
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК [616-001.36-005.1-003.215:577.127.4]-092.9

**СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КРОВИ
ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ШОКЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

С. Л. Зыблев, З. А. Дундаров, А. И. Грицук

Гомельский государственный медицинский университет

Цель: изучить в эксперименте состояние анти- и прооксидантных свойств крови здоровых лабораторных животных и находящихся в условиях геморрагического шока.

Материал и методы. В эксперименте лабораторные животные были разделены на две группы: первая (контрольная) — здоровые белые крысы, вторая (опытная) — животные, которым моделировали геморрагический шок. Определили состояние анти- и прооксидантных свойств крови, концентрацию глюкозы и мочевины крови, показатели красной крови животных обеих групп. Произвели морфологическое исследование животных второй группы.

Результаты. В первой группе кровь животных обладала антиоксидантными свойствами. У животных в состоянии геморрагического шока наблюдалась прооксидантная активность крови с развитием оксидативного стресса. При острой массивной кровопотере страдает клеточный гомеостаз с прогрессированием полиорганной недостаточности и усугублением течения геморрагического шока.

Заключение. Острая массивная кровопотеря приводит к развитию геморрагического шока, свободнорадикальному дисбалансу с формированием оксидативного стресса. Раннее включение в комплексную терапию больных с острой тяжелой кровопотерей антиоксидантных препаратов может улучшить течение геморрагического шока.

Ключевые слова: окислительный стресс, полиорганная недостаточность, геморрагический шок

**THE STATE OF ANTIOXIDANT BLOOD ACTIVITY
IN HEMORRHAGIC SHOCK IN EXPERIMENT**

S. L. Zyblev, Z. A. Dundarov, A. I. Gritsuk

Gomel State Medical University

Objectives. To study in experiment the anti-and prooxidant blood properties in healthy laboratory animals and when they are in the condition of hemorrhagic shock.

Materials and methods. During the experiment, the laboratory animals were divided into two groups. The first group (control) included healthy white rats. The second group (experimental) consisted of the animals modeled to be in hemorrhagic shock. The status of anti-and prooxidant blood properties as well as glucose and blood urea concentration, red blood characteristics of the animals from both the groups was determined. Morphological study of the animals from the second group was carried out.

Results. In the first group, the blood of the animals had antioxidant properties. The animals in the state of hemorrhagic shock observed prooxidant activity of the blood with the development of oxidative stress. In acute massive loss of blood the cellular homeostasis became inferior with the progression of multiple organ failure and course aggravation of hemorrhagic shock.

Conclusion. Acute massive loss of blood leads to hemorrhagic shock, free radical imbalance with the formation of oxidative stress. Early inclusion of antioxidant drugs in the complex therapy may improve the course of hemorrhagic shock in patients with acute severe loss of blood.

Key words: oxidative stress, multiple organ failure, hemorrhagic shock.

Введение

Проблема геморрагического шока остается актуальной для современной медицинской науки и практического здравоохранения. Острая массивная кровопотеря неизбежно приводит к снижению объема циркулирующей крови, компенсаторному периферическому ангиоспазму, нарушению микроциркуляторного кровотока. Данные процессы обуславливают гипоперфузию тканей, развитие тканевой гипоксии и метаболического ацидоза за счет повышения

концентрации лактата [1]. Тканевая гипоксия потенцирует переход клеточного аэробного дыхания на анаэробный тип, что приводит к накоплению лактата, торможению активности ферментов цикла Кребса и дыхательной цепи митохондрий [2]. При недостатке кислорода в условиях тканевой гипоксии происходит накопление его активных форм (АФК) [3]. Последние, являясь высокореактивными соединениями, активируют каскад окислительных реакций с образованием новых свободных радикалов,

которые, в свою очередь, приводят к разрушению мембран и деградации клеток и их органелл с развитием органных нарушений. Как известно, в здоровом организме имеется баланс между пероксидными реакциями и системой антиоксидантной защиты [4, 5, 6]. Нарушение этого баланса в результате геморрагического шока обуславливает запуск цепных реакций перекисного окисления липидов и развития «окислительного стресса» [7, 8]. В большинстве литературных источников, в которых приводятся экспериментальные данные, геморрагический шок рассматривается с позиции гемодинамических и метаболических расстройств [9, 10, 11]. Вопрос об изучении кислородзависимых нарушений в эксперименте при массивной кровопотере остается открытым, несмотря на его исключительную научно-практическую значимость.

