

УДК 616-001.36-02:615.384  
©Шевченко, Агеева

## **ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВЫХ ГЕМОКОРРЕКТОРОВ НА МИТОХОНДРИАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В СЕРДЦЕ ПРИ ГЕМОРАГИЧЕСКОМ ШОКЕ**

*Л.И.Шевченко, Г.Р.Агеева*

НИИ Гематологии и переливания крови МЗ РУз, 700059, г.Ташкент,  
ул. Усмана Насыра, д.138, тел.: 787935

На экспериментальной модели геморрагического шока изучено влияние новых гемокорректоров сукцинасола и сукцивила на митохондриальное окисление миокарда кроликов. Улучшение функций митохондрий миокарда происходило при применении не только сукцивила, содержащего 1,4-нафтохинон, но и после инфузии сукцинасола, содержащего янтарную кислоту.

Применение новых гемокорректоров способствовало увеличению продолжительности жизни животных, улучшению гемодинамики, метаболизма, нормализации митохондриальных функций миокарда и, в целом, повышало эффективность терапии шока.

**Ключевые слова:** янтарная кислота, 1,4-нафтохинон, митохондрии сердца, геморрагический шок.

**ВВЕДЕНИЕ.** Известно, что в патогенезе геморрагического шока, сопровождаемого тяжелыми расстройствами системной гемодинамики, микроциркуляции и реологических свойств крови, значительное место занимает дефицит энергии в тканях и органах, обусловленный гипоксией и нарушением метаболизма, что в итоге приводит к гибели клетки [1-8].

В последние годы ведутся активные поиски биологически активных веществ, способных защитить клетку от экстремальных воздействий. В связи с этим большой интерес вызывают производные 1,4-нафтохинона, которые влияют на перенос электронов по дыхательной цепи митохондрий при повреждении электрон-транспортной системы в условиях шока [9-11].

Исходя из этого, нами разработан новый гемокорректор сукцивил, содержащий 1,4-нафтохинон, созданный на базе кровезаменителя сукцинасола, в состав которого входит естественный метаболит цикла Кребса - янтарная кислота [12,13].

Ранее нами были получены результаты о положительном влиянии сукцинасола и сукцивила на митохондриальное окисление печени при геморрагическом шоке [14,15]. В настоящей работе исследовано влияние новых гемокорректоров (сукцивила и сукцинасола) на митохондриальное окисление миокарда.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты выполнены на 50 кроликах самцах массой  $2,2 \pm 0,2$  кг под этиминаловым наркозом (40 мг/кг массы тела). Модель геморрагического шока вызывали путем снижения АД (артериальное давление) до 40 мм рт.ст., которое поддерживали на этом уровне до наступления спонтанной реинфузии 1/3 выпущенного количества крови.

Оценка тяжести состояния экспериментальных животных до и после воздействия инфузионных сред проводилась по показателям системной гемодинамики: АД; ОЦК (объем циркулирующей крови); КОС (кислотно-

## ГЕМОКОРРЕКТОРЫ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ПРИ ШОКЕ

основного состояния); показатели энергетического обмена: АТФ в сердце, состояния митохондриального окисления в сердце. Все показатели определяли в динамике развития постгеморрагических процессов, а также через 1 час после воздействия инфузионных сред (в дозе 40 мг/кг массы тела).

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы: 1 группа - 10 интактных животных, 2 группа - 20 животных в состоянии геморрагического шока, 3 группа - 10 животных после инфузии сукцинасола, 4 группа - 10 животных после введения сукцивила. У всех животных в бедренной артерии определяли АД на мониторе МХ-01; КОС определяли на микроанализаторе ОР-215 "Radelkis". В процессе эксперимента определяли: уровень гемоглобина (Hb), величину гематокрита (Ht), частоту дыхания (ЧД), ректальную температуру ( $t^{\circ}$ ) и количество выделенной мочи.

