

Зыблев С.Л., Дундаров З.А.

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Zyblev S.L., Dundarov Z.A.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Динамика метаболического статуса у экспериментальных животных при острой кровопотере

Dynamics of metabolic status in experimental animals in acute
blood loss

Резюме

В статье представлены экспериментальные данные 37 половозрелых самцов белых крыс, массой 200–210 г (опытная группа). Острую кровопотерю воспроизводили путем забора 60–65% объема циркулирующей крови. Через 1 час после кровопотери оценивали количество эритроцитов и концентрацию гемоглобина, кислотно-основного состояния, биохимические показатели и антиоксидантную активность (АОА) сыворотки крови лабораторных животных, перенесших острую кровопотерю. Полученные данные сравнивали с показателями здоровых животных (контрольная группа, $n = 30$). После острой массивной кровопотери сыворотка крови лабораторных животных имела выраженную прооксидантную активность. Истощение антиоксидантного потенциала крови с превалированием ее прооксидантных свойств ведет к прогрессированию метаболических расстройств и развитию полиорганной недостаточности. Значимая гиперуремия, гипоальбуминемия и гиперазотемия у животных опытной группы объясняется активацией катаболизма, утилизацией аминокислот, образующихся в процессе протеолиза в реакциях глюконеогенеза, поддерживающего гипергликемию. Таким образом, можно говорить о развившемся окислительном стрессе в опытной группе животных в условиях геморрагического шока с нарушением клеточного гомеостаза. Нами получен значимый рост концентрации мочевой кислоты у животных опытной группы по сравнению с показателем контрольной группы. Данный рост имеет компенсаторный характер в ответ на активацию процессов перекисного окисления. Это подтверждается высокой корреляционной зависимостью уровня урикемии с прооксидантной активностью сыворотки крови. Полученные данные позволяют сделать вывод об активном участии мочевой кислоты в формировании системы антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: острая кровопотеря, антиоксидантная активность, состояние метаболизма.

Resume

The paper presents the experimental data on 37 sexually mature male white rats with weight 200-210 g (experimental group). Acute blood loss has been reproduced by taking 60-65% of circulating blood volume. 1 hour after the blood loss we have estimated the rates of red blood cell count and concentration of hemoglobin in the blood, the acid-base balance, biochemical rates and antioxidant activity of blood serum of laboratory animals after acute blood loss. The data obtained have been compared with those of healthy animals (control group, n = 30).

After the acute massive blood loss the blood serum of laboratory animals had an expressed prooxidant activity. The depletion of the antioxidant potential of blood with the prevalence of its prooxidant properties leads to the progression of metabolic disorders and the development of multiple organ failure. Significant hyper uremia, hypoalbuminemia and hypernitremia in the experimental group of animals are explained by the activation of catabolism, utilization of amino acids produced in the process of proteolysis in the reactions of gluconeogenesis, which supports hyperglycemia.

Thus, it's possible to talk about the developed oxidation stress in the experimental group of animals in hemorrhagic shock conditions with violation of cellular homeostasis. We have received a significant increase of the uric acid concentration in the experimental group compared to the control group. This increase has a compensatory character in response to the activation of peroxidation processes. This is confirmed by the high correlation of uricemia level with prooxidant activity of blood serum. The findings lead to the conclusion about the active participation of uric acid in the formation of the antioxidant defense system.

Key words: acute blood loss, antioxidant activity, state of metabolism.