Цель работы

Изучить в эксперименте состояние анти- и прооксидантных свойств крови здоровых лабораторных животных и находящихся в условиях геморрагического шока.

Материалы и методы

В работе исследована антиоксидантная активность (АОА) крови интактных животных (контрольная группа) и лабораторных животных, перенесших острую массивную кровопотерю (опытная группа). Метод определения АОА крови основан на реакции автоокисления адреналина в щелочной среде, которая, как известно, является супероксид-генерирующей и супероксид-детектирующей системой и позволяет определить анти- и прооксидантные свойства биологических материалов. Измерение накопления продуктов окисления адреналина (адренохрома) проводили по методике Т. В. Сироты [12] в модификации [13]. Способность биологических материалов ингибировать реакцию автоокисления адреналина оценивается как антиоксидантная активность, а активация данной реакции — как прооксидантная. В эксперименте использовано 40 половозрелых самцов белых крыс массой 200–220 г. Всех крыс разделили на две группы. Первая — интактные животные, $n = 20$ (контрольная группа). Во второй группе животных (опытная, $n = 20$) моделировали геморрагический шок тяжелой степени, по методике, разработанной нами (приоритетная справка № а20111466 от 21.12.11 г.), путем интракардиального забора 45–50 % объема циркулирующей крови со скоростью 2 мл/100 г в минуту.

Все экспериментальные исследования выполнялись в соответствии с требованиями сообщества «Европейская конвенция по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986).

Показатели красной крови, концентрацию глюкозы и мочевины в крови, а также АОА

крови оценивали через 24 и 48 часов. АОА крови животных по ее способности влиять на скорость автоокисления адреналина в щелочной среде. Измерения проводили в тест-системе. В измерительную кювету с 0,2 М карбонатным буфером, pH 10,55 (2 мм) вносили 0,1 мл 0,1 % раствора адреналина гидрохлорида (0,26 мМ), перемешивали и начинали регистрацию реакции автоокисления адреналина при комнатной температуре (22 °С) и длине волны 347 нм (контрольная проба). Измерение оптической плотности проводили каждые 5 с в течение 105 с (1,75 мин) на спектрофотометре СФ-46 (ЛМО). Изменение оптической плотности в единицу времени (за минуту) оценивали как скорость реакции автоокисления адреналина. В аналогичных условиях измеряли скорость автоокисления адреналина в опытной пробе, в которую до внесения адреналина добавляли 0,1 мл сыворотки крови лабораторного животного. Изменение величины оптической плотности раствора во времени носит линейный характер. Скорость (V) процесса рассчитывается по формуле: $\Delta E/t$, где ΔE — изменение оптической плотности, то есть $\Delta E = E_t - E_0$, где E_0 — оптическая плотность раствора, измеренная сразу после добавления адреналина, а E_t — оптическая плотность раствора через 105 с (1,75 мин) после добавления адреналина, t — время в минутах.

