

ВЛИЯНИЕ ЭМУЛЬСИИ ПЕРФТОРУГЛЕРОДОВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ IN VITRO

Волкова С.Д., Кузнецова И.Н., Бессмельцев С.С.

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии

ФМБА России», г. Санкт-Петербург

ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России», СПб, 2-я Советская ул., д. 16

тел. (812) 717-13-07; email. RNIINT@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Исследовано влияние стабильных эмульсий на основе перфторуглеродов (ПФУ), полученных методом гомогенизации с использованием фосфолипидов сои в качестве эмульгатора, на морфофункциональные параметры клеток донорской крови – эритроцитов и лейкоцитов (нейтрофилов). В серии экспериментов с различным соотношением компонентов в смеси кровь/эмульсия в условиях инкубации при 37°C в течение 60 мин установлено дозозависимое влияние эмульсии ПФУ на морфологию эритроцитов и функциональное состояние нейтрофилов. Показано, что при соотношении кровь/эмульсия 100:1 ч 10:1 сохраняется дискоидная форма эритроцитов, активируется кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов, остается неизменной их бактерицидная и фагоцитарная активность. При этом соотношении также остается стабильной ультраструктура, как наружных мембран исследуемых клеток, так и организация мембранных органелл и митохондрий.

С увеличением содержания эмульсии в крови (соотношение кровь/эмульсия 10:2 ч 10:5) наблюдается постепенное увеличение числа эхиноцитов, снижение величины НСТ-теста и способности нейтрофилов к завершённому фагоцитозу.

Ключевые слова: эмульсии, перфторуглероды, эритроциты, эхиноциты, нейтрофилы.

INFLUENCE OF PERFLUOROCARBON EMULSION ON MORPHOFUNCTION PARAMETERS OF ERITROCYTES AND LEUKOCYTES IN VITRO

Volkova S.D., Kuznetsova I.N., Bessmeltsev S.S.

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg

The influence of perfluorocarbon (PFC) emulsion on morpho-function parameters of

erythrocytes and leukocytes (neutrophils) has been studied. PFC emulsions was prepared by high pressure homogenisator using, natural phospholipids as surfactants. The mixtures of blood/emulsion with different relations of components was incubated at +37°C during 60 min. The erythrocyte morphology, function of neutrophils was depended on emulsion dose in blood. It was shown that with relations of blood/emulsion = 100/1 и 10/1 discoid form of erythrocytes, bactericide and phagocyte function of neutrophils was not changed. But metabolic activity of neutrophils (according NBT-test) was increased. With the Increasing of emulsion content in blood (relations of blood/emulsion 10 : 2 и 10 : 5) gradual increasing of echinocyte number, NBT - test decreasing and non - completion phagocytosis were received.

Key words: emulsions, perfluorocarbon, erythrocytes, echinocytes, neutrophils.

Разработка инфузионных сред, способных транспортировать кислород тканям и, тем самым, снижать потребность в переливании эритроцитсодержащих гемокомпонентов является одной из основных задач современной трансфузиологии. Создание кровезамещающих растворов такого типа на основе перфторуглеродов (ПФУ) было обусловлено уникальными свойствами этих соединений: их химической инертностью и способностью растворять большие объемы газов.

В ходе становления и развития этой проблемы были решены многие вопросы: от выбора компонентов, необходимой степени их очистки, технологии получения эмульсионных форм для биологического изучения, - до создания препаратов и апробации их в клинике. Составы практически всех препаратов ПФУ, прошедших разные стадии доклинического и клинического изучения, приведены в обзорах литературы [1-3].

В последние годы американскими фирмами были разработаны ПФУ препараты с использованием фосфолипидов (ФЛ) в качестве эмульгатора, что позволяет хранить их при положительных температурах (+4°C). К числу таких препаратов относятся: Oxygent; Oxyfluor; Oхусуte. Клинические испытания, доказывающие их эффективность в соответствии с международными требованиями GMP, выявили побочные эффекты этих сред. Причины этих реакций до конца не выяснены и до настоящего времени названные препараты на рынок лекарственных средств не вышли [4-6].

С 1996 г. разрешен к клиническому применению отечественный перфторуглеродный препарат Перфторан, в состав которого в качестве диспергирующего агента входит водорастворимый эмульгатор проксанол 268. В силу этого обстоятельства препарат не стабилен и должен храниться в замороженном состоянии [7].

Многими исследователями в условиях эксперимента было изучено влияние эмульсии ПФУ на параметры кислородного обмена в эритроцитах донорской крови [8], состояние мембраны эритроцитов [9], функциональную активность нейтрофилов [10, 11] и ферментные системы, ответственные за генерацию активных форм кислорода [12]. В более ранней работе [13] было выявлено стимулирующее влияние эмульсии ПФУ в малых дозах (≤ 1 г/кг) на печеночные макрофаги. Недостатком указанных работ является отсутствие комплексного подхода в выборе лабораторных методов, что не дает полного представления о действии эмульсий ПФУ на клетки крови.

В то же время заслуживает внимания одна из последних крупных отечественных работ Н.Н. Пшенкиной [14], в которой Перфторан, зарегистрированный в России в качестве трансфузионного средства с газотранспортными свойствами, идентифицируется в качестве наносистемы по размерам частиц, а именно - сфер диаметром 50 - 70 нм, что соответствует критериям, предъявляемым к наночастицам (< 100 нм). Автору удалось разработать систему прогнозирования изменений фармакокинетики лекарственных веществ под влиянием наноземульсии Перфторан и сформулировать предложения по предупреждению негативных проявлений при совместном назначении лечебных фармакологических препаратов и эмульсии Перфторан.

