

ГИПОКСИЯ КАК ВЕДУЩИЙ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ПОСТРЕАНИМАЦИОННОЙ КАРДИОДЕПРЕССИИ

В. Т. Долгих¹, Л. Г. Шикунова², О. В. Корпачева¹

¹ Омская государственная медицинская академия, кафедра патофизиологии с курсом клинической патофизиологии

² Научно-исследовательский институт общей реаниматологии РАМН, Москва

Hypoxia as the Leading Pathogenetic Factor of Postresuscitative Cardiodepression

V. T. Dolgikh, L. G. Shikunova, O. V. Korpacheva

Department of Pathophysiology with a Course of Clinical Pathophysiology, Omsk State Medical Academy; Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

В работе оценивается чувствительность к гипоксии изолированных изоволюмически сокращающихся сердец белых беспородных крыс-самцов, перенесших 4-минутную клиническую смерть от острой кровопотери. Установлено, что угнетение сократительной функции миокарда и его повышенная чувствительность к гипоксии в раннем постреанимационном периоде обусловлена нарушением биоэнергетики и активацией процессов липопероксидации. 4-кратное снижение pO_2 в растворе Кребса-Хензеляйта вызывает более быстрое и более выраженное развитие контрактур миокарда, а реперфузия оксигенированным раствором вызывает еще большие повреждения сердечной мышцы. *Ключевые слова:* клиническая смерть, реанимация, сократимость и метаболизм миокарда, гипоксия.

The paper estimates the hypoxic sensitivity of isolated isovolumetrically contracting hearts of non-inbred albino male rats experiencing 4-min clinical death from acute blood loss. In the early postresuscitative period, the inhibited contractility of the myocardium and its increased hypoxic sensitivity has been ascertained to be due to impaired bioenergetics and activated lipid peroxidation processes. A four-fold pO_2 reduction in the Krebs-Henseleit solution causes a more rapid and more marked development of myocardial contractures and oxygenized solution-induced reperfusion brings about greater myocardial damages. *Key words:* clinical death, resuscitation, myocardial contractility and metabolism, hypoxia.

Изучение природы постреанимационных повреждений сердца и механизмов дисрегуляции сердечно-сосудистой системы по праву относят к фундаментальным проблемам патофизиологии терминальных состояний [1], поскольку недостаточность кровообращения, возникающая в раннем восстановительном периоде после оживления, во многом определяет неблагоприятный исход реанимации [2]. Многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что первые минуты после возобновления сердечных сокращений, независимо от вида животного и модели терминального состояния, характеризуются выраженной гиперфункцией сердечно-сосудистой системы, а изменения комплексных показателей свидетельствуют о развитии гипердинамического синдрома [2, 3, 4]. Однако спустя 15–30 мин гипердинамика сменяется снижением сердечного выброса, уменьшением артериального давления с развитием недостаточности кровообращения, что обусловлено нарушением биоэнергетики и реологических свойств крови, уменьшением объема циркулирующей крови, метаболическим ацидо-

зом, активацией свободнорадикальных процессов, эндотоксемией. Немаловажную роль в формировании сердечной недостаточности и развитии недостаточности кровообращения играет вторичная гипоксия смешанного типа, наблюдаемая через 30–90 мин после оживления [3]. В условиях гипоксии дыхательная цепь митохондрий кардиомиоцитов начинает генерировать активные формы кислорода [5]. Кроме того, гипоксия и последующая реоксигенация во время реанимации могут индуцировать апоптоз кардиомиоцитов [6, 7], усугубляя тем самым сердечную недостаточность в постреанимационном периоде. Целью настоящего исследования явилась оценка чувствительности сердец животных, перенесших клиническую смерть, к искусственно вызываемой гипоксии, как одному из патогенетических факторов постреанимационной болезни.