Присутствие сыворотки в растворе ингибирует или активировывает скорость автоокисления адреналина. Процент ингибирования или активации реакции вычисляли по формуле:

$$[1 - \Delta E_{\text{оп}} / \Delta E_{\text{к}}] \times 100 \%,$$

где $\Delta E_{\text{оп}}$ и $\Delta E_{\text{к}}$ — скорости реакции автоокисления адреналина, соответственно, в присутствии и отсутствии сыворотки крови. Ингибирование реакции оценивали как антиоксидантную активность биологического материала, а активацию — как прооксидантную. Антиоксидантную и прооксидантную активность биологического материала (сыворотка крови) выражали в условных единицах: 1 условная единица — это 1 % ингибирования реакции (+1 условная единица) или 1 % активации реакции (–1 условная единица). Определение концентрации мочевины и глюкозы в крови проводилось на приборе «Солар» РМ2111 унифицированным методом. Показатели красной крови измеряли на приборе Nixon. В работе использованы реактивы: 0,1 % раствор адреналина гидрохлорида; NaCO_3 «Sigma» (США); NaNHCO_3 «J. T. Baker» (Голландия).

Животные выводились из эксперимента через 48 ч после кровопускания. Материалом для морфологического исследования служили участки легких, миокарда, печени, селезенки и почек. Для световой микроскопии материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального форма-

лина. Окрашивание парафиновых срезов производили гематоксилином-эозином. Морфологические исследования проводились на световом оптическом уровне при увеличении $\times 10$, $\times 20$ и $\times 40$.

Данные обработаны с помощью программы «Statistica», 6,0. Согласно критерию Шапиро-Уилка, полученные данные имели распределение, отличное от нормального, таким образом, были использованы методы непараметрической статистики (в качестве описательной статистики использовалась Ме (медиана) и ин-

терквартильный размах (LQ – UQ). Для определения достоверности статистически значимых различий использовался критерий Вилкоксона (для зависимых групп).

Результаты

В результате исследования получены данные о состоянии АОА крови, показателей красной крови, концентрации мочевины и глюкозы в сыворотке крови интактных лабораторных животных и перенесших острую массивную кровопотерю (таблица 1).

Таблица 1 — Показатели крови лабораторных животных контрольной и опытной групп

Показатель	Группа		
	I (контрольная)	II (опытная)	
		24 ч	48 ч
АОА, %, Ме [25 % – 75 %]	+39 [+16,5 – +53]	-59,2 [-80,7 – -38] $p_1 < 0,0001$	-13,7 [-18 – -9,4] $p_1 < 0,0001$ $p_2 < 0,0001$
Ег, $\times 10^{12}$, Ме [25 % – 75 %]	7,63 [7,31–8,19]	4,26 [4,11–4,41] $p_1 < 0,0001$	3,22 [3,11–3,33] $p_1 < 0,0001$ $p_2 < 0,0001$
Нб, г/л, Ме [25 % – 75 %]	142 [135,5–148]	85 [81,5–88,5] $p_1 < 0,0001$	67 [62–72] $p_1 < 0,0001$ $p_2 < 0,0001$
Мочевина, ммоль/л, Ме [25 % – 75 %]	5,3 [5,0–6,0]	7,42 [6,83–8,01] $p_1 = 0,000339$	9,6 [8,55–10,65] $p_1 < 0,0001$ $p_2 = 0,000673$
Глюкоза, ммоль/л, Ме [25 % – 75 %]	6,08 [5,78–6,38]	9,3 [8,68–9,93] $p_1 = 0,00014$	9,8 [9,45–10,15] $p_1 < 0,0001$ $p_2 = 0,062$

Примечание. p_1 — статистически значимо по сравнению с нормой; p_2 — статистически значимо по сравнению с 24-часовым периодом

Так, в контрольной группе животных сыворотка крови обладала выраженной антиоксидантной активностью, средняя величина (Ме) ингибирования скорости автоокисления адреналина составляла +39 % [+16,5 % – +53 %].

В состоянии геморрагического шока, по видимому, происходит истощение системы антиоксидантной защиты, уже через сутки сыворотка крови лабораторных животных имела выраженную прооксидантную активность. Средняя величина (Ме) активации реакции автоокисления адреналина составляла -59,2 % [-80,7% – -38 %]. Прооксидантная активность сохранялась и наблюдалась на протяжении 48 ч, несмотря на выраженную тенденцию к снижению. Средняя величина (Ме) активации через 48 часов составляла -13,7 % [-18 % – -9,4 %].