Результаты клинического применения отечественного препарата Перфторан достаточно широко освещены в литературе. Наибольший интерес представляет опыт его использования при постишемических нарушениях мозгового кровообращения [15]; при остром инфаркте миокарда [16]; ишемии тонкой кишки [17] и нижних конечностей [18]; флегмонах лица и шеи [19]; тяжелом сепсисе [20]; при лечении травматической болезни [21]; острого респираторного дистресс-синдрома [9] и тяжелого гепатита [4, 22]. Перфторан хорошо зарекомендовал себя при интенсивной терапии кровопотери, что позволило (в дозах от 5% ОЦК до 7% ОЦК) снизить летальность больных с 20% до 0% [23]. Отмечается успешное применение перфторана в стоматологии [19, 24], отоларингологии [25] и офтальмологии [7].

Механизм клинического эффекта Перфторана обусловлен целым комплексом факторов. Препарат представляет собой 10% субмикроскопическую эмульсию на основе эмульгированных перфторуглеродов (ПФУ), обладающих газотранспортной функцией. Стабилизатор эмульсии (Проксанол-268) в свою очередь улучшает реологию и микроциркуляцию, препятствует агрегации клеток, ингибирует действие вазоактивных веществ. По результатам клинических исследований препарата Перфторан определены три основных направления клинического его применения: в интенсивной терапии

критических состояний, в противоишемической защите донорских органов при операциях на сердце и в лечении воспалительных заболеваний [23].

В настоящее время в Российском НИИ гематологии и трансфузиологии на основе ПФУ и фосфолипидов (ФЛ) разработана эмульсия, которая соответствует международным требованиям, предъявляемым к препаратам для внутривенного введения. Эмульсия не токсична. Конечная лекарственная форма эмульсии (завальцованный флакон) выдерживает тепловую стерилизацию и сохраняет размер (~ 100 нм) частиц в течение не менее 1 года хранения в регламентных условиях при $+4^{\circ}\text{C}$. Наночастицы ПФУ в указанный период наблюдений сохраняют свою структуру, поскольку их поверхностные свойства не меняются в процессе хранения. По другим физико-химическим параметрам (кислотность, вязкость, осмолярность) эмульсия соответствует требованиям, предъявляемым к эмульсионным ПФУ препаратам медико-биологического назначения [26].

В основу создания стабильной эмульсии ПФУ/ФЛ была положена методология, разработанная И.Н. Кузнецовой, по основным положениям не совпадающая с подходами, которые использовали американские разработчики указанных препаратов [27]. Проверка и проведение технологического процесса были осуществлены на новом современном оборудовании, на базе лабораторного участка Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН г. Пущино [28, 29]. Разработанная эмульсия может рассматриваться как макетный образец препарата (условное название «эмульсия АТ»).

Целью настоящей работы явилось изучение влияния эмульсии ПФУ/ФЛ на морфофункциональные характеристики и ультраструктуру эритроцитов и нейтрофилов *in vitro* в выбранном нами ранее диапазоне соотношений крови/эмульсия 10/0,1 ч 10/2 после инкубации смеси при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 30 и 60 минут.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследуемые эмульсии ПФУ впервые были получены И.Н.Кузнецовой в 1995 году [29] методом гомогенизации при высоком давлении с использованием фосфолипидов сои S-100 в качестве эмульгатора. Основную часть фторуглеродной фазы составлял перфтордекалин. Средний диаметр частиц составлял $0,12 - 0,15$ мкм, pH находился в пределах $7,1 - 7,4$, а относительная вязкость (относительно воды) находилась в интервале $1,24 - 1,60$ и не превышала вязкости плазмы ($1,57 - 1,75$). Эмульсии были практически монодисперсны. Индекс взаимодействия эмульсии ПФУ с сывороткой крови от серии к серии варьировал в узких пределах $1,5 - 3,0$ (усл.ед.), что свидетельствовало об однородности их поверхностных свойств. Осмолярность равнялась $\sim 230 - 250$ Мосм.

Содержание фторуглеродной фазы составляло ~5 об % или ~10 вес %. Названные физико-химические параметры в пределах погрешности их определения не менялись в течение 12 месяцев хранения эмульсий при +4°C. Таким образом, эмульсии ПФУ, применяемые в настоящем эксперименте, по стабильности и физико-химическим свойствам соответствовали требованиям, установленным для эмульсий ПФУ медико-биологического назначения. Их можно рассматривать как модель нового стабильного препарата [26].

Материалы. Всего в работе было использовано 211 образцов донорской крови, заготовленной на стандартных гемоконсервантах – СРДА или «Глюгидир».

Для оценки влияния эмульсии ПФУ на морфофункциональное состояние эритроцитов и лейкоцитов были исследованы различные соотношения кровь/эмульсия: 100/1; 10/1; 10/2; 10/3; 10/5 при инкубации смесей в течение 1 часа при +37°C. В опыты брали свежезаготовленную донорскую кровь.

Методы. Оценка влияния эмульсии на состояние мембраны эритроцитов осуществлялась по методике Л.В.Филёва с соавторами - путем подсчета эхиноцитов в мазке крови (в %), содержащихся на определенное число (1000) эритроцитов: в норме 0 – 3% [30].

Учитывая сравнительно низкую осмолярность исследуемых эмульсий ПФУ, в отдельных опытах было изучено влияние этих сред на гемолиз эритроцитов. При этом соотношение кровь/эмульсия в этих опытах варьировали в достаточно широких пределах от 10/1 до 1/1 и 1/2. Гемолиз эритроцитов после инкубации крови с эмульсией оценивали в соответствии с инструкцией, принятой в Службе крови РФ. В норме свободный гемоглобин составляет не более 0,1 г/л [31].

