

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА СИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТА ПРИ
ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ШОКЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Ремизова М.И., Гербут К.А., Гришина Г.В.

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии»

ФМБА России

191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16, 717-74-73, *remizova391@mail.ru*

Резюме. Изучено действие доноров оксида азота – L-аргинина и оксакома на системную гемодинамику, микроциркуляцию и кислотно-основное состояние крови при геморрагическом шоке у крыс. L-аргинин (150 мг/кг) и оксаком (3.2 μ M/кг) применяли как в составе инфузионной среды, так и профилактически до кровопотери с последующей инфузией изотонического раствора натрия хлорида. В первой серии (контроль) после окончания кровопотери вводили 0.9% изотонический раствор NaCl в объеме, превышающем в 2 раза объем эксфузированной крови. Во 2-й – за 20 мин до начала кровопотери вводили оксаком, а по окончании кровопотери – солевой раствор. В 3-й серии оксаком инфузировали в составе изотонического раствора NaCl после окончания кровопотери. В 4-й и 5-й сериях по той же схеме, что и во 2-й и 3-й сериях вводили L-аргинин. Солевой раствор инфузировали в том же объеме, что и в контрольной серии. Оксаком, введенный перед кровопотерей (2-я серия), и L-аргинин в составе солевого раствора (5-я серия) восстанавливали системную гемодинамику и микроциркуляцию наиболее эффективно. Предполагается, что благодаря оксиду азота, вырабатываемому из экзогенного субстрата L-аргинина, поддерживается его базальный уровень, необходимый для сохранения нормальной перфузии органов и тканей. Действие оксакома на гемодинамику в условиях геморрагического шока объясняется его антиоксидантной активностью и способностью индуцировать нитрозилирование белков.

Ключевые слова: геморрагический шок, инфузионная терапия, оксид азота, L-аргинин, динитрозильный комплекс железа с глютатионом (оксаком).

**THE PHARMACOLOGICAL EFFECT ON NITRIC OXIDE SYNTHESIS ON
EXPERIMENTAL HEMORRHAGIC SHOCK**

Remizova M.I., Gerbout K.A., Grishina G.V.

Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology

Abstract. This study investigated the systemic and microvascular hemodynamic, acid-base balance of blood in animal model of hemorrhagic shock. L-arginine (150 mg/kg bolus) and oxacom (3.2 μ M/kg bolus) injected into the blood flow rats prior to hemorrhage and after hemorrhage. In the first series (control) after cessation of hemorrhage the isotonic 0.9% solution of NaCl was resumed (2x shed blood volume) to rats. 2 series – oxacom was infused 20 min before hemorrhagic, isotonic solution – after hemorrhage. 3 series – oxacom was infused to animals after hemorrhage together isotonic solution. In the 4 and 5 series L-arginine was infused as well as oxacom in 2 and 3 series. Isotonic solution was infused in the same volume as in control series. Oxacom infused before hemorrhage (2 series) and L-arginine with saline solution (5 series) recovers the systemic hemorrhagic and microcirculation on the better as compared with control.

It is suggested that nitric oxide produced from exogenous substrate L- arginine supports basal level of nitric oxide that is necessary for normal perfusion of organs and tissues. Effects of oxacom on hemodynamic under conditions of hemorrhagic shock are determined by its antioxidant activity and the ability to induced S-nitrosylation of proteins.

Keywords: hemorrhagic shock, infusion therapy, nitric oxide, L-ARGININE, dinitrosyl iron complex with glutathione (OXACOM).

Введение. Актуальность проблемы повышения эффективности инфузионной терапии геморрагического шока постоянно возрастает. В первую очередь, это связано с увеличением числа крупных аварий и катастроф, при которых появляется большое количество пострадавших, находящихся в состоянии геморрагического шока различной степени тяжести [1]. Патогенез нарушений, развивающихся при массивной кровопотере и приводящих к шоковому состоянию, требует постоянного глубокого изучения для последующей разработки путей улучшения существующих методов лечения.