Митохондрии из сердца выделяли модифицированным способом, предусматривающим сохранность нативных свойств митохондрий миокарда [4]. Дыхание и окислительное фосфорилирование исследовали полярографически с помощью электрода Кларка, модифицированного в лаборатории. Скорость дыхания выражали в наноатомах кислорода за 1 минуту на 1 мг белка митохондрий. Среда инкубации содержала 0,25 М сахарозу, 0,01 М трис-HCl, 0,02М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 0,02М KCl, pH7,4. В качестве субстратов использовали 10 мМ сукцинат и глутамат. Конечные концентрации добавок ADP и 2,4-ДНФ (2,4-динитрофенол) - составляла 200 и 30 мкМ, соответственно. Метаболические состояния митохондрий обозначены следующими символами:  $V_2$  - скорость дыхания на экзогенном субстрате (состояние 2);  $V_3$  - скорость дыхания в активном состоянии после добавки ADP;  $V_4$  - скорость дыхания в состоянии 4 (после фосфорилирования ADP); t - время фосфорилирования (в сек.); ДКч - дыхательный контроль по Чансу ( $V_3/V_4$ ); ДКл - дыхательный контроль по Ларди-Велману ( $V_3/V_2$ ). Активность цитохромоксидазы определяли в той же среде инкубации с использованием в качестве донора электронов аскорбат (0,005 М) и тетраметил-*пара*-фенилендиамин (ТМФД; 200 мкМ). Цитохром с добавляли в количестве 0,2 мг. Статистическую обработку проводили методом непрямых разностей.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Геморрагический шок характеризовался снижением всех показателей; состояние животных было крайне тяжелым: АД было ниже 40 мм рт.ст., ОЦК составил 43%, pH артериальной крови снижался до  $6,95 \pm 0,02$  ед. О тяжести состояния животных в этой серии также свидетельствует снижение температуры тела до  $35,4 \pm 0,1^{\circ}$  С, уменьшение частоты дыхания, снижение функции почек вплоть до анурии. Содержание АТФ в сердце снизилось на 35%. При исследовании митохондриального окисления миокарда при геморрагическом шоке в митохондриях исчезла способность к фосфорилированию ADP при практически нормальных скоростях дыхания. Отмечена тенденция к снижению активности цитохромоксидазы в нативных митохондриях кардиоцитов. В фазе шока при окислении сукцината в среде инкубации, содержащей ЭДТА, наблюдалось замедление переноса электронов по дыхательной цепи, особенно после добавления к митохондриям акцептора фосфата. Скорость фосфорилирующего дыхания была снижена на 17% ( $p < 0,05$ ), а показатели ADP/O - на 16% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходными; время фосфорилирования увеличено на 79,7%. Аналогичная картина наблюдалась при окислении глутамата.

Параллельные исследования, проведенные в среде инкубации, не содержащей ЭДТА (для исключения сопрягающего эффекта комплексона), выявили еще более выраженные нарушения в митохондриях миокарда. Это относится в наибольшей степени к способности митохондрий окислять сукцинат. При окислении глутамата в среде, не содержащей комплексон, изменение дыхательной и фосфорилирующей функций митохондрий миокарда сопровождалось более выраженными нарушениями дыхательной и фосфорилирующей функции редокс-цепи (рис. 1 А, Б, б).

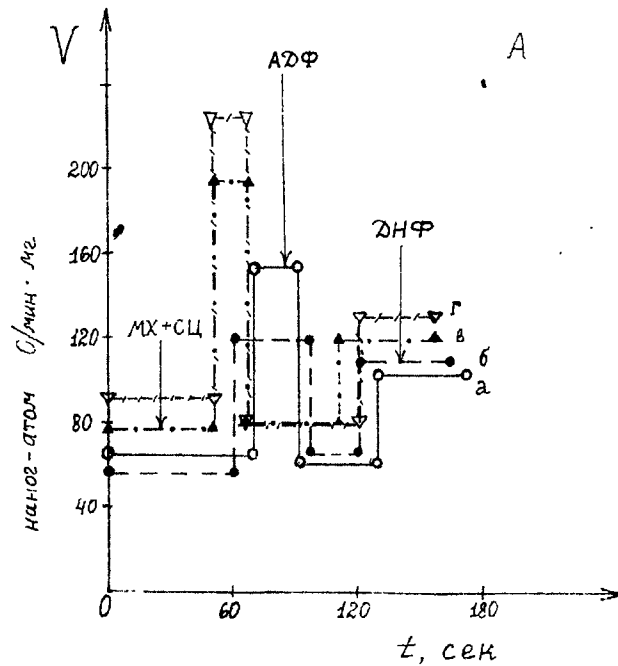


Рисунок 1А.

Показатели дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий сердца кроликов при геморрагическом шоке и после инфузии сукцинасола и сукцивила (среда инкубации без ЭДТА). Субстраты: А - сукцинат; а - в исходном состоянии; б - шок; в - через 1 час после лечения сукцинасолом; г - через 1 час после лечения сукцивилем.