Материалы и методы

Опыты выполнены на беспородных крысах-самцах массой 180–220 г, наркотизированных нембуталом (25 мг/кг внутривенно). 26 животных составили контроль (К), 39 перенес-

Влияние острой смертельной кровопотери на сократительную функцию левого желудочка крыс ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (n=14)	Опыт (n=22)
ДЛЖ _{сист} , мм рт. ст.	84±2,9	50±3,5***
ДЛЖ _{диаст} , мм рт. ст.	4,3±0,4	4,9±0,5
Скорость сокращения, мм рт. ст./с	1341±87	798±75***
Скорость расслабления, мм рт. ст./с	807±47	372±32***

Примечание. *** — $p < 0,001$ по отношению к контролю.

ли клиническую смерть от острой кровопотери (О). 4-минутную клиническую смерть вызывали острым кровопусканием через левую сонную артерию, а оживление осуществляли центрипетальным нагнетанием выпущенной крови и искусственной вентиляцией легких. Через 6 и 24 часа после оживления, когда отмечалась выраженная постреанимационная недостаточность кровообращения [2], извлекали сердца для изучения их сократительной функции [8] и метаболизма. Сердца помещали в охлажденный (до 2–4 °С) раствор Кребса-Хензеляйта, удаляли правое предсердие, создавая атриовентрикулярный блок, в полость левого желудочка вводили латексный баллончик постоянного объема, сжимая который, желудочек осуществлял изовольюметрические сокращения с частотой 120 мин⁻¹, навязываемой универсальным электростимулятором ЭСУ-2. Перфузию сердец осуществляли тем же самым раствором, насыщенным карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂), под давлением 70 мм рт. ст. при 37 °С. Систолическое и диастолическое давление в левом желудочке (ДЛЖ_{сист} и ДЛЖ_{диаст}) измеряли электроманометром ВМТ (Германия) и регистрировали их вместе с первыми производными (dp/dt) на приборе НЗ38-4П. Через 30 мин, необходимых для стабилизации работы сердца, регистрировали сократительную функцию сердца и одновременно брали пробы перфузата, прошедшего через коронарное русло, в котором определяли содержание глюкозы, лактата, пирувата, активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), креатинфосфокиназы (КФК) и кислой РНКазы ранее использованными методами [9]. Затем рассчитывали выход ферментов за 1 час на 1 кг сухой массы миокарда, а также потребление глюкозы и выделение лактата и пирувата 1 кг влажной массы миокарда на 1 мм рт. ст. развиваемого давления. Сердце для биохимических исследований забирали металлическими щипцами, охлажденными в жидком азоте, и определяли в нем содержание креатинфосфата (КФ), АТФ, АДФ, АМФ, неорганического фосфора (Ф_н), рассчитывая энергетический потенциал и потенциал фосфорилирования, гликогена, лактата и пирувата, гидроперекисей липидов и оснований Шиффа, неэстерифицированных жирных кислот (НЖК), антиокислительную активность липидов (АОА), а в постмитохондриальной фракции миокарда — активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР) ранее использованными методами [10]. Результаты обработаны статистически [11].

Результаты и обсуждение

Из табл. 1 следует, что перфузия сердец животных контрольной серии оксигенированным раствором Кребса-Хензеляйта в течение 30 мин устраняла повреждения, вызванные гипоксией препаровки и подготовки изолированного сердца к перфузии, и восстанавливала систолическое давление, скорости сокращения и расслабления до значений, приводимых в литературе [12]. Перфузия сердец, взятых через 6 ч после оживления, выявила депрессию сократительной функции, причем в большей степени оказались нарушенными процессы расслабле-

ния: систолическое давление и скорость сокращения уменьшились в 1,68 и в 2,16 раза, соответственно.

Клиническая смерть и реанимация повышали чувствительность сердец оживленных животных к гипоксии. Особенно отчетливо это проявилось в опытах с 20-минутной гипоксической перфузией сердец (взятых через 6 ч после оживления) раствором Кребса-Хензеляйта, рO₂ которого был снижен с 600 до 150 мм рт. ст. и в нем не содержалась глюкоза.

С началом гипоксической перфузии развиваемое давление уменьшалось в обеих сериях экспериментов. В частности, в контрольной серии в первую минуту наблюдалось снижение развиваемого давления, но без увеличения диастолического, т. е. без явлений контрактурных сокращений. Со 2–3-й мин диастолическое давление начинало постепенно возрастать и через 20 мин достигало 45,4±3,2 мм рт. ст., свидетельствуя о постепенном развитии гипоксической контрактуры.