На сегодняшний день известно, что при геморрагическом шоке происходит нарушение генерации биологически активной молекулы – оксида азота (NO) [2, 3]. Оксид

азота в организме млекопитающих выполняет ряд функций, основными из которых являются регуляция сосудистого тонуса и дезагрегация форменных элементов крови, особенно тромбоцитов [4, 5]. Нашими предшествующими исследованиями, согласующимися с данными других авторов [6, 7], показано, что при геморрагическом шоке организму необходимо поддерживать так называемый базальный уровень NO, для сохранения нормальной перфузии ряда органов и тканей. В связи с этим представлялось целесообразным использование в схемах инфузионной терапии геморрагического шока доноров оксида азота – L-аргинина и оксакома. L-аргинин является субстратом, из которого в организме образуется NO. Реализация действия NO в организме, как правило, обеспечивается включением NO в некоторые соединения, защищающие его от быстрого окисления в нитриты и нитраты. Стабилизация NO эндогенного происхождения в организме млекопитающих обеспечивается, в частности, путем его включения в динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с различными анионными лигандами, в том числе с глутатионом [8]. Стабилизация необходима для реализации действия NO, т.е. переноса этого высоко реактивного агента от клеток-доноров к клеткам-мишеням. В крови ДНКЖ локализуется в основном в плазме и комплексно связан с альбумином. По мере распада комплекса ДНКЖ обеспечивает поступление NO в ткани [8].

Оксаком – комплекс ДНКЖ с глутатионом является первым отечественным препаратом – донором NO созданным под руководством профессора А.В.Ванина (Институт химической физики им. Н.Н.Семенова, РАН, Москва).

Цель исследования. Изучение влияния доноров оксида азота L-аргинина и оксакома на инфузионную терапию геморрагического шока.

Материалы и методы исследования. Поставлено 5 серий экспериментов на крысах самках весом 230 ± 5 г, находящихся под тиопенталовым наркозом (35-40 мг/кг). Кровопотерю (2,6-2,8 мл/100г) проводили дробными кровопусканиями из левой сонной артерии в течение 35-45 минут до снижения артериального давления (АД) до 65-48 мм рт. ст. Животные до начала лечения находились в состоянии гипотензии $33,4 \pm 1,2$ минуты.

1-я серия (n=19) контрольная, в которой по окончании кровопотери крысам инфузировали изотонический раствор натрия хлорида (ФР) в объеме, превышавшем в 2 раза объем потерянной ими крови. Оксаком (3,2 мМ/кг) вводили во 2-й серии (n=9) за 20 минут до кровопотери, а в 3-й серии (n=8) – после кровопотери. В 4-й (n=10) и 5-й (n=7) сериях L-аргинин («Мерк») в дозе 150 мг/кг был введен по той же схеме, как и оксаком во

2-й и 3-й сериях опытов. ФР после кровопотери инфузирвали во всех сериях опытов в том же объеме, что и в контроле.

В экспериментах определяли АД, ударный объем сердца (УО) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) по реограмме, полученной методом тетраполярной грудной реографии [9]. Рассчитывали минутный объем кровообращения (МОК), общее периферическое сопротивление сосудов (ОПС) кровотоку и рабочий индекс левого желудочка (РИЛЖ). О микроциркуляции (МЦ) судили визуально по характеру кровотока в сосудах серозной оболочки тонкого кишечника методом контактной микроскопии в отраженном свете (микроскоп ЛЮМАМ-КФ, ЛОМО). Изменения микрокровотока оценивали по балльной шкале [10]. Отсутствие видимых нарушений в капиллярах регистрировали как «0» баллов. С замедлением скорости движения эритроцитов по сосудам и появлением в микрососудах агрегатов клеточных элементов крови величина балла возрастала. Остановка кровотока в микрососудах оценивалась как стаз, величина балла при этом была максимальной и равнялась четырем. Микрокровоток исследовали до кровопотери, в состоянии геморрагического шока и через 10 и 60 минут после окончания инфузии. В эти же периоды эксперимента производили измерение АД и УО и брали пробы артериальной крови для определения на анализаторе ABL-500 фирмы «Radiometer» (Дания) напряжения угольной кислоты (pCO_2) и кислотно-основного состояния (КОС) организма (pH – отрицательный логарифм концентрации водородных ионов и BE_a – дефицит буферных оснований). Полученный цифровой материал обработан с использованием методов непараметрической статистики по программе "Statistica 7.0".