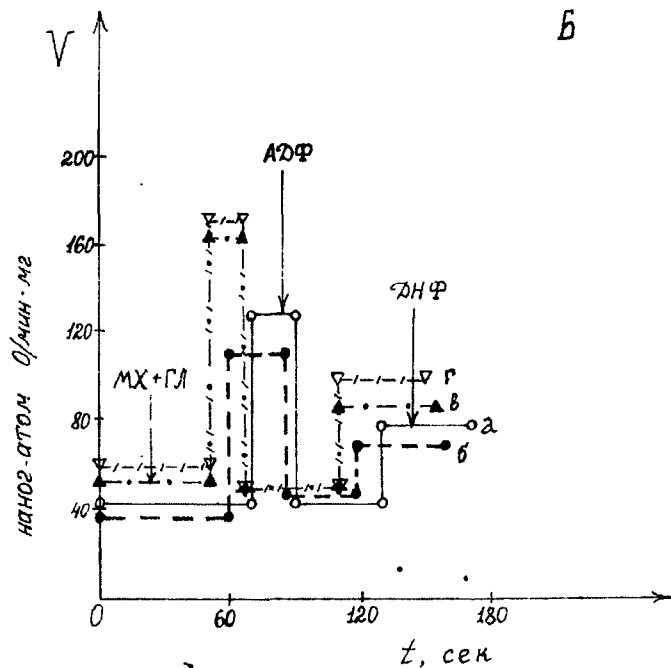


Рисунок 1Б.

Показатели дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий сердца кроликов при геморрагическом шоке и после инфузии сукцинасола и сукцивила (среда инкубации без ЭДТА). Субстраты: Б - глутамат; а - в исходном состоянии; б - шок; в - через 1 час после лечения сукцинасолом; г - через 1 час после лечения сукцивилем.

## ГЕМОКОРРЕКТОРЫ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ПРИ ШОКЕ

В терминальной фазе шока способность митохондрий сердечной мышцы окислять аскорбат+ТМФД снижалась у большинства животных. Значительная степень угнетения активности терминального участка цепи сопровождалась снижением фосфорилирующей функции митохондрий. Этот факт отмечен в опытах, когда в среде инкубации отсутствовал цитохром *c*, но при его добавлении в ячейку снижение активности цитохромоксидазы было более выраженным. Можно полагать, что подавление функции цитохромоксидазы обусловлено повреждением самого фермента (табл.).

*Таблица.* Показатели дыхания митохондрий сердца (наног-атомы О/мин·мг белка) кроликов при геморрагическом шоке и после введения кровезаменителей (субстрат - аскорбат+ТМФД)

Среда инкубации	В исходном состоянии	Шок n=20	Через 1 час после лечения	
			Сукцинасол (10)	Сукцивил (10)
Без цитохрома <i>c</i>	158,5±12,2	143±4,0	172,4±9,2**	206,5±9,3**
С цитохромом <i>c</i>	370,7±15,1	263*±10,8	350,8±10,3**	360,0±14,7**

Примечания: в скобках количество животных; \* - достоверность различия ( $p<0,05$ ) по сравнению с исходными данными, \*\* - то же по сравнению с данными на предыдущем этапе.

Таким образом, проведенные исследования позволяют считать, что геморрагический шок помимо серьезных нарушений со стороны системного кровообращения, метаболизма, кислотно-основного состояния, способствует нарушению митохондриального окисления и возникновению дефицита энергии в кардиоцитах.

После введения сукцинасола животным, находившимся в терминальной стадии шока, значительно улучшались показатели системной гемодинамики (АД повышение до 80,5 мм рт.ст.; рН - 7,19±0,03) и улучшалась сократительная способность миокарда. Эти сдвиги могли быть обусловлены не только восполнением ОЦК, но и положительным влиянием гемокорректора на метаболические процессы в сердечной мышце. Это тем более вероятно, что после кровопотери у них снижались дыхательные контроли и повышалось время фосфорилирования. Ответ на этот вопрос можно получить при исследовании митохондриального окисления в миокарде после лечения животных предполагаемым гемокорректором.

В митохондриях миокарда через 1 ч после введения сукцинасола наблюдалось выраженное усиление окислительных процессов и повышение скорости синтеза АТФ. Содержание АТФ в миокарде увеличилось до нормы (65±0,95 ммоль/л). Улучшение показателей системной гемодинамики под влиянием сукцинасола сопровождалось увеличением скоростей дыхания во всех метаболических состояниях при окислении митохондриями миокарда сукцината ( $p<0,05$ ), которые стали даже выше, чем у интактных животных. Особенно резко повысилась скорость потребления кислорода после добавления акцептора фосфата ( $V_3$ ) в инкубационную среду. Скорость фосфорилирующего дыхания превысила на 45,3% показатели до лечения и на 20,6% ( $p<0,05$ ) исходные данные.