Жизнеспособность лейкоцитов оценивали по количеству резистентных к красителю эозину (эозиновая проба в норме > 90%).

Метаболическая активность нейтрофильных гранулоцитов при контакте с эмульсией определялась по их способности восстанавливать бесцветный краситель нитросиний тетразолий в диформазан, окрашенный в синий цвет (НСТ-тест). Определялся процент из 100 клеток (в мазке) нейтрофильных гранулоцитов, содержащих гранулы восстановленного красителя (НСТ – позитивные клетки), в норме 5-15% [32, 33].

Бактерицидную функцию нейтрофильных гранулоцитов оценивали по внутриклеточному содержанию катионных белков путем подсчета среднего цитохимического коэффициента (СЦК) в лизосомально-катионном тесте (ЛК-тест) – норма $1,56 \pm 0,02$ усл.ед. [34, 35].

Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов определялась по методике

А.П. Егоровой и В.А. Лебединского [36] с микробной культурой золотистого стафилоккока (*S.aur.* штамм 209). При этом оценивалась общая фагоцитарная активность (ФА-индекс Гамбургера) из 100 подсчитанных в мазке нейтрофильных гранулоцитов; фагоцитарное число Райта (ФЧ) и коэффициент завершенности фагоцитоза (КЗФ) по методу З.И. Савченко с соавторами [37].

МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Была отработана оптимальная модификация методики получения для электронной микроскопии форменных элементов из периферической крови после её инкубации с эмульсией ПФУ/ФЛ и без неё (контроль). Осаждение форменных элементов крови осуществляли центрифугированием в 3 этапа. Первоначально при 1000 об/мин в течение 10 мин выделяли надосадочную жидкость, богатую тромбоцитами и лейкоцитами (включена лейкоцитарная пленка) и содержащую небольшое количество эритроцитов. На втором этапе для лучшей фиксации в отобранную жидкость добавляли глутаровый альдегид (2,5% раствор глутаральдегида на какодилатном буфере в пропорции 1:1), и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость (плазма крови и фиксатор) удаляли. На третьем этапе – полученную взвесь эритроцитов отмывали повторно в 1М какодилатном буфере в течение 10 мин и приводили дофиксацию исследуемого материала в 1% растворе четырёхокси осмия на том же буфере с последующим отмыванием в 1М какодилатном буфере еще в течение 10 мин.

Далее по общепринятой методике обработки электронно-микроскопических объектов осуществляли обезвоживание подготовленных клеток в батарее спиртов восходящей концентрации и заключение их в эпоновые смолы. Серийные срезы для электронной микроскопии изготавливали на ультрамикротоме LKB-5, окрашивали их уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-7A при ускоряющем напряжении 80 кВ.

При статистической обработке результатов исследований использован метод Стьюдента-Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. ВЛИЯНИЕ ПФУ-ЭМУЛЬСИИ НА МОРФОЛОГИЮ ЭРИТРОЦИТОВ

Морфология эритроцитов исследована в условиях *in vitro* при соотношениях кровь/эмульсия в диапазоне 100:1 ч10:2 после 30 минутной инкубации в термостате при 37°C (табл.1).

Таблица 1

Влияние ПФУ-эмульсии АТ на морфологию эритроцитов
и гемолиз в зависимости от концентрации

Исследуемая среда	Содержание эхиноцитов (норма от 0% до 3% из 1000 клеток)	Видимый гемолиз (в норме отсутствует)
1	2	3
Исходная кровь (контроль)	$1,12 \pm 0,20$ (n=30)	нет
Кровь/эмульсия АТ (100:1)	$0,60 \pm 0,08$ (n=30)	нет
Кровь/эмульсия АТ (10:1)	$5,90 \pm 1,60^*$ (n=12)	нет
Кровь/эмульсия АТ (10:2)	$18,3 \pm 6,1^{**}$ (n=12)	нет
* - $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ в сравнении с контролем		

Хорошая сохранность дискоидной формы эритроцитов наблюдалась при соотношении кровь/эмульсия 100:1 (содержание эхиноцитов составляет $0,60 \pm 0,08\%$) при норме от 0 до 3% и удовлетворительная морфологическая сохранность – при соотношении кровь/эмульсия 10:1 (содержание эхиноцитов – $5,9 \pm 1,6\%$). Дальнейшее увеличение концентрации эмульсии приводило к нарастанию количества эхиноцитов.

Отсутствие видимого гемолиза эритроцитов после 30 минут инкубации смеси кровь/эмульсия АТ при соотношениях 100:1; 10:1; 10:2 свидетельствовало о целостности клеточных мембран. Содержание свободного гемоглобина не превышало предельно допустимых величин (не более 0,1 г/л). Изучено влияние продолжительности времени инкубации (30 мин и 60 мин) на состояние мембраны эритроцитов (табл.2).

Таблица 2.

Количество эхиноцитов в эритроцитсодержащих средах
в зависимости от времени инкубации

Исследуемые среды	Время инкубации	% эхиноцитов
Донорская кровь (контроль)	-	$0,42 \pm 0,34$ (n = 30)
Донорская кровь + эмульсия (100:1)	30 мин	$1,5 \pm 0,34$ (n = 15)
Донорская кровь + эмульсия (100:1)	60 мин	$0,76 \pm 0,17$ (n = 15)

Согласно полученным данным, во всех трех группах содержание эхиноцитов соответствовало норме (0% - 3%) и, следовательно, эмульсия АТ в избранной концентрации не оказывает отрицательного влияния на мембрану эритроцитов, как при 30 минутной, так и при 60 минутной инкубации.

2. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПФУ-ЭМУЛЬСИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ

Жизнеспособность лейкоцитов в исследуемых средах (цитратная донорская кровь, смесь крови и эмульсии в соотношении 100: 1), в условиях 30 минутной ($n = 15$) и 60 минутной ($n = 15$) инкубации при $t + 37^{\circ}\text{C}$ изучена с помощью эозиновой пробы (ЭП), позволяющей определить резистентность лейкоцитов к суправитальной окраске 1% водным раствором эозина. В норме процент жизнеспособных клеток во взвеси лейкоцитов составляет от 100% до 70%, в зависимости от сроков хранения (не более 48 часов от момента заготовки крови). В наших исследованиях использовалась донорская кровь со сроком хранения от 20 до 24 часов. Результаты постановки эозиновой пробы приведены в таблице 3

Таблица 3

Изучение жизнеспособности лейкоцитов в эозиновой пробе

Исследуемые среды	% эозин-резистентных (жизнеспособных) лейкоцитов
Кровь донорская цитратная (суточная)	$96,4 \pm 1,0$ ($n = 10$)
Кровь/эмульсия АТ (100:1) – инкубация 30'	$92,8 \pm 0,11$ ($n = 15$)
Кровь/эмульсия АТ (100:1) – инкубация 60'	$90,8 \pm 1,0$ ($n = 15$)

Из данных таблицы 3 видно отсутствие повреждающего действия эмульсии в избранной концентрации на лейкоциты донорской крови, вне зависимости от времени инкубации. Содержание жизнеспособных клеток во всех группах превышало 90%.

Функциональная активность нейтрофилов после 30 минут инкубации смеси кровь/эмульсия в различных соотношениях оценивалась с использованием НСТ-теста ($n = 68$) и ЛК-теста ($n = 55$) (табл. 4).

Таблица 4

Влияние ПФУ-эмульсии на функциональную активность нейтрофилов in vitro

Исследуемая среда	НСТ-тест (норма 5-15%)	ЛК-тест (норма СЦК $1,56 \pm 0,02$ усл.ед.)
-------------------	------------------------	---

Исходная кровь (контроль)	13,9 ± 2,1 (n = 27)	1,55 ± 0,04 (n = 13)
Кровь/эмульсия АТ (100:1)	46,7 ± 6,9** (n = 17)	1,53 ± 0,02 (n = 10)
Кровь/эмульсия АТ (10:1)	29,9 ± 4,8* (n = 12)	1,54 ± 0,01 (n = 10)
Кровь/эмульсия АТ (10:2)	31,3 ± 6,4* (n = 12)	1,52 ± 0,02 (n = 6)
* p < 0,05; ** p < 0,01 в сравнении с контролем		

Полученные результаты свидетельствуют о выраженном стимулирующем воздействии изучаемого препарата на процессы кислород-зависимого метаболизма в нейтрофильных гранулоцитах. При соотношении кровь/эмульсия 100:1 показатель НСТ-теста возрастал в 3 раза (46,7% в сравнении с 13,9% в исходной крови). При этом по результатам ЛК-теста (табл. 4), дегрануляция клеток не наблюдается, и по содержанию внутриклеточных катионных белков нейтрофилы в полной мере сохраняли бактерицидную функцию (СЦК соответствует норме $1,56 \pm 0,02$ усл.ед.).

Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) оценивалась по трем основным показателям: общая фагоцитарная активность (ФА), фагоцитарное число (ФЧ) и коэффициент завершенности фагоцитоза (КЗФ) после инкубации смеси кровь/эмульсия при 37°C в течение 30 и 60 минут. В качестве контроля исследованы образцы донорской крови. Выполнено 3 серии опытов с эмульсией ПФУ в избранном ранее оптимальном диапазоне соотношения кровь/эмульсия ПФУ (100:1 ч 10:1). Полученные результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5

Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов
при контакте с эмульсией ПФУ in vitro

Соотношение кровь/эмульсия	Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов		
	Время инкубации смеси 30 мин		Время инкубации смеси 60 мин
	ФА, %	ФЧ, усл.ед.	КЗФ, усл.ед.
100:1	66,6 ± 2,8 (n=12)	7,2 ± 0,4 (n=12)	0,9 ± 0,07 (n=12)
10:1	60,7 ± 3,1 (n=12)	6,8 ± 0,6 (n=12)	0,8 ± 0,05 (n=12)
Контроль (исходная кровь)	71,7 ± 3,9 (n=8)	8,5 ± 0,5 (n=8)	1,10 ± 0,06 (n=8)

По основным показателям фагоцитарной активности НГ (ФА, ФЧ, КЗФ) эмульсия

ПФУ в избранном диапазоне концентрации (100:1 ч 10:1) не оказывал отрицательного воздействия на ход реакции фагоцитоза микробной культуры золотистого стафилококка (штамм 209).

3. УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК КРОВИ В НОРМЕ И ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭМУЛЬСИИ ПФУ

Морфологическую сохранность форменных элементов крови после инкубации смеси кровь/эмульсия ПФУ в соотношении 10:1 в течение 1 часа при $t +37^{\circ}\text{C}$ оценивали с помощью электронного микроскопа. Технология обработки оптимальной модифицированной методики получения форменных элементов крови и подготовки их в качестве объекта для электронной микроскопии детально изложена в разделе «Методы исследования». Серийные срезы изготавливались на ультрамикротоме LKB-5, окрашивались уранилацетатом и цитратом свинца с последующей микроскопией в электронном микроскопе JEM-7A при ускоряющем напряжении 80 кВ. В качестве контроля были использованы клетки донорской крови до её соединения с ПФУ-эмульсией.