Результаты и обсуждение. Кровопотеря приводила к снижению АД, уменьшению МОК (таблица 1). В 2-3 раза падал ударный объем сердца. Количество функционирующих капилляров (КФК) в поле зрения уменьшилось и составляло в сравнении с исходным 42-56%. Скорость движения эритроцитов в микрососудах слизистой оболочки тонкого кишечника замедлялась, а в ряде опытов наступал стаз. В капиллярах, где медленный кровоток сохранялся, появлялись агрегаты клеток крови. В крови отмечался метаболический ацидоз: уменьшался pH , возрастал дефицит буферных оснований, падало напряжение угольной кислоты в артериальной крови. Таким образом, инфузионную терапию начинали проводить у животных с выраженными нарушениями системной гемодинамики, микроциркуляции и метаболизма, вызванных массивной потерей крови и гипотензией.

Возмещение кровопотери изотоническим раствором натрия хлорида (1 серия) приводило к улучшению центральной гемодинамики (таблица 1). Через 10 и 60 минут после окончания инфузии АД повышалось. Возрастал УО, увеличивался МОК, ОПС достигало исходного значения. Скорость же движения форменных элементов крови в микрососудах была низкой (таблица 2). В большинстве капилляров через 10 и 60 минут после инфузии ФР наблюдались агрегаты эритроцитов. Полного восстановления капиллярного кровотока и дезагрегации клеток крови не было отмечено ни в одном контрольном исследовании. Центральная гемодинамика и микроциркуляция под действием инфузии солевого раствора хотя и возрастали, но не возвращались к исходным величинам.

КОС у крыс значительно изменилось. Через 10 минут по окончании инфузии дефицит буферных оснований уменьшился почти в два раза по сравнению с состоянием перед началом вливания, до исходных значений возросло напряжение угольной кислоты в артериальной крови. Коррекция рН крови на 10-й минуте наблюдения достигалась за счет уменьшения ВЕ, но к 60-й минуте после окончания инфузии метаболический ацидоз в стадии дыхательной компенсации сохранялся.

Таблица 1 – Системная гемодинамика у крыс при геморрагическом шоке и инфузии ФР (1 серия), ФР в сочетании с оксакомом (2 и 3 серии) и L-аргинином (4 и 5 серии), М±m

Показатели	Се- рии	исх.	Окончание кровопотери	После инфузии	
				10 мин	60 мин
АД, мм.рт.ст.	1	139±2	56±4 ⁺	101±3 ^{+#}	98±3 ^{+#}
	2	144±6	61±8 ⁺	104±5 ^{+#}	109±7 ^{+#}
	3	138±5	58±8 ⁺	87±4 ^{+#}	98±5 ^{+#}
	4	135±4	54±6 ⁺	100±4 ^{+#}	100±5 ^{+#}
	5	139±6	48±6 ⁺	102±5 ^{+#}	91±6 ^{+#}
МОК, мл/мин•100 г	1	15,4±0,2	4,5±0,4 ⁺	13,6±0,5 ^{+#}	12,1±0,7 ^{+#}
	2	15,3±0,2	5,3±0,8 ⁺	26,0±2,0 ^{+#♦}	21,2±1,2 ^{+#♦}
	3	14,0±0,5	4,5±0,5 ⁺	16,3±0,8 ^{#•}	16,7±1,6 ^{#•}
	4	15,1±0,3	5,5±0,7 ⁺	20,7±1,7 ^{+#•}	18,2±1,3 ^{+#•}
	5	15,2±0,4	5,4±0,5 ⁺	24,1±2,2 ^{+#×}	23,5±2,0 ^{+#×}
УО, мл/мин•кг	1	0,36±0,01	0,13±0,01 ⁺	0,37±0,02	0,34±0,02
	2	0,37±0,01	0,15±0,02 ⁺	0,63±0,05 ^{+#♦}	0,50±0,03 ^{+#♦}
	3	0,35±0,02	0,14±0,01 ⁺	0,43±0,03 ^{+#•}	0,42±0,04 ^{#•}
	4	0,38±0,01	0,18±0,01 ⁺	0,52±0,03 ^{+#•}	0,47±0,03 ^{+#•}
	5	0,39±0,02	0,17±0,02 ⁺	0,66±0,06 ^{+#×}	0,60±0,07 ^{+#×}
ОПС,	1	7,3±0,1	10,7±0,8 ⁺	6,1±0,3 ^{+#}	7,0±0,5 [#]
	2	7,6±0,3	9,1±1,1 ⁺	3,4±0,4 ^{+#♦}	4,2±0,4 ^{+#♦}