■ ВВЕДЕНИЕ

Терапия острой кровопотери остается одной из актуальных проблем в современной медицине. Трудности купирования всех патофизиологических звеньев геморрагического шока создают предпосылки для нарушения метаболического статуса больного с развитием органной дисфункции и прогрессированием полиорганной недостаточности. Успех в лечении острой массивной кровопотери неосуществим без четкого понимания патогенеза развивающейся при этом патологическом состоянии полиорганной дисфункции [5]. Современные исследователи уделяют большое внимание изучению свободнорадикальных процессов и состоянию антиоксидантной защиты у больных с острой кровопотерей. Также изучается взаимосвязь степени органной дисфункции, нарушения метаболизма с активностью перекисных процессов и степенью свободнорадикального дисбаланса у больных с острой кровопотерей [6, 8, 10]. Как известно, в организме присутствуют естественные антиоксиданты, наиболее активным из которых является низкомолекулярная водорастворимая мочевая кислота. В литературе описаны влияния мочевой кислоты на антиоксидантный статус при остром геморрагическом панкреонекрозе [13], изменение концентрации мочевой кислоты при имобилизационном стрессе [1] и корреляционная связь концентрации мочевой кислоты и общей антиоксидантной активности у недоношенных детей, находящихся на искусственной вентиляции легких [2]. Вместе с тем изменения концентрации мочевой кислоты в критических состояниях

Острая массивная кровопотеря неизбежно приводит к снижению объема циркулирующей крови, компенсаторному периферическому ангиоспазму, нарушению микроциркуляторного кровотока.

изучены недостаточно. В работах, посвященных изучению влияния мочевой кислоты на антиоксидантный статус больных с подагрой, получены неоднозначные результаты, свидетельствующие о ее противоположной активности в зависимости от концентрации [11]. Исследований, изучающих влияние острой кровопотери на уровень мочевой кислоты, в современной литературе нет. Изучение изменений в метаболическом статусе и их взаимосвязь со свободнорадикальными нарушениями при острой массивной кровопотере – актуально и перспективно.

■ ЦЕЛЬ

Изучить метаболический статус и состояние свободнорадикальных процессов у лабораторных животных при острой массивной кровопотере.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили на 37 половозрелых самцах белых крыс массой 200–210 г (опытная группа). Острую кровопотерю воспроизводили под галотановым наркозом по оригинальной методике, разработанной нами (приоритетная справка от 21.12.2011 № а20111466), путем интракардиального забора 60–65% объема циркулирующей крови со скоростью 2 мл/100 г/мин. Кровопотеря составляла 34 мл/кг, что соответствует кровопотере тяжелой степени. Оценивали количество эритроцитов и концентрацию гемоглобина, кислотно-основного состояния, биохимические показатели и антиоксидантную активность (АОА) сыворотки крови лабораторных животных через 1 час после острой кровопотери. Полученные данные сравнивали с показателями здоровых животных (контрольная группа, $n = 30$). Показатели «красной крови» измеряли на гематологическом анализаторе Nihon. Оценку биохимических показателей крови проводили унифицированным методом на анализаторе ARCHITECT с8000 (США), исследование кислотно-основного состояния, газов и электролитов венозной крови – на анализаторе Stat Profile* Critical Care Xpress (США).

Метод определения антиоксидантной активности основан на реакции автоокисления адреналина в щелочной среде, которая, как известно, является супероксид-генерирующей и супероксид-детектирующей системой, позволяющей определить анти- и прооксидантные свойства биологических материалов. Измерение накопления продуктов окисления адреналина (адренохрома) проводили по методике Т.В. Сироты [9] в модификации А.И. Грицука и соавт. [3].

Все экспериментальные исследования выполнялись в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

В работе использованы реактивы «Анализ Мед» (Республика Беларусь); 0,1% раствор адреналина гидрохлорида (Россия); NaCO₃ («Sigma», США); NaHCO₃ («J.T. Baker», Голландия).

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 Me (медиана) и интерквартильный размах [LQ–UQ]). Для определения достоверности различий использовался U Test критерия Mann–Whitney, для корреляционного анализа – ранговый критерий Spearman.

Способность биологических материалов ингибировать реакцию автоокисления адреналина оценивается как антиоксидантная активность, а активация данной реакции – как прооксидантная.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что у животных перенесших острую массивную кровопотерю, в биохимических анализах крови наблюдались значимые гипопропротеинемия, гипергликемия, гиперуремия, гиперазотемия и статистически значимо выросла концентрация мочевой кислоты – в 2,5 раза (табл. 1).