Для изолированных сердец оживленных крыс повреждающий эффект гипоксии оказался более глубоким: контрактуры, развиваясь с первых минут гипоксической перфузии, обуславливали повышение диастолического давления до 61,8±3,1 мм рт. ст. Таким образом, клиническая смерть и последующее оживление снижают резистентность сердца, в частности, резистентность Санасоса сарколеммы и саркоплазматического ретикула, к гипоксии (рис. 1).

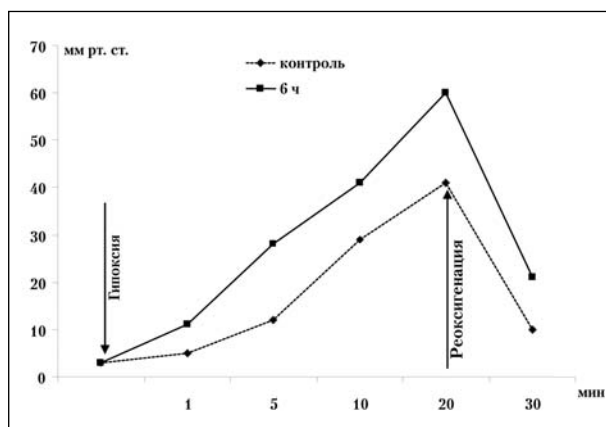


Рис. 1. Динамика диастолического давления в левом желудочке контрольных и оживленных крыс при гипоксии и реоксигенации.

Влияние гипоксии на потребление глюкозы и выход ферментов в коронарный проток из изолированных сердец крыс через 6 ч после оживления ($M \pm m$)

Показатель	Серия опытов	Значения показателей на этапах эксперимента		
		До гипоксии	20 мин гипоксии	5 мин реоксигенации
Глюкоза мкмоль/(кг·мин)	К (n=14)	83,3±6,6	—	104,0±10,7
	О (n=22)	227±14,6***	—	297,3±18,8***
Лактат, мкмоль/(кг·мин)	К	39,5±2,4	68,5±4,9	53,8±4,7
	О	58,5±4,6***	105,0±9,8*	94,5±6,2**
Пируват, мкмоль/(кг·мин)	К	4,8±0,4	7,8±0,6	8,1±0,7
	О	22,0±1,1***	38,9±2,1***	49,3±2,2***
КФК, ммоль/(кг·ч)	К	0,86±0,07	1,23±0,11	2,82±0,31
	О	1,57±0,11***	2,24±0,32**	5,03±0,62**
ЛДГ, ммоль/(кг·ч)	К	5,9±0,42	8,4±0,76	12,4±1,37
	О	10,4±1,10**	14,9±1,22***	27,5±2,30***
АСТ, ммоль/(кг·ч)	К	10,7±0,88	15,3±0,96	24,6±2,27
	О	14,9±3,06***	21,5±1,81*	38,8±2,90***
РНКаза, 10 ³ ед./ (кг·ч)	К	561±52	802±94	958±108
	О	846±87**	1303±98**	1890±154***

Примечание. К — сердца контрольных; О — сердца оживленных крыс. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ в сравнении с контролем.

Восстановление сократимости миокарда после устранения гипоксии происходило по-разному. В контроле отмечалось постепенное и далеко неполное восстановление сократительной функции: через 30 мин реоксигенации развиваемое давление достигало 48% исходного уровня, скорости сокращения и расслабления — 40–45%. Диастолическое давление превышало начальный уровень в 2,7 раза, что свидетельствовало о сохранении остаточных явлений гипоксической контрактуры миокарда.

30-минутная реперфузия и реоксигенация сердец животных, взятых в опыт через 6 ч после оживления, мало способствовали восстановлению сократительной функции миокарда: по-прежнему, сохранялось высокое диастолическое напряжение миокарда и стабильно низкое развиваемое давление.