дин•сек•см ⁻⁵ /кг•10 ⁻⁴	3	7,9±0,2	11,2±1,7 ⁺	4,3±0,3 ^{#•}	5,0±0,6 ^{#•}
	4	7,2±0,3	9,4±1,3 ⁺	4,0±0,2 ^{+##}	4,7±0,6 ^{+##}
	5	7,4±0,3	7,5±1,3	3,5±0,2 ^{+##x}	3,3±0,2 ^{+##x}
РИЛЖ, кГм/мин•кг	1	290±7	33±3 ⁺	188±10 [#]	165±11 [#]
	2	299±16	47±9 ⁺	359±25 ^{+##}	308±18 ^{+##}
	3	262±17	35±5 ⁺	196±13 [#]	234±15 ^{+##}
	4	274±7	41±7 ⁺	280±31 ^{+##}	245±16 ^{+##}
	5	283±12	35±5 ⁺	337±46 ^{+##x}	292±31 ^{+##x}

Примечание: здесь и в последующих таблицах достоверность различий ($p \leq 0,05$) по сравнению с исходными данными отмечена знаком ⁺, с данными после окончания кровопотери [#], между данными 1 и 2 серий [♦], 1 и 3 серий [•], 1 и 4 серий [■], 1 и 5 серий [×].

При предварительном введении оксакома (2 серия) после возмещения массивной кровопотери ФР гемодинамика значительно улучшилась по сравнению с контрольной серией (табл. 1). Через 10 и 60 минут после окончания инфузии УО превосходил исходный в полтора раза, хотя АД повышалось в такой же степени, как и в контрольной серии. Соответственно росту УО увеличивался МОК. Уменьшение ОПС в среднем на 40% после инфузии ($p \leq 0,05$) было следствием действия оксакома, способствующего сохранению NO и пополнению его базального уровня. РИЛЖ значительно увеличивался и в отдельных опытах превышал исходные значения, что косвенно отражало возросшую сократительную способность сердечной мышцы.

Таблица 2 – Микроциркуляция у крыс при геморрагическом шоке и инфузии ФР (1 серия), ФР в сочетании с оксакомом (2 и 3 серии) и L-аргинином (4 и 5 серии), $M \pm m$

Показатели	Се- рии	исх.	Окончание кровопотери	После инфузии	
				10 мин	60 мин
КФК в поле зрения, % от исх.	1	100±0	51±4 ⁺	88±4 [#]	97±6 [#]
	2	100±0	60±5 ⁺	100±0 [#]	100±0 [#]
	3	100±0	45±5 ⁺	90±5 [#]	90±5 [#]
	4	100±0	55±7 ⁺	96±4 [#]	97±3 [#]
	5	100±0	43±3 ⁺	97±3 [#]	97±3 [#]
Скорость движения эритроцитов, баллы	1	0	-3,63±0,06 ⁺	-0,89±0,19 ^{+##}	-0,89±0,12 ^{+##}
	2	0	-3,11±0,11 ⁺	-0,44±0,12 ^{+##♦}	-0,44±0,11 ^{+##♦}
	3	0	-3,00±0,00 ⁺	-0,83±0,16 ^{+##}	-0,83±0,32 ^{+##}
	4	0	-3,30±0,22 ⁺	-0,70±0,11 ^{+##}	-0,80±0,11 ^{+##}
	5	0	-3,71±0,14 ⁺	0±0 ^{#x}	0±0 ^{#x}
Агрегация эритроцитов,	1	0	2,63±0,06 ⁺	1,00±0,12 ^{+##}	1,06±0,12 ^{+##}
	2	0	2,11±0,12 ⁺	0,56±0,11 ^{+##}	0,44±0,12 ^{+##♦}