Тяжесть кровопотери подтверждалась статистически достоверным снижением количества эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови лабораторных животных опытной группы уже через 24 ч с прогрессированием нарастания анемии в течение 48 ч по сравнению с показателями в контрольной группе ($p_1 < 0,0001$).

В свою очередь, рост концентрации мочевины и глюкозы в крови у животных второй группы в течение 48 ч говорит о расстройстве метаболизма. Так, через 24 ч количество мочевины в крови животных данной группы статистически достоверно увеличилось по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе ($p_1 = 0,000339$) и нарастало в течение 48 ч. Концентрация глюкозы крови животных, перенесших тяжелую кровопотерю, также статистически достоверно выросла через 24 ч по сравнению с животными контрольной группы ($p_1 = 0,00014$) с последующей тенденцией к росту. Так, через 48 ч количество глюкозы во второй группе животных увеличилось по сравнению с показателем через 24 ч.

Все животные второй группы выведены из эксперимента через 48 ч с последующим морфологическим исследованием органов. При микроскопическом исследовании органов отмечена типичная картина геморрагического шока. В печени выявлено малокровие синусов, отсутствие морфологических признаков застоя крови. Определелись гипертрофия и гиперпла-

зия клеток РЭС, имелось наличие единичных моноцитов, увеличено количество «темных» гепатоцитов. В одном поле зрения обнаружены три экспозиционные вакуоли, являющиеся, как полагают, морфологическим эквивалентом гиповолемического шока. В почках отмечена анемия коркового слоя, наблюдается белковая дистрофия эпителия канальцев и отек стромы. В мозговом слое определились сладжи и стазы в сосудах микроциркуляторного русла, очаговые периваскулярные кровоизлияния. В легких зафиксирован интраальвеолярный отек и очаговые ателектазы, наблюдалось запустевание крупных артериальных сосудов, а в микроциркуляторном русле — стазы крови, очаговые периваскулярные кровоизлияния с инфильтрацией макрофагами. Также выявлены очаговые кровоизлияния в альвеолы, а местами с выпадением нитей фибрина. При исследовании миокарда обнаружены очаговый межмышечный отек, анемия с очаговыми межмышечными кровоизлияниями. В селезенке имелись стазы, сладжи крови в сосудах микроциркуляторного русла с диффузными периваскулярными кровоизлияниями.

Таким образом, получено комплексное морфологическое подтверждение развившегося геморрагического шока.

Обсуждение

Кровь, как любая биологическая среда, обладает антиоксидантной активностью. В результате острой кровопотери в условиях гипоксии происходит мобилизация антиоксидантных свойств организма как ответ на активацию перекисных процессов. Прогрессирование патологического процесса с развитием шока ведет к истощению антиоксидантного потенциала крови с превалированием ее прооксидантных свойств. Так, прооксидантная активность сыворотки крови во второй группе животных наблюдалась уже в течение первых суток после кровопотери и составила -59,2 % [-80,7 % — -38 %] (достоверность $p_1 < 0,0001$). Активация прооксидантных свойств крови у животных этой группы свидетельствует о развитии окислительного стресса с последующим истощением системы антиоксидантной защиты.

В критической ситуации катехоламины оказывают более выраженное воздействие на организм. Так, адренергическое влияние на углеводный обмен проявляется в мобилизации гликогена и активации глюконеогенеза, косвенным свидетельством чему является гипергликемия и повышение содержания мочевины крови. Концентрация глюкозы крови животных, перенесших тяжелую кровопотерю, статистически значимо выросла уже через 24 ч по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе ($p_1 = 0,00014$) с последующей тенденцией к росту. В этих условиях формируется состояние инсулинорезистентности, огра-

ничающее утилизацию глюкозы мышечной и жировой тканью и способствующее поддержанию гипергликемии.

