметры клеточного цикла клеток костного мозга как показатель физиологического состояния кроветворения. В кн.: Тез. докл. I Рос. конгр. по патофизиологии. М.; 1996.
12. Бурлакова Е. Б., Михайлов В. Ф., Мазурик В. К. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцируемой нестабильности генома. Радиационная биология. Радиоэкология. 2001; 4 (5): 489–499.
13. Ильинских Н. Н., Новоцкий В. В., Ванчугова Н. Н., Ильинских И. Н. Микроядерный тест и цитогенетическая нестабильность. Томск: Томский мед. институт; 1992.
14. Ганасси Е. Э., Заичкина С. И., Розанова О. М. и др. Проблемы хромосомного мутагенеза и цитогенетического мониторинга. Радиобиология 1991; 31 (6): 882–889.
15. Заичкина С. И., Ганасси Е. Э. Микроядерный тест как количественный показатель структурных нарушений хромосом, индуцированных различными воздействиями. Studia Biophysica 1984; 99: 203–210.
16. Заичкина С. И., Кондакова Н. В., Розанова О. М. и др. Тестирование противолучевого действия биологически активных веществ в диапазоне средних и малых доз облучения с использованием цитогенетического показателя — микроядерного теста. Хим. фарм. журн. 2004; 38 (8): 3–8.
17. Salamon M. F., Heddle J. A. The bone marrow micronucleus assay rationale for a revised protocol. In: Chemical mutagens. Principles and detection / F. J. De Serres (ed.) N. Y., L.: Plenum Press; 1983. V. 8. (Ch.4): 111–149.
18. Кожура В. Л. Пластический обмен мозга при смертельной гиповолемической гипотензии и в постреанимационном периоде: дис. ... д-ра. мед. наук. М.; 1981.
19. Кожура В. Л., Тлатова Т. А., Кондакова Н. В. и др. Роль мексидола в коррекции цитогенетических повреждений при кровопотере. Анестезиология и реаниматология 2003; 6: 21–23.
20. Воронина Т. А., Смирнов Л. Д., Дюмаев К. М. Механизм действия и особенности клинического применения мексидола в психиатрии и неврологии. В кн.: Антиоксиданты в профилактике и комплексной терапии свободнорадикальных патологий: Сб. материалов науч. симпози. 9 Рос. нац. конгр. Человек и лекарство. М.: РКНПК МЗ РФ; 2002. 19–27.
21. Schmid W. The micronucleus test. Mutat. Res. 1975; 31: 9–16.
22. Albanese R., Middleton B. J. The assessment of micronucleated polychromatic erythrocytes in rat bone marrow. Technical and statistical consideration. Mutat. Res. 1987; 182 (6): 323–332.
23. Бабенко Г. А., Гонский Я. И., Антоник И. М. и др. О роли металлов в процессах свободнорадикального окисления в тканях организма по данным спонтанной и индуцированной хемилюминесценции. В кн.: Биохемилюминесценция. М.: Наука; 1983: 164–179.
24. Владимиров Ю. А., Шерстнев М. П. Хемилюминесценция клеток животных. В кн.: Итоги науки и техники. Биофизика. М.: ВИНТИ; 1989.
25. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Наука; 1980.

Поступила 01.03.05