Исследования электролитного обмена показали, что у животных, перенесших острую массивную кровопотерю, уровень электролитов крови значимо не отличался от показателей здоровых животных. Показатели кислотно-основного состояния крови животных, перенесших острую массивную кровопотерю, указывали на развитие ацидоза с выраженным снижением рН до 7,26 и снижением уровня общего и стандартного бикарбонатов крови (HCO_3^- и $\text{HCO}_3^-_{\text{std}}$) (табл. 2). Увеличение дефицита достоверным ростом концентрации лактата подтверждает наличие истинного метаболического лактат-ацидоза. Изменения в кислородном статусе крови животных опытной группы характеризуются существенным снижением pCO_2 и ростом pO_2 , что в свою очередь свидетельствует о вторичной респираторной гипервентиляции.

Таблица 1

Показатели биохимического анализа крови после острой массивной кровопотери (Ме [25–75%])

Показатель	Контрольная группа (n = 30)	Опытная группа (n = 37)
Мочевая кислота, мкмоль/л	98,8 [80–125]	233,2 [140–210]*
Мочевина, ммоль/л	4,4 [4,0–4,8]	6,6 [5,2–8,2]*
Глюкоза, ммоль/л	7,5 [6,5–8,7]	12 [7,2–15,7]*
Белок, г/л	59,7 [56–67]	49,4 [46–51]*
Креатинин, ммоль/л	41 [38,5–43]	56 [51–59]*

Примечание:

* – статистически значимо по сравнению с контрольной группой (p < 0,05).

Таблица 2

Показатели кислотно-щелочного состояния животных после острой массивной кровопотери (Ме [25–75%])

Показатель	Контрольная группа (n = 30)	Опытная группа (n = 37)
рН	7,33 [7,29–7,37]	7,26 [7,2–7,3]*
pCO_2 , мм рт. ст.	45 [35–54]	36 [31–41]*
pO_2 , мм рт. ст.	62 [44–76]	111 [98–124]*
SO_2 , %	91 [89–95]	93 [95–98]
HCO_3^-	26,6 [24,6–29]	16 [15,1–17,1]*
$\text{HCO}_3^-_{\text{std}}$	25 [23–26,4]	17,2 [17,3–17,6]*
BE_{std} , ммоль/л	0,3 [–2,3–2,7]	–11,3 [–13,1 – –10,1]*
BE_{blood} , ммоль/л	–0,4 [–2,4–1,9]	–9,7 [–11,1 – –9,4]*
Лак	1,97 [1,6–2,4]	6,8 [6,7–7,3]*
Na^+ , ммоль/л	141 [136–141,2]	138,7 [138,9–139,5]
K^+ , ммоль/л	5,5 [4,5–6,4]	5 [4,5–5,4]
Cl^- , ммоль/л	103,4 [101–106,2]	105 [103–107]

Примечание:

* – статистически значимо по сравнению с контрольной группой (p < 0,05).

Тяжесть кровопотери подтверждалась значимым снижением количества эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови лабораторных животных опытной группы уже через 1 час (табл. 3).

Была изучена антиоксидантная активность сыворотки крови у животных обеих групп. Полученные данные по величине оптической плотности в конечной точке измерения и результаты расчетов представлены в табл. 4.

Из табл. 4 видно, что сыворотка крови здоровых лабораторных животных обладала определенным уровнем антиоксидантной активности, равной 390 ед. акт./мл, что составляло 39% ингибирования реакции автоокисления адреналина в присутствии такой сыворотки.

В присутствии сыворотки крови животных, перенесших острую кровопотерю, отмечалась активация реакции автоокисления адреналина. Ускорение скорости составляло 65%, что является показателем прооксидантной активности сыворотки крови этой группы животных. Это обусловлено истощением антиоксидантных свойств сыворотки крови и значительным увеличением в ней веществ, обладающих прооксидантной активностью, что свидетельствует о некомпенсированном усилении свободнорадикальных процессов, являющихся важным звеном в формировании органной дисфункции при острой кровопотере.