Известно, что в ответ на стресс в клеточном метаболизме превалируют процессы катаболизма, которые в большей степени выражены со 2 суток, в «фазу прилива» («flow phase») [14, 15]. В условиях катаболизма белковый обмен характеризуется отрицательным азотистым балансом, обусловленным в определенной мере утилизацией аминокислот, образующихся в процессе протеолиза в реакции глюконеогенеза. Об этом свидетельствует умеренное, но достоверное увеличение концентрации мочевины крови животных в опытной группе на 80 % через 48 ч относительно крови животных контрольной группы ($p < 0,0001$).

Показатели крови экспериментальных животных второй группы и морфологические данные, полученные в эксперименте, подтверждают наличие геморрагического шока и прогрессирование полиорганной недостаточности.

Таким образом, острая массивная кровопотеря приводит к развитию геморрагического шока, свободнорадикальному дисбалансу с формированием окислительного стресса. Последний, в свою очередь, усугубляет течение шока, способствуя прогрессированию полиорганной недостаточности. Раннее включение в комплексную терапию больных с острой тяжелой кровопотерей антиоксидантных препаратов может улучшить течение геморрагического шока.

Выводы

1. Кровь здоровых животных обладает выраженными антиоксидантными свойствами, что является физиологическим состоянием организма.

2. В условиях острой гипоксии, вызванной массивной кровопотерей, происходит развитие окислительного стресса с истощением системы антиоксидантной защиты организма, что проявляется в активации прооксидантной активности крови животного.

3. В состоянии окислительного стресса страдает клеточный гомеостаз, что способствует развитию и прогрессированию полиорганной недостаточности и усугублению течения геморрагического шока.

4. Полученные данные могут служить основанием для разработки мер коррекции выявленных нарушений путем применения препаратов, обладающих антиоксидантной активностью, при массивной кровопотере.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. О единстве тканевой гипоксии и шока / А. П. Симоненков [и др.] // Анестезиология и реаниматология. — 200. — Т. 6. — С. 73–76.
2. Pathophysiology of hemorrhagic shock. A role of arterial ketone body ratio as an index of anoxic metabolism of the liver in acute blood loss / M. Ukikusa [at al.] // Advances in shock research. — 1981. — Vol. 5. — P. 11–25.

3. *Murphy, M. P.* How mitochondria produce reactive oxygen species / *M. P. Murphy* // *Biochem J.* — 2009. — Vol. 1. — P. 1–13.
4. *Пасечник, И. Н.* Окислительный стресс и критические состояния у хирургических больных / *И. Н. Пасечник* // *Вестник интенсивной терапии.* — 2004. — Т. 3. — С. 27–31.
5. Роль свободнорадикальных реакций в формировании кислородного гомеостаза организма / *М. Ф. Тимочко [и др.]* // *Нур. Med. J.* — 1998. — Vol. 6, № 4. — С. 154–158.
6. Особенности кислородного баланса в экстремальных условиях / *М. Ф. Тимочко [и др.]* // *Нур. Med.* — 1996. — Т. 4, № 3. — С. 8–12.
7. *Сазонтова, Т. Г.* Закономерности модуляции антиоксидантного статуса клетки в ответ на активацию свободно-радикального окисления / *Т. Г. Сазонтова* // *Нур. Med. J.* — 2002. — Т. 10, № 1–2. — С. 2–9.
8. *Зарубина, И. В.* Биохимические аспекты гипоксических повреждений клетки / *И. В. Зарубина* // *Нур. Med. J.* — 1999. — Vol. 7, № 1–2. — С. 2–9.
9. Коррекция с помощью фосфатидилхолиновых липосом нарушений кровообращения и метаболизма во время геморрагического шока у крыс / *А. С. Хромов [и др.]* // *Нур. Med. J.* — 2005. — Т. 13, № 1–2. — С. 10–14.
10. *Yang Shaolong.* Mechanism of hepatoprotection in proestrus female rats following trauma-hemorrhage: heme oxygenase-1-derived normalization of hepatic inflammatory responses / *Yang Shaolong [et al.]* // *Journal of leukocyte biology.* — 2009. — Vol. 6. — P. 1015–1026.
11. Obesity-induced hepatic hypoperfusion primes for hepatic dysfunction after resuscitated hemorrhagic shock / *P. J. Matheson [et al.]* // *Surgery.* — 2009. — Vol. 4. — P. 739–747.
12. Пат. 2144674 Российская Федерация, МПК7 G01N33/52, G01N33/68. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений / *Т. В. Сирота*; заявитель и патентообладатель *Т. В. Сирота.* — № 99103192/14; заявл. 24.02.1999; опубл. 20.01.2000, Б.И.П.М. — 2000. — № 2. — С. 266.
13. Оценка состояния антиоксидантной активности слезной жидкости / *А. И. Грицук [и др.]* // *Биомедицинская химия.* — 2006. — Т. 52, № 6. — С. 601–608.
14. Нутритивная поддержка у тяжелообожженных / под ред. *О. Н. Почепень.* — Минск: БелМАПО, 2009. — 25 с.
15. *Metabolic support of the critically ill: 2008 update* / *G. Iapichino [et al.]* // *Minerva Anesthesiol.* — 2008. — № 12. — P. 709–713.