На рисунке 1 показан фрагмент эритроцита с равномерной структурой цитоплазмы и чётко выраженной цитоплазматической мембраной (контроль). На рисунке 2 представлен фрагмент эритроцита после воздействия ПФУ эмульсии (опыт), ультраструктура которого не претерпела каких-либо изменений; отчетливо видна неповрежденная клеточная мембрана.

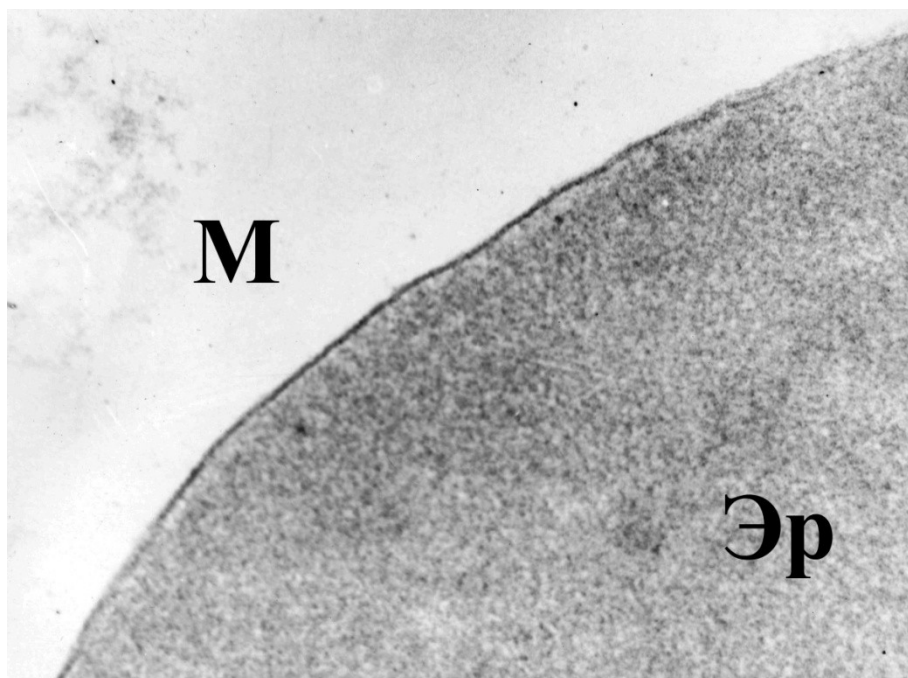


Рис. 1. Фрагмент эритроцита (контроль).

Эр – эритроцит, М – цитоплазматическая мембрана. Увеличение $\times 90000$.

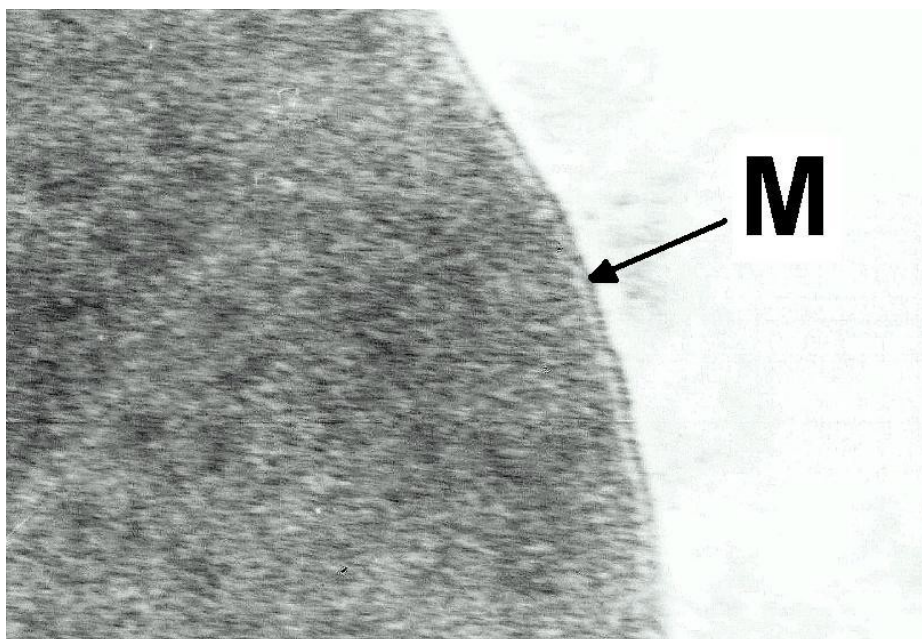


Рис. 2. Фрагмент эритроцита после воздействия эмульсии перфторуглерода (опыт).
М – цитоплазматическая мембрана. Увел.х 90000.

Известно, что лейкоциты как ядросодержащие клетки крови с более сложной структурой наиболее подвержены морфологическим и функциональным повреждениям в агрессивной среде. Тем не менее и эти клетки не испытывали отрицательного влияния ПФУ эмульсии при избранном соотношении кровь/эмульсия (10:1).

На рисунке 3 (контроль) представлен лейкоцит, ядро которого содержит характерный гетерохроматин, а в цитоплазме присутствуют все жизненно необходимые органеллы.