В результате более значительного повышения скорости  $V_3$ , по сравнению со скоростями  $V_2$  и  $V_4$ , происходило увеличение показателей дыхательного контроля по Ларди и Чансу, отражающих степень энергетической регуляции дыхания. Ускоренный транспорт электронов по дыхательной цепи мало отразился на величине коэффициента сопряжения с окислительным фосфорилированием ADP/O. Одновременно отмечалось практически полное восстановление времени фосфорилирования до лечения, значительно увеличенное (в 2 раза) по сравнению с исходными данными.

При окислении митохондриями миокарда глутамата получены аналогичные данные. После инфузии сукцинасола в среде бсз ЭДТА митохондриальные функции кардиомиоцитов восстанавливались (рис. 1 А, Б, в).

Как показали проведенные исследования, через 1 час после вливания сукцивила АД увеличивалось до 94,8±0,2 мм рт.ст., а рН - до 7,28. В митохондриях миокарда наблюдалась выраженная активация окислительных процессов и увеличение синтеза АТФ за единицу времени. При окислении сукцината митохондриями миокарда в среде инкубации, содержащей ЭДТА, происходило достоверное повышение скорости потребления кислорода, особенно выраженное в

состояниях  $V_3$ ,  $V_4$  и  $V_{\text{днф}}$ . Скорость потребления кислорода увеличилась соответственно на 92,3%, 48%, 32,7% ( $p < 0,01$ ), по сравнению с данными до лечения и на 32,7%, 24%, 17% ( $p < 0,05$ ), по отношению к результатам лечения сукциназолом. Из-за более значительного увеличения скорости  $V_3$  по сравнению со скоростями  $V_2$  и  $V_4$  происходило увеличение ДК по Ларди и Чансу (на 30% и на 31,8% соответственно;  $p < 0,001$ ). Повышение скорости потребления  $O_2$  митохондриями миокарда после воздействия сукцивила приводило к увеличению генерации АТР. Время фосфорилирования после вливания сукциназола сократилось, по сравнению с данными при шоке в 2,6 раза и стало даже меньше, чем у интактных животных. При окислении глутамата митохондриями миокарда получены аналогичные данные. Во многом сходные данные получены при окислении сукцината и глутамата в среде инкубации не содержащей ЭДТА. После инфузии сукцивила при окислении сукцината и глутамата произошла нормализация показателей окислительного фосфорилирования у всех животных. При этом величины скорости потребления кислорода, эффективности фосфорилирования были соизмеримы с данными, полученными при использовании среды инкубации содержащей ЭДТА (рис. 1 А, Б, Г).

При окислении системы аскорбат+ГМФД в среде инкубации без цитохрома с скорость переноса электронов увеличилась после инфузии сукциназола на 20,9% ( $p < 0,01$ ) и на 39,8% ( $p < 0,01$ ) после инфузии сукцивила. Скорость окисления аскорбата+ГМФД в среде инкубации с цитохромом с повысилась на 30-35% соответственно, что указывает на увеличение способности цитохромоксидазы дыхательной цепи митохондрий миокарда акцептировать электроны и транспортировать их на кислород. Достоверное повышение потребления кислорода при окислении системы аскорбат+ГМФД как в среде инкубации с цитохромом с, так и без него, указывает на нормализацию функции терминального звена дыхательной цепи при шоке под влиянием новых гемокорректоров.

Сравнивая результаты лечения животных, находившихся в терминальной фазе шока, двумя видами гемокорректоров, можно констатировать, что они оба активизируют процессы транспорта электронов и выработку АТР митохондриями миокарда. Однако по многим исследованным показателям функционального состояния митохондрий результаты в группе кроликов, получивших сукцивил, были выше, чем после вливания той же инфузионной среды, но без соединения 1,4-нафтохинона. Следует отметить, что различия в эффективности двух гемокорректоров проявились и при исследовании основных параметров гемодинамики, pH артериальной крови, а также в продолжительности жизни животных. Продолжительность жизни животных, получивших вливание сукцивила, была втрое больше, чем после введения сукциназола.