В табл. 2 представлены данные о нарушении углеводного обмена в изолированных сердцах оживленных животных и выделении ими ферментов в коронарный проток. Видно, что сердца, взятые через 6 ч после клинической смерти, затрачивали глюкозы на 1 мм рт. ст. развиваемого давления в 2,75 раза больше, выделяя при этом лактата в 1,48 раза, а пирувата — в 4,58 раза больше, чем в контроле. 20-минутная гипоксическая перфузия (без глюкозы в растворе Кребса-Хензелейта) еще больше увеличивала выделение лактата и пирувата в коронарный проток.

Реоксигенация после гипоксической пробы закономерно увеличивала на 24,8% потребление глюкозы сердцами контрольных животных на единицу выполняемой функции, повышая при этом на 36,3% выделение лактата и на 68,7% пирувата в коронарный проток. Сердца животных, перенесших клиническую смерть и последующее оживление, оказались более чувствительными к

реоксигенационному повреждению. Они затрачивали глюкозы на 1 мм рт. ст. развиваемого давления в 2,85 раза больше чем в контроле и в 1,31 раза больше, чем до гипоксической перфузии. Выделение лактата возросло в 1,75 раза в сравнении с контролем и в 1,61 раза — с исходным уровнем. Более значительным оказался выход пирувата: в 6,08 раза по сравнению с контролем и в 2,24 раза по сравнению с исходным (до гипоксической пробы) уровнем.

В этих же исследованиях определяли выход ферментов из кардиомиоцитов в коронарный проток до гипоксии, в конце гипоксической пробы и во время реоксигенации. Как видно из табл. 2, до гипоксической перфузии сердца контрольных животных выделяли количество ферментов различной ультраструктурной локализации, сопоставимое с литературными данными [12], а к концу гипоксической пробы отмечалось увеличение утечки ферментов из миокарда в коронарный проток в среднем на 30–35%. Однако, повреждающий эффект реоксигенации оказался еще более значительным.

Выход ферментов из кардиомиоцитов оживленных крыс не отличался от контроля, но абсолютные величины на всех этапах эксперимента (до гипоксии, в конце гипоксической пробы и, особенно, во время реперфузии и реоксигенации) оказались увеличенными в 2 раза и более. Таким образом, клиническая смерть и последующее оживление потенцирует гипоксические повреждения миокарда (по данным об утечке ферментов в коронарный проток) и задерживает постгипоксическое восстановление сократительной функции миокарда.

Материалы, содержащиеся в табл. 3, позволяют понять механизмы постреанимационной кардиодепрессии и оценить значимость гипоксии,

Влияние клинической смерти на энергетический обмен и процессы перекисного окисления липидов в миокарде в постреанимационном периоде ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (n=12)	Опыт (n=17)
КФ, мкмоль/г	6,72±0,41	6,29±0,43
АТФ, мкмоль/г	2,190±0,102	1,48±0,064***
АДФ, мкмоль/г	0,484±0,026	1,431±0,074***
АМФ, ммоль/кг	0,148±0,009	0,439±0,037***
Энергетический потенциал	0,862±0,023	0,651±0,023***
Фн, мкмоль/г	5,52±0,28	8,65±0,65***
Потенциал фосфорилирования	1,22±0,051	9,69±0,70***
Гликоген, мг %	535±28	440±25*
Лактат, мкмоль/г	2,26±0,14	3,92±0,43***
Пируват, мкмоль/г	0,32±0,03	1,26±0,15***
ГП, мкмоль/г	1,56±0,061	3,69±0,240***
ОШ, 10 ³ ед./г	3,43±0,18	6,49±0,39***
АОА, мк-экв/г	11,10±0,66	5,51±0,39***
НЖК, мк-экв/г	0,36±0,023	0,55±0,042***
СОД, 10 ³ ед./г·мин	3,41±0,21	3,13±0,18
Каталаза, 10 ³ ед./г·мин	86,0±6,08	70,5±6,41
ГП, мкмоль/г·мин	7,18±0,49	5,12±0,42**
ГР, мкмоль/г·мин	4,94±0,32	2,66±0,22***