баллы	3	0	$2,00 \pm 0^+$	$0,83 \pm 0,16^{+\#}$	$0,83 \pm 0,32^{+\#}$
	4	0	$2,40 \pm 0,11^+$	$0,90 \pm 0,11^{+\#}$	$0,80 \pm 0,22^{+\#}$
	5	0	$2,71 \pm 0,14^+$	$0 \pm 0^{\#x}$	$0 \pm 0^{\#x}$

В большинстве капилляров (2 серия) через 10 и 60 минут после инфузии ФР количество агрегатов эритроцитов и скорость движения форменных элементов крови была значительно ниже, чем в контроле (таблица 2). Восстановление системной гемодинамики было стойким. Действие оксакома на кровообращение в целом связано, скорее всего, со способностью препарата обратимо связывать молекулы эндогенного NO, этим обеспечивать их сохранность и перемещать в клетки жизненно важных органов оксид азота [11, 12]. Кроме того, известно, что препарат обладает антиоксидантной активностью и способностью индуцировать нитрозилирование белков [8].

Восстановление гемодинамики сопровождалось у животных этой серии выраженным уменьшением циркуляторной гипоксии, что нашло отражение в коррекции КОС. К 60-й минуте после окончания инфузии остаточный компенсированный метаболический ацидоз был незначительным.

Применение оксакома в составе инфузируемого солевого раствора (3 серия) после тяжелой кровопотери сопровождалось ростом АД (таблица 1). Однако УО и МОК были низкими, а ОПС и РИЛЖ не отличались от контроля. Возможно, сохранившаяся агрегация эритроцитов (таблица 2) и менее высокая, в силу этого, скорость движения клеток в капиллярном русле были одной из причин низкой производительности сердечной мышцы. Можно предположить, что оксаком, примененный в составе ФР, поступал слишком поздно в организм, находившийся к моменту введения препарата в состоянии геморрагического шока. Проявить свои лечебные свойства в этих условиях в полной мере препарат не смог.

При предварительном введении L-аргинина (4 серия) после возмещения массивной кровопотери ФР системная гемодинамика значительно улучшилась по сравнению с контрольной серией (таблица 1). Через 10 и 60 минут после окончания инфузии УО превосходил исходный в полтора раза, хотя АД повышалось в такой же степени, как и в контрольной серии. Соответственно росту УО увеличивался МОК. Уменьшение ОПС в среднем на 40% после инфузии ($p \leq 0,05$), скорее всего, было следствием действия L-аргинина, продуцирующего NO и пополняющего его базальный уровень. РИЛЖ увеличивался и возвращался к исходному, что отражало возросшую сократительную способность сердечной мышцы.

Введение L-аргинина в составе ФР (5 серия) вызвало восстановление до исходных значений скорости движения эритроцитов по капиллярам и существенное снижение количества агрегатов эритроцитов, что вызывало увеличение УО и МОК, РИЛЖ, снижение ОПС. Так, если восстановление скорости кровотока в капиллярах в 1-й серии было отмечено только в 7 опытах из 19 (37%), то в 5-й серии этот показатель увеличивался во всех 7 опытах (100% , $p \leq 0,05$). Вероятно, улучшение МЦ под влиянием аргинина способствовало восстановлению не только капиллярного, но и системного кровотока. В контрольной же серии подобные изменения наблюдались только у 4 крыс из 19 (21%, $p \leq 0,05$).