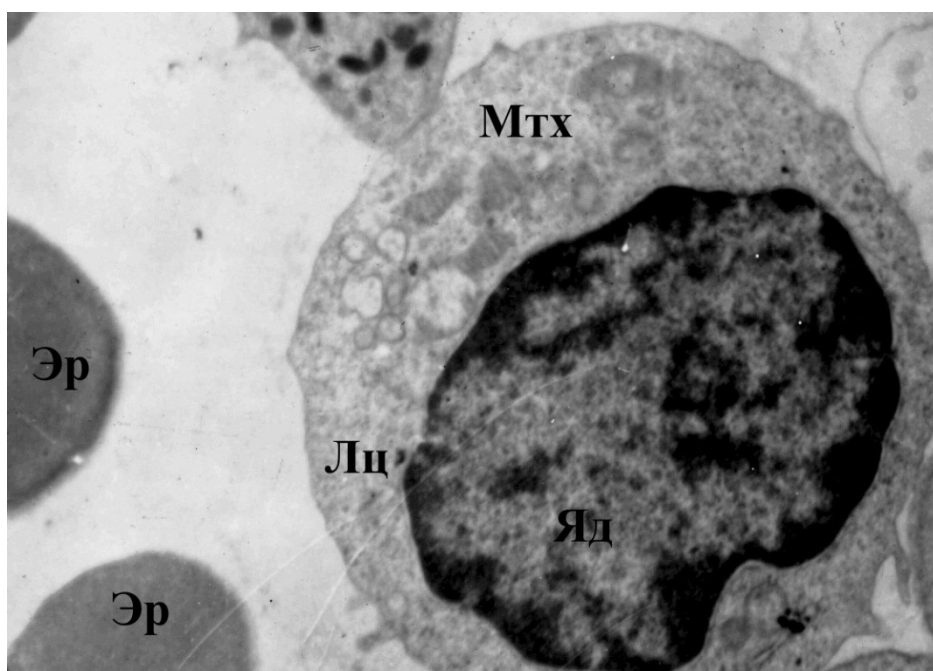


Рис. 3. Лейкоцит (контроль).

Лц – лейкоцит, Эр – эритроцит, Яд – ядро, Мтх– митохондрии. Увел.х 50000.

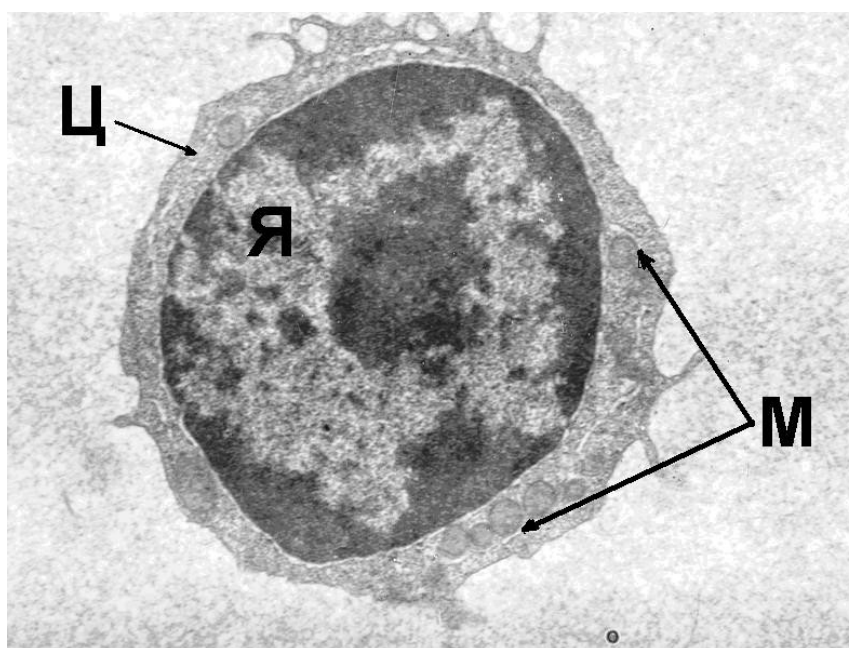


Рис. 4. Лейкоцит после воздействия эмульсии перфторуглерода (опыт).

Я – ядро, Ц – цитоплазма, М – митохондрии. Увел.х 50000.

Рисунок 4 (опыт) подтверждает отсутствие повреждений клетки под воздействием ПФУ эмульсии (сохранены все органеллы), в том числе повреждения отсутствуют и на уровне митохондрий (рис.5), где видна чётко очерченная мембрана и сохранены кристы.

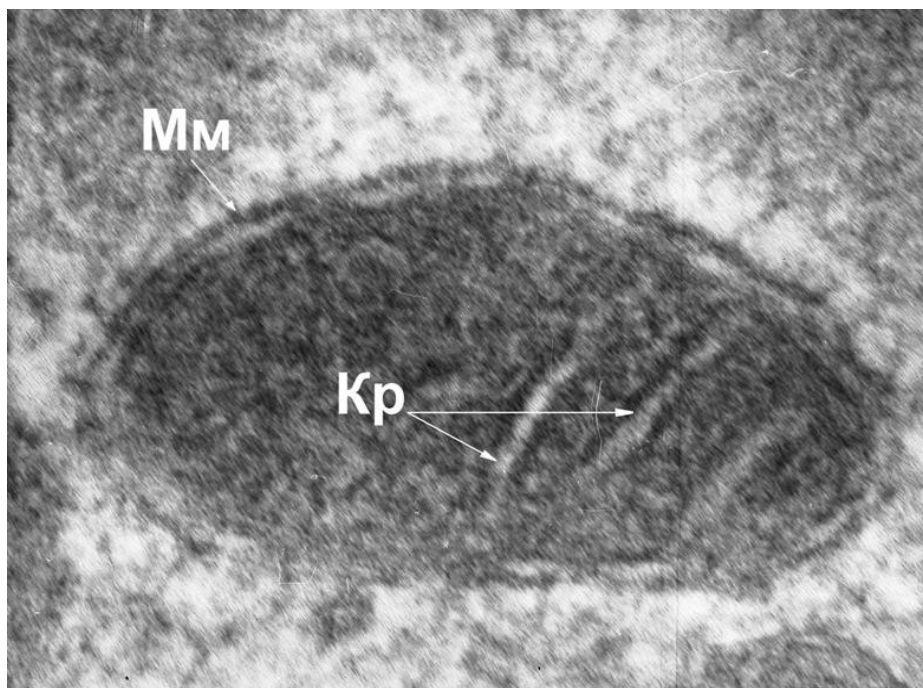


Рис. 5. Митохондрия лейкоцита после воздействия эмульсии перфторуглерода (опыт).