Тот факт, что улучшение функции митохондрий происходило при применении не только сукцивила, содержащего средство, регулирующее перенос электронов по дыхательной цепи, но и после инфузии сукциназола, свидетельствует о том, что для нормализации деятельности дыхательной цепи особенно важным является восстановление коронарной перфузии. Кроме того, надо учесть, что в составе сукциназола имеются вещества, в частности, ионы калия и натрия сукцинат, воздействующие на основные метаболические механизмы патогенеза шока. Не исключено, что более полное восстановление системной гемодинамики, pH артериальной крови и увеличение продолжительности жизни животных при лечении сукцивилем обусловлено тем, что кроме указанных выше компонентов в его состав входит 1,4-нафтохинон, активирующий не только митохондриальное окисление, но и процессы детоксикации [16], агрегации тромбоцитов [17], утилизации жировых субстратов и перекисного окисления липидов мембран [11]. И, наконец, как показали исследования, включение 1,4-нафтохинона в дыхательную цепь и сброс электронов с NADH-дегидрогеназы на кислород, способствуя оптимизации соотношения восстановленных и окисленных пиридиннуклеотидов, имеет особое значение для кардиоцитов, нормализации функции клеток и положительно сказывается на энергообеспечении жизненно важных органов и в частности миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Братусь В.Д., Шерман Д.М. (1989) Патолофизиол. и клин. аспекты. Киев. Наук. думка.
2. Долгушина А.Д., Горкун А.В. (1988) Трансфузионная терапия экстремальных состояний в эксперименте и клинике. Л., с. 34-39.
3. Кочетыгов Н.И. (1984) Кровезаменители при кровопотере и шоке. Л.
4. Курязов А.М. (1998) Инфузионная терапия терминальных клеточных повреждений при острой печеночной недостаточности новыми гемокорректорами. - Автореф дисс.канд. мед. наук - Ташкент.
5. Рябов Г.А. (1994) Синдромы критических состояний. М.
6. Filos K.S. et all. (1996) Crit. Care Med. **24**, №5,855-861.
7. Haljamie H. (1993) Acta Anaesth. Scand, **98**.-Suppl., 3-6.
8. Peitzman A.V. et all. (1995) Curr. Mobil. Surg., **32**, 925-1002.
9. Левин Г.С. (1991) Биоэнергетические процессы при кровопотере и шоке. Изд. - им.Ибн Сины. - Ташкент.
10. Шнейвайс В.Б., Друлле А.Я., Дрегерис Я.Я., Левин Г.С. (1992) Вопр. мед. химии, **38**(6), 37-41.
11. Шнейвайс В.Б., Амилов К.С., Левин Г.С. (1994) Пат. физиол. и экспер. терапия, №1, 27-30.
12. Шевченко Л.И., Хазбиевич И.С., Агеева Г.Р., Холматова Н.М., Бакирханов М.К., Бобоев К.Т. (2001) Предварительный патент Узбекистана 04659, Бюлл. "Расмий Ахборотнома", №2.
13. Шибунская С.С., Шевченко Л.И., Шнейвайс Г.Б., Левин Г.С. (1997) А.с. 4106 РУз. Способ восстановления функций почек при массивной кровопотере и шоке. Опубликовано 31.03.97г. Бюлл. "Расмий Ахборотнома", №1.
14. Шевченко Л.И. (1993) Влияние сукцинатно-солевого гемокорректора на гемодинамику и метаболизм при кровопотере и шоке. - Автореф. Дисс. ... канд. биол. наук. Ташкент.
15. Шевченко Л.И. (2000) Актуальные вопросы современной гематологии и гемотрансфузиологии. Сб. науч. тр. Ташкент, сс.169-173, 175-177.
16. Хазбиевич И.С., Шнейвайс В.Б. (1996) V съезд терапевтов Казахстана. - Тез.докл., Алма-Ата, с.44.
17. Калмыкова И.Б., Шевченко Л.И. (1996) Вопросы гематологии и трансфузиологии. Сб. Научн. Тр. Ташкент, с.42-46.

Поступила 23.09.2002

THE LEARNING OF INFLUENCE OF NEW HEMOCORRECTORS TO MYTOKHONDRIAL OXIDATION OF HEART IN HEMORRHAGIC SHOCK

L.I.Shevchenko, G.R.Ageyeva

Research Institute of Hematology and Transfusiology, Ministry of Public Health, Usman Nasir street, 138, Tashkent, 700059, Republic of Uzbekistan; tel.:787935

In experimental model of hemorrhagic shock, the influence of new hemocorrectors, succinasole and succinyl (1,4-naphtoquinone) on rabbit myocardial mitochondrial oxidation was studied. Both substances improved function of myocardial mitochondria.

Administration of new hemocorrectors increased duration of life of animals subjected to hemorrhagic shock, improved hemodynamics, metabolism, normalized myocardial mitochondrial functions and increased positive effect of shock therapy.

**Key words:** amber acid, 1,4-naphtoquinone, myocardial mitochondria, hemorrhagic shock.