Проведенный анализ корреляционных зависимостей выявил сильную отрицательную взаимосвязь концентрации мочевой кислоты и прооксидантной активности сыворотки крови у животных опытной группы: $r = -0,89$ ($p < 0,05$).

В норме кровь у здорового животного обладает антиоксидантной активностью [4]. В результате массивной кровопотери, острой гиповолемии и компенсаторной централизации кровообращения, происходит нарушение тканевой перфузии, что приводит к микроциркуляторным расстройствам и развитию гипоксии. В сложившейся ситуации азроб-

Таблица 3
Количество эритроцитов и концентрация гемоглобина животных после острой массивной кровопотери (Me [25–75%])

Группа	Er, $\times 10^{12}$	Hb, г/л
Контрольная группа (n = 30)	6,2 [5–6,7]	139 [134–146]
Опытная группа (n = 37)	4,7 [4,4–4,9]*	101 [99–103]*

Примечание:

* – статистически значимо по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таблица 4
Скорость окисления адреналина и оптическая плотность раствора в конечной точке измерения (M \pm m)

Показатель	Буфер	Контрольная группа	Опытная группа
Оптическая плотность, у.е.	0,034 \pm	0,021 \pm	0,056 \pm
Скорость окисления адреналина, у.е./мин	0,019 \pm	0,012 \pm	0,032 \pm
Антипрооксидантная активность, ед. акт./мл	–	390 \pm	–650 \pm

Примечания:

* – статистически значимо по сравнению с буфером ($p < 0,05$);

** – статистически значимо по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

ный гликолиз переключается на бескислородный процесс с накоплением лактата и «закислением» тканей, что подтверждается полученными результатами исследования. После острой массивной кровопотери более 60% объема циркулирующей крови уже через 1 час сыворотка крови лабораторных животных имела выраженную прооксидантную активность. Истощение антиоксидантного потенциала крови с превалированием ее прооксидантных свойств ведет к прогрессированию метаболических расстройств и развитию полиорганной недостаточности. Нарушение клеточного гомеостаза в стрессовой ситуации характеризуется гиперметаболизмом с превалированием процессов катаболизма. Так, адренергическое влияние на углеводный обмен проявляется в мобилизации гликогена и активации глюконеогенеза, косвенным свидетельством которого является гипергликемия и повышенное содержание мочевины крови. В этих условиях формируется состояние инсулинорезистентности, ограничивающее утилизацию глюкозы мышечной и жировой тканью и способствующее развитию так называемого «диабета травмы» [7]. Значимая гиперуриемия, гипоальбуминемия и гиперазотемия у животных опытной группы объясняется активацией катаболизма, утилизацией аминокислот, образующихся в процессе протеолиза в реакциях глюконеогенеза, поддерживающего гипергликемию. Это, в конечном счете, способствует развитию отрицательного азотистого баланса и развитию соответствующей клинической манифестации [12, 14].

Таким образом, можно говорить о развившемся окислительном стрессе в опытной группе животных в условиях геморрагического шока с нарушением клеточного гомеостаза. Нами получен значимый рост концентрации мочевой кислоты на 150% у животных опытной группы по сравнению с показателем контрольной группы. Данный рост имеет компенсаторный характер в ответ на активизацию процессов перекисного окисления липидов с выраженной прооксидантной активностью сыворотки крови животных этой группы. Это подтверждается высокой корреляционной зависимостью уровня урикемии с прооксидантной активностью сыворотки крови. Полученные данные позволяют сделать вывод об активном участии мочевой кислоты в формировании системы антиоксидантной защиты.

■ ВЫВОДЫ

1. 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.
2. Возникший дисбаланс в антипрооксидантной системе организма усугубляет нарушение метаболизма с превалированием процессов катаболизма, которое, как известно, развивается в стрессовой ситуации.
3. Высокая корреляционная связь уровня урикемии с прооксидантной активностью сыворотки крови животных, перенесших острую массивную кровопотерю, дает основание использовать показатель концентрации мочевой кислоты для диагностики нарушения антиоксидантной защиты организма.