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

как одного из важнейших патогенетических факторов постреанимационной недостаточности сердца. Из таблицы следует, что в раннем постреанимационном периоде усилен катаболизм адениловых нуклеотидов: содержание АТФ в сердечной мышце уменьшается в 1,47 раза, а АДФ и АМФ возрастает в 2,95 раза по сравнению с контролем, что, в конечном итоге, приводит к уменьшению на 32% энергетического потенциала. Распад нуклеотидов сопровождается накоплением неорганического фосфора и 8-кратным увеличением потенциала фосфорилирования. Возросший потенциал фосфорилирования ускоряет сопряженный с фосфорилированием процесс транспорта электронов в дыхательной цепи и активирует дыхание митохондрий путем увеличения притока НАД·Н₂ в дыхательную цепь и активирует гликогенолиз и гликолиз [12]. Следствием такой активации, как видно из табл. 3, является, с одной стороны, повышенный распад гликогена, что сопровождается образованием АТФ в гликолитическом фосфорилировании, а с другой — накопление в сердечной мышце лактата и пирувата в концентрациях, превышающих контрольный уровень, соответственно, в 1,73 и 3,93 раза вследствие того, что они не успевают быстро утилизироваться митохондриями.

Кроме того, увеличение потенциала фосфорилирования смещает креатинкиназную реакцию в сторону образования АТФ. Значительная часть КФ передает свою макроэргическую фосфатную группу АДФ, и образуется некоторое дополнительное количество АТФ, но при этом появляется тенденция к снижению концентрации КФ. Таким образом, гликолиз и креатинкиназная реакции представляют собой резервные процессы, мобилизуемые в постреанимационном периоде для обра-

зования дополнительного количества АТФ, но энергетический потенциал клетки по-прежнему остается низким. Не исключено, что эти изменения в энергетическом обмене миокарда являются следствием рециркуляции, «кислородного парадокса» и чрезмерной активации процессов липопероксидации, характерных для раннего постреанимационного периода [3, 4].

Сердечной мышце контрольных животных присущ низкий, но вполне определенный уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), о чем можно судить по содержанию гидроперекисей липидов и оснований Шиффа. Факторами, сдерживающими процессы ПОЛ в сердечной мышце, являются достаточно высокая активность антиоксидантных ферментов и наличие биоантиоксидантов, определяющих уровень антиокислительной активности (АОА) липидов. У животных, перенесших клиническую смерть и реанимацию, уровень гидроперекисей липидов возрастает в 2,36 раза, оснований Шиффа — в 1,89 раза.

Прекращение кровообращения и оксигенации организма и сердца, в частности во время клинической смерти, выключает дыхательную цепь митохондрий. Это приводит к восстановлению НАД в НАД·Н, высвобождению ферритина и Fe²⁺ из мембран и попаданию их в цитозоль, а также неполному восстановлению растворенного в липидном матриксе мембран кардиомиоцитов молекулярного кислорода, что сопряжено с образованием активных форм кислорода. Последние реагируют с НЖК фосфолипидов мембран, образуя перекисные соединения. Появление перекисных группировок в углеродных цепочках НЖК, входящих в фосфолипиды мембран, приводит к нарушению и ослаблению гидрофобных связей в мембранах,

разрыхлению мембран, появлению в них гидрофильных «пор», к ингибированию мембрано локализованных липидзависимых ферментов [13, 14].

С началом рециркуляции и реоксигенации организма количество кислорода, растворенного в липидном матриксе митохондрий миокарда, резко увеличивается и повышается вероятность реакции молекулярного кислорода с восстановленными переносчиками дыхательной цепи [15]. В итоге происходит еще большее усиление образования свободных радикалов с дальнейшим вовлечением фосфолипидов мембран в цепные свободнорадикальные реакции, продолжают усиленно расходоваться антиоксиданты (АОА липидов снижается в 2 раза). Активность заблокированных во время клинической смерти антиоксидантных ферментов [2], особенно глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, остается пониженной в сравнении с контролем.

Токсическое действие продуктов ПОЛ заключается в их способности инактивировать SH-группы белков, разобщать и подавлять окислительное фосфорилирование, вызывать деформацию, набухание, слипание и даже полное разрушение митохондрий [16, 17], что нарушает энергетическое обеспечение сократительной функции миокарда и повышает его чувствительность к гипоксии.