Мм – митохондриальная мембрана, Кр - кристы. Увел.х 140000

Результаты изучения форменных элементов периферической крови после их обработки для электронной микроскопии показало хорошую сохранность ультраструктурной организации эритроцитов и лейкоцитов. Это позволяет более полно оценить возможные изменения после воздействия эмульсий перфторуглеродов в различных дозах на мембраны и органеллы клеток периферической крови в условиях *in vitro*.

Таким образом, при изучении дозозависимого влияния эмульсии ПФУ, полученной с использованием природных фосфолипидов, в качестве эмульгатора на клетки донорской крови (эритроциты и лейкоциты) был выбран диапазон соотношения кровь/эмульсия от 100:1 до 10:2 и определена оптимальная концентрация эмульсии ПФУ (100:1 ч 10:1), при которой сохраняется морфологическая структура эритроцитов и лейкоцитов, в том числе и при электронной микроскопии, и отсутствует гемолиз (свободный гемоглобин не более 0,1 г/л). Нейтрофильные гранулоциты, на фоне активации процессов окислительно-восстановительного метаболизма (НСТ-тест 30-47%), сохраняют в полной мере как бактерицидную функцию (ЛК-тест $1,5 \pm 0,01$ усл.ед.), так и способность к фагоцитозу, в том числе завершённому (КЗФ 0,9 – 1,1 усл.ед.).

Установлено, что, эмульсия ПФУ оказывает дозозависимое влияние на морфо-

функциональное состояние эритроцитов и нейтрофильных гранулоцитов. Верхней пороговой величиной является соотношение кровь/эмульсия 10:1. Принимая во внимание полученные ранее данные [26] о стабильности эмульсии при +4°C в течение 12 месяцев, уровню вязкости, кислотности и осмолярности, соответствующим требованиям, предъявляемым к эмульсиям медико-биологического назначения, ПФУ-эмульсия (АТ) может рассматриваться в качестве «макета препарата», относящегося к нанодисперсным системам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lowe K.C. Second-generation perfluorocarbon emulsion blood substitutes // Art.

Cells, Blood Substit., Immobil. Biotech. – 2000. – V. 28. – N 1. – P. 25-28.

2. Кузнецова И.Н. Эмульсии перфторуглеродов. Стабильность *invitro* и *invivo* (обзор) // Хим.-фарм. журн. – 2003. – Т.37.-№ 8. – С.20-25.

3. Воробьев С.И. Перфторуглеродные эмульсии I II поколения // Хим.-фарм. журн. – 2009. – Т.43.-4.-С.30-40.

4. Kovel'nov F.Y., Mikhal'tsov A.N., Malkov F.N. Perftoran as a means modulating the functional activity of liver macrophages // Bull. Exp. Biol. Med. - 2002. – 134(6): P. 551-553.

5. Spahn D.R., van Bremp't R., Theilmeier G. et al. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery // Anesthesiology. - 1999. –91(5). - P. 1195 – 1208.

6. Spahn D.R., Waschke R.F., Standl T. et al. Use of Perflubron Emulsion to Decrease Allogenic Blood Transfusion in High-blood-loss Non-Cardiac Surgery (Result of a European Phase 3 Study) // Anesthesiology. - 2002. – 97(6). - P. 1338– 1349.

7. Моисеенко О.М., Средняков В.А., Воробьев С.И. Технология применения перфторана при лечении офтальмопатологии // Офтальмохирургия.-2007.-№2.-С.46-49.

8. Кузнецова И.Н. Влияние эмульсий фторорганических соединений на параметры кислородного обмена эритроцитов донорской крови *invitro* // Химико-фармацевт. журн. – 1980.-№ 7.-С.9-12.

9. Мороз В.В., Козлова Е.К., Богушевич М.С. и др. Влияние перфторана на модифицированные электрическими импульсами мембраны эритроцитов // Общ.реаниматология.-2005.-№ 1/3 – С.5-10.

10. Дурново Е.А., Беспалова Н.А., Мухина И.В. Влияние подслизистого введения перфторана на активность нейтрофилов периферической крови (экспериментальное исследование) // Общ.реаниматология.- 2007, Т. III.- № 3/1. – С.34-37.

11. Tsong-Long Hwang, Chia-Lang Fang, Saleh A. al-Suwayeh, et al. Activated human neutrophil response to perfluorocarbon nanobubbles: Oxygen-dependent and –independent cytotoxic responses // Toxicology Letters. – 203 (2011). – P. 172 – 180.

12. Шехтман Д.Г., Сафронова В.Г., Габдулхакова А.Г. и др. Влияние эмульсии перфторуглеродов на функционирование ферментных систем, ответственных за генерацию активных форм кислорода в нейтрофилах // Биофизика, - 2003.- Т. 48. – вып.4. – С. 666-672.