В условиях развившейся тяжелой постгеморрагической анемии происходит активация процессов перекисного окисления, что в свою очередь мобилизует систему антиоксидантной защиты с последующим ее истощением [4].

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова, Ю.В. Возрастные особенности изменения содержания низкомолекулярных антиоксидантов в мозге и печени крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу / Ю.В. Волкова // Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 91–96.
2. Высокая общая антиоксидантная активность и мочевая кислота в аспириате из трахеобронхиального дерева при кислородном стрессе: адаптационный ответ на гипероксию? / Vento G., Mele M.C., Mordente A. [et al.] // *Acta Paediatrica*. – 2000. – № 3. – P. 336–342.
3. Грицук, А.И. Оценка состояния антиоксидантной активности слезной жидкости / А.И. Грицук [и др.] // *Биомедицинская химия*. – 2006. – Т. 52, № 6. – С. 601–608.
4. Зыблев, С.Л. Эффективность применения цитофлавина при геморрагическом шоке в эксперименте / С.Л. Зыблев, З.А. Дундаров, А.И. Грицук // *Хирургия. Восточная Европа*. – 2012. – № 4. – С. 64–71.
5. Изменения биохимических показателей крови и коагулограммы у хирургических больных, перенесших острую массивную кровопотерю / С.И. Третьяк, П.В. Протасевич // *Белорусский медицинский журнал*. – 2004. – № 3. – С. 103–106.
6. Моргунов, С.С. Коррекция тканевой гипоксии и процессов свободнорадикального окисления при гастродуоденальных кровотечениях / С.С. Моргунов // *Хирургия. Журнал имени Н.И. Пирогова*. – 2011. – № 9. – С. 71–75.
7. Нутритивная поддержка у тяжелообожженных / под ред. О.Н. Почепень. – Минск: БелМАПО, 2009. – 25 с.
8. Особенности консервативной терапии пациентов с кровоточащими язвами желудка и двенадцатиперстной кишки / В.А. Ступин [и др.] // *Фарматека*. – 2011. – № 2. – С. 58–63.
9. Патент 2144674 Российская Федерация, МПК7 G01N33/52, G01N33/68. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений / Сирота Т.В.; заявитель и патентообладатель Сирота Т.В. – № 99103192/14; заявл. 24.02.1999; опубл. 20.01.2000, Б.И.П.М. № 2, 2000 г., стр. 266.
10. Свободнорадикальные процессы у больных с желудочно-кишечными кровотечениями / Е.В. Силина [и др.] // *Хирургия. Журнал имени Н.И. Пирогова*. – 2011. – № 12. – С. 64–70.
11. Халфина, Т.Н. Мочевая кислота как про-/антиоксидант у пациентов с подагрой / Т.Н. Халфина, И.Х. Валеева, И.Г. Салихов // *Практическая медицина*. – 2011. – № 4 (11). – С. 129–132.
12. Iapichino, G. Metabolic support of the critically ill: 2008 update / G. Iapichino [et al.] // *Minerva Anesthesiol.* – 2008. – № 12. – P. 709–713.
13. Marciniak, A. Influence of non-enzymatic antioxidants on antioxidation status in acute haemorrhagic necrotizing pancreatitis in rat / A. Marciniak, K. Lutnicki // *Bull Vet Inst Pulawy*. – 2005. – № 49. – P. 133–139.
14. Mesejoa, A. Guidelines for specialized nutritional and metabolic support in the critically-ill patient. Update. Consensus SEMICYUC-SENPE: Introduction and methodology / A. Mesejoa [et al.] // *Nutr Hosp.* – 2011. – Vol. 2. – P. 67–71.

Поступила в редакцию 22.07.2013

Контакты:

e-mail: S.zyblev@yandex.ru

Зыблев Сергей Леонидович – ассистент кафедры хирургических болезней № 2 с курсом детской хирургии Гомельского государственного медицинского университета