Заключение

Таким образом, в раннем постреанимационном периоде отмечается снижение сократимости миокарда и повышение его чувствительности к

гипоксии. Одновременно отмечается повышенный выход ферментов в коронарный проток, отражая степень деструкции мембран кардиомиоцитов. Повреждение мембран продуктами липопероксидации нарушает функционирование мембрано локализованных ферментов, в том числе ферментов цикла Кребса и транспортных АТФаз, составляющих основу мембранных ионных насосов. Это подтверждается снижением эффективности использования глюкозы изолированными сердцами на единицу выполняемой функции и многократным увеличением выхода пирувата, особенно при гипоксической перфузии, в коронарный проток. В обычных условиях пируват, образующийся в результате гликолиза, подвергается декарбоксилированию с образованием ацетилкоэнзима А, который включается в цикл Кребса, полностью протекающий в митохондриях, а частично пируват при участии ЛДГ и НАД•Н₂ превращается в лактат. Наши результаты дают основание для предположения о том, что в результате клинической смерти и реанимации и реоксигенации повреждаются митохондрии, о чем свидетельствует освобождение сердцем в перфузат больших количеств пирувата, и, очевидно, имеется дефицит НАД•Н₂, поскольку затруднено превращение образующегося в избытке пирувата в лактат и выделение его в коронарный перфузат. Поврежденное сердце становится более чувствительным к гипоксии — одному из важнейших патогенетических факторов постреанимационной болезни.

Литература

1. *Неговский В. А., Мороз В. В.* Теоретические и клинические проблемы реаниматологии. Анестезиология и реаниматология 2000; 6: 4–6.
2. *Долгих В. Т.* Повреждение и защита сердца при острой смертельной кровопотере. Омск: Изд-во ОГМА; 2002.
3. *Неговский В. А., Гурвич А. М., Золотокрылина Е. С.* Постреанимационная болезнь. М.: Медицина; 1987.
4. *Корпачева О. В., Долгих В. Т.* Коррекция верапамилом постреанимационных повреждений сердца. Анестезиология и реаниматология 1996; 5: 48–51.
5. *Duranteau J., Chendel N. S., Kulis Z. et al.* Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. J. Biol. Chem. 1998; 273 (19): 11619–11624.
6. *Хитров Н. К., Пауков В. С.* Адаптация сердца к гипоксии. М.: Медицина; 1991.
7. *Yang Z., Steele D. S.* Effects of phosphocreatine on SR Ca²⁺ regulation in isolated saponin-permeabilized rat cardiac myocytes. J. Physiol. Proc. 1999; 521: 27–28.
8. *Fallen E. T., Elliot W. S., Gorlin R.* Apparatus for study of ventricular function and metabolism in the isolated rat. J. Appl. Physiol. 1967; 22 (4): 836–839.
9. *Долгих В. Т.* Предупреждение гутимином функционально-метаболических нарушений сердца при острой кровопотере. Патол. физиология и эксперим. терапия 1986; 3: 23–27.
10. *Долгих В. Т.* Предупреждение постреанимационных повреждений сердца гутимином. Анестезиология и реаниматология 1987; 1: 59–62.
11. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика; 1998.
12. *Меерсон Ф. З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М.: Медицина; 1984.
13. *Владимиров Ю. А.* Свободные радикалы в биологических системах. Соросовский образовательный журнал 2000; 6 (12): 12–19.
14. *Cotgreave I. A., Orrenius S.* Free radicals in the 20th century. Science 1999; 284 (5422): 1935–1936.
15. *Vergely C., Maupoil V., Benderitter M., Rochette L.* Influence of the severity of myocardial ischemia on the intensity of ascorbyl radical release and on postischemic recovery during reperfusion. Free Radic. Biol. and Med. 1998; 24 (3): 470–479.
16. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука; 1972.
17. *Sampson J. B., Beckman J. S.* Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu, Zn superoxide dismutase. Arch. Biochem. and Biophys. 2001; 392(1): 8–13.

Поступила 16.01.06