13. Вишневецкий Ф.Е., Голубев А.М., Белоярцев Ф.Ф. Состояние системы мононуклеарных фагоцитов в условиях применения эмульсии перфторорганических соединений // Бюлл. эксперим. биол. и медиц. – 1987.- № 103(2).-С.232-236.

14. Пшёнкина Н.Н. Прогнозирование фармакокинетических взаимодействий

лекарственных веществ и наносистемы на основе перфторуглеродных соединений // Автореф. дисс.... д.б.н. – СПб. – 2012. - С. 35.

15. Александрин В.В. Ранние постишемические нарушения мозгового кровотока и их коррекция перфтораном // Общая реаниматология. -2006.-Т.2, № 3. – С.12-17.

16. Алиев О.М. Изменения сердечной гемодинамики и коронарного кровотока при остром инфаркте миокарда под влиянием перфторана // Анестезиология и реаниматология. – 2004.-№ 3.- С.62-63.

17.Бесараб Д.А. Реперфузионные нарушения при критической ишемии тонкой кишки и их коррекция перфтораном // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2005.-№ 3.- С.71-78.

18.Сорока В.В., Нохрин С.П., Андрейчук К.А. и др. Применение перфторана в лечении больных с критической ишемией нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия.- 2006. - Т.12. - № 4.

19.Агапов В.С., Пиминова И.А. Оценка результатов местного применения перфторана в комплексном лечении больных с одонтогенными флегмонами лица и шеи // Стоматология. – 2006.-Т.85, № 5.-С.32-35.

20.Ермоленко С.В., Шаповалова Н.В., Лаврентьев А.А. Опыт использования перфторана при тяжелом сепсисе // Общая реаниматология. – 2007. – Т.3. - № 3/1.- С.67-70.

21.Багненко С.Ф., Лапшин В.Н., Шах Б.Н. и др. Принципы диагностики и коррекции гемодинамики у пострадавших с сочетанной травмой в остром периоде травматической болезни – основа профилактики гипоксических и реперфузионных повреждений // Эфферентная терапия. – 2004.-Т.10, № 3.-С.60-69.

22. Ковеленов А.Ю., Лобзин Ю.В., Плужников Н.Н. и др. Опыт применения перфторуглеродной эмульсии «Перфторан» при лечении больных с тяжелыми формами гепатита В и микстгепатитами // Эпидемиол. и инфекц. болезни.- 2002.-№4.-С.33-37.

23 Методические рекомендации «Перфторан в интенсивной терапии кровопотери // Днепропетровск – 2004.- С. 18.

24. Кислых Ф.И., Комлев В.В., Франк М.М. и др. Обоснование внутритканевого способа введения перфторана при лечении воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области // Общая реаниматология. – 2007.- Т. III.- № 3/1. – С.71-75.

25. Анохина Е.А. Применение префторана в лечении больных с острой формой сенсоневральной тугоухости и изучение его влияния на оксидантную и антиоксидантную системы плазмы крови // Росс.оториноларингология.-2007.-№1.-С.15-20.

26. Кузнецова И.Н., Юрченко В.С., Кочеткова Г.А. Стабильные нанодисперсии на

основе перфторуглеродов и фосфолипидов // Хим.-фарм. журн. – 2012. – Т.46.-№ 2. – С.52-56.

27. Кузнецова И.Н. Функциональная активность и стабильность эмульсий перфторуглеродов // Автореф. дисс.... д.б.н. – СПб. – 1999. - С. 38.

28. Кузнецова И.Н. О воздействии эмульсии перфторуглеродов на организм // Перфторорганические соединения в биологии и медицине. – Пущино. 2001. – С.70-76.

29. Кузнецова И.Н. Методологические особенности изучения стабильности эмульсий перфторуглеродов // Сб. физиологическая активность фторсодержащих соединений (эксперимент и клиника). – ИТЭБ РАН. Пущино. 1995.- С.41-50.

30. Филёв Л.В., Захаров И.И., Селиванова Г.В. и др. Цитоспектрофотометрическое исследование гемоглобина в эритроцитах человека // Цитология. – 1989. – Т.XXXI. - № 3. – С. 336-343.

31. Инструкция по фракционированию консервированной крови на клеточные компоненты и плазму. М., 1989.

32. Нагоев Б.С., Шубич М.Г. Значение теста восстановления нитросинего тетразолия для изучения функциональной активности лейкоцитов // Лаб. дело.-1981.-№4.-С.195-198.

33. Park B.N., Fikrig S.M., Smithwick E.M. Infection and nitrobluetetrazolium reduction by neutrophils: 3 diagnostic act // Lancet.-1968.-V.2.-№ 7567.-P.532-534.

34. Пигаревский В.Е. Лизосомально-катионный тест // Патофизиол. и эксперим. терапия.-1975. -№3.-С.86-88.

35. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства // М.: Медицина.- 1979. – 127 с.

36. Егорова А.П., Лебединский В.А. Значение тромбоцитарной реакции в определении инвазивности гемолитического стрептококка // Микробиол. и эпидемиол. – 1949. - № 5. – С.8 – 9.

37. Савченко З.И., Ерасова В.И. Функциональное состояние нейтрофилов периферической крови у больных бронхиальной астмой // Лаб. дело – 1981. - № 11. – С.661-664.

38. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге // Новосибирск. Сиб. отд-ние.- 1983, С. 256.

39. Волкова С.Д. Информативность НСТ-теста в практике иммунного донорства в диагностике бактериальных и вирусных инфекций и контроле эффективности терапии // Вестн. Службы крови России.- 2008.-№3.-С.10-14.