Поступила 07.02.2013

УДК 612.176:796.071.2

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАРДИОИНТЕРВАЛОГРАФИИ У ДЕВУШЕК-ГРЕБЦОВ ПОСЛЕ ТРЕНИРОВОЧНОГО СТРЕССА

¹Ж. А. Чубуков, ¹Т. С. Угольник, ²Л. А. Будько

¹Гомельский государственный медицинский университет

²Гомельский областной диспансер спортивной медицины

Проведено исследование динамики показателей кардиоинтервалографии девушек-гребцов до и после двухнедельного тренировочного стресса. До и после тренировочного стресса адаптация спортсменов в активной ортостатической пробе достигалась за счет изменения активности парасимпатического отдела вегетативной нервной системы. Тренировочный стресс сопровождался появлением тенденции к увеличению показателя адаптивных ресурсов организма.

Ключевые слова: кардиоинтервалография, стресс, академическая гребля.

CHANGE OF CARDIOINTERVALOGRAPHY VALUES IN FEMALE ROWERS AFTER TRAINING STRESS

¹Z. A. Chubukov, ¹T. S. Ugolnik, ²L. A. Budko

¹Gomel State Medical University

²Gomel Regional Sport Medicine Dispensary

The authors of the article have studied the dynamics of cardiointervalographic values in female rowers a fortnight before and after training stress. The adaptation of the rowers in an active orthostatic test was achieved by a change of activity of the parasympathic section of the vegetative nervous system. The training stress was accompanied by a tendency to increase the parameter of adaptive resources.

Key words: cardiointervalography, stress, boat racing.

Введение

Гребля является перспективным циклическим видом спорта. На XXX летних Олимпийских играх 2012 г. в Лондоне 25 % наград из общего медального зачета олимпийской сборной Республики Беларусь завоевали спортсмены-гребцы, в том числе одна женская команда. Успехи белорусских спортсменов-гребцов тесно взаимосвязаны с экстремальными нагрузками в ходе тренировочного процесса.

Известно, что физические нагрузки являются одним из неспецифических факторов, вызывающих активацию стресс-системы. Основ-

ными нейроэндокринными регуляторными центрами реализации проявлений стресса при физических нагрузках являются гипоталамо-гипофизарный нейросекреторный аппарат и норадренергические структуры «голубоватого пятна» (locus ceruleus) ретикулярной формации головного мозга. Активация данных стресс-реализующих центров способствует продукции гормонов, которые реализуют свои эффекты во многих органах и системах. В случае с физическими нагрузками изменения, обусловленные тренировочным стрессом, прежде всего наблюдаются в функционировании регуляторных сис-