Следовательно, L-аргинин улучшает работу сердечной мышцы, восстанавливает нарушенную МЦ. Можно полагать, что основной эффект L-аргинина состоит в обеспечении адекватного количества субстрата для генерации NO. Механизм действия L-аргинина на сердце, возможно, связан с тем, что он защищает кардиомиоциты от действия свободных радикалов [13, 14]. Кроме того, аргинин через орнитин может превращаться в глютаминовую кислоту, обладающую антиоксидантной активностью. Увеличение УО и МОК, снижение ОПС и рост РИЛЖ были такими же, как и в серии 4 и были статистически значимо выше, чем в контроле.

Таким образом, L-аргинин, примененный как до начала кровопотери, так и после нее, повышает эффективность инфузионной терапии, восстанавливая системную гемодинамику и микроциркуляцию, что является результатом поддержания базального уровня NO, столь необходимого для сохранения периферического кровотока. Оксаком оказался более эффективен при предварительном введении, что может служить основанием для применения его в предоперационном периоде.

Литература

1. Шок: Теория, клиника, организация противошоковой помощи /Под общ. ред. Г.С. Мазуркевича, С.Ф. Багненко. – СПб.: Политехника, 2004. – 539 с.
2. Cauwels A. Nitric oxide in shock // *Kidney Int.* – 2007. – V. 72, № 5. – P. 557-565.
3. Роль оксида азота в патогенезе геморрагического шока и регуляция его содержания в эксперименте/ М.И. Ремизова, К.А. Гербут, Г.В. Гришина и др.//Первая конференция Российского национального общества по изучению шока: матер. конф. – М., 2013. – С.53-54.
4. Ignarro L. J. Nitric oxide: Biology and Pathobiology. Academic Press. – 2009. – P.139-154.

5. Доровских В.А. Оксид азота в химии, биологии и медицине/ В.А. Доровских, Т.А. Баталова, А.А. Сергиевич и др. – Благовещенск: ГОУ ВПО АГМА, 2007. – 41с.
6. Ремизова М.И., Гербут К.А. Роль оксида азота в развитии централизации кровообращения при геморрагическом шоке в эксперименте. // Бюлл. exper. биол. мед. – 2014. – Т. 157, № 1. – С. 27-29.
7. Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M. Exogenous nitric oxide induces protection during hemorrhagic shock//Resuscitation. – 2009. – V. 80 (6). – P. 707-712.
8. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology// Nitric Oxide Biol. Chem. – 2009. – № 21. – P.1-13.
9. Карпинский В.В., Словеснов С.В., Рерих Р.А. Определение сердечного выброса у мелких лабораторных животных методом тетраполярной реографии // Пат. физиол. эксперим. терапия. –1986. –№ 1. – С. 74-77.
10. Кочетыгов Н.И., Куликов А.М. Системная гемодинамика и микроциркуляция при лечении ожогового шока кровезамещающими растворами // Пробл. гематол. перелив. крови. – 1982. – № 6. – С.24-30.
11. Chazov E.I. Hypotensive effect of Oxacom containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: Animal studies and clinical trials on healthy volunteers/ Chazov E.I., Rodnenkov O.V., Zorin A.V. et al. // Nitric Oxide: Biology and Chemistry. – 2012. – V.26, № 3. – P. 148-156.
12. Лакомкин В.Л. Действие динитрозильного комплекса железа с глутатионом – донора оксида азота – на систему кровообращения крыс и обезьян/ В.Л. Лакомкин, А.А. Тимошин, Ц.Р. Орлова и др.// Кардиология. – 2009. – Т.49, № 5. – С. 53-60.
13. Arora T.K. L-Arginine infusion during resuscitation for hemorrhagic shock: impact and mechanism/ T.K. Arora, A.K. Malhotra, R. Ivatury et al. // The Journal of Trauma and Acute Care Surgery. – 2012. – V. 72, № 2. – P. 397-402.
14. Марков Х.М. L-аргинин – оксид азота в терапии болезней сердца и сосудов // Кардиология. – 2005. – № 6. – С. 87-95.