თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

ლეილა ნოზაძე

ჰიპოვოლემიის განვითარების ფარმაკოლოგიური ანალიზი ჰემორაგიული შოკის დროს

14.00.25 - ფარმაკოლოგია

მედიცინის მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი დისერტაციის

ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

თბილისი

2006

ნაშრომი შესრულებულია საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის სამედიცინო ბიოტექნოლოგიის სამეცნიერო კვლევითი ინსტიტუტის და თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის ექსპერიმენტული პათოფიზიოლოგიის განყოფილების და ეპრ ლაბორატორიის ბაზაზე

სამეცნიერო ხელმძღვანელები - თამარ სანიკიძე, ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი;

- თამარ კეზელი, მედიცინის მეცნიერებათა კანდიდატი.

ოფიციალური ოპონენტები: - ნიკო გონგაძე, მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი (14.00.25);

- სერგო ჯაიანი, მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი (14.00.27).

დისერტაციის დაცვა შედგება 2006 წლის ---------- -------- სთ-ზე თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტში სადისერტაციო საბჭოს m 14.16 N6 სხდომაზე (0177, თბილისი. ვაჟა-ფშაველას გამზ. №33)

დისერტაციის გაცნობა შესაძლებელია თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის ბიბლიოთეკაში (0160, თბილისი. ვაჟა-ფშაველას გამზ. №29)

ავტორეფერატი გაიგზავნა 2006 წლის ---------- ----------

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი,
მედიცინის მეცნიერებათა კანდიდატი,
დოცენტი - ნ. ბეჟიტაშვილი

Тбилисский государственный медицинский университет

На правах рукописи

Лейла Нозадзе

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ГИПОВОЛЕМИИ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ШОКЕ

14. 00. 25 – Фармакология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации, представленной на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук

Тбилиси
2006

Работа выполнена на базе НИИ медицинской биотехнологии АН Грузии и отделения экспериментальной патофизиологии и ЭПР лаборатории ТГМУ

Научные руководители: - **Саникидзе Тамара,** доктор биологичских наук, профессор;

- **Кезели Тамара,** кандидат медицинских наук.

Официальные оппоненты: - **Гонгадзе Нико,** доктор медицинских наук, профессор (14.00.25);

- **Джаиани Серго,** доктор медицинских наук, профессор (14.00.27).

Защита диссертации состоится _____ 2006 года _____ч., на заседании N6 m 14.16 диссертационного совета в Тбилисском государственном медицинском университете (0177, Тбилиси, пр. Важа-Пшавела N33).

Ознакомиться с диссертацией можно в библиотеке Тбилисского государственного медицинского университета (0160, Тбилиси, пр. Важа-Пшавела N29).

Автореферат разослан _____ _____2006 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент - Н.Бежиташвили

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

პრობლემის აქტუალობა. ჰიპოვოლემიური შოკის ზუსტი პათოფიზიოლოგიური მექანიზმების შესწავლა, მისი პროფილაქტიკა და მკურნალობა თანამედროვე მედიცინის ერთ-ერთი აქტუალური პრობლემაა. ჰემორაგიული შოკი ჰიპოვოლემიური შოკის ერთ-ერთი სახეა, რომლის დროსაც უხვი სისხლკარგვის (ჰემორაგიის) შედეგად მცირდება მოცირკულირე სისხლის მოცულობა, რაც საშუალო არტერიული წნევის დაქვეითებას, ვენური შევსების შემცირებას, გულის კუნთის შეკუმშვის ძალის დაქვეითებას და შოკის განვითარებას განაპირობებს. ჰიპოვოლემიური შოკისათვის დამახასიათებელია რეფლექსური ვაზოდილატაციით განპირობებული მწვავე ჰიპოტენზია (Landry D.W., Oliver J.A., 2001). ამგვარად, უხვი ჰემორაგიის საკვანძო რგოლი - მოცირკულირე სისხლის მასასა და სისხლძარღვების მოცულობას შორის შეუსაბამობაა.

ჰიპოვოლემიის განვითარებისას, სისხლის პლაზმაში კატექოლამინების შემცველობის მკვეთრ მომატებას და რენინ-ანგიოტენზიური სისტემის აქტივაციასთან ერთად, სისხლძარღვების გლუვი კუნთის რეაქციულობის მკვეთრ შემცირებას მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება; ეს უკანასკნელი, შესაძლოა, სისხლძარღვთა სხვადასხვა ტიპის უჯრედებში (მაგ., გლუვი კუნთის და ენდოთელურ უჯრედებში, ვაზოაქტიური ნივთიერებების სინთეზის დარღვევით იყოს განპირობებული (Scott J.A., et al., 1999, Goren M.Z., et al., 2001).

მექანიზმები, რომლებიც საფუძვლად უდევს ამ დარღვევებს, ბოლომდე შესწავლილი არ არის (Pieder D., et al., 1999).

მრავალი კვლევა მოწმობს იმის შესახებ, რომ ჰიპოვოლემიური შოკის დროს არტერიული წნევის რეგულაციაში აზოტის ჟანგს მნიშვნელოვანი როლი ეკისრება. ჰიპოვოლემიური შოკის დროს NO-ს ვაზოდილატაციური აქტივობა შემდეგი მექანიზმების საშუალებით ხორციელდება:

1. მიოზინის მსუბუქი ჯაჭვების ფოსფატაზას გააქტივებით, რის შედეგადაც ადგილი აქვს მიოზინის დეფოსფორილირებას, სისხლძარღვების გლუვი კუნთის მოდუნებას და ვაზოდილატაციის განვითარებას;
2. სისხლძარღვების გლუვი კუნთის პლაზმურ მემბრანაში კალიუმის არხების გააქტივებით, რაც არხების უშუალო ნიტროზილირების ან cGMP დამოკიდებული პროტეინკინაზას აქტივაციის მეშვეობით ხორციელდება.
3. ვაზოპრესინ-დამოკიდებული მექანიზმით, რომელიც უზრუნველყოფს როგორც სისხლძარღვების ტონუსის აღდგენას NO-ინდუცირებული cGMP-ის აქტივაციის დაქვეითების მეშვეობით, ასევე ვაზოდილატაციის გაძლიერებას ოქსიტოცინ-ენდოთელური რეცეპტორების მიერ ენდოთელური NO-სინთაზას აქტივაციის გზით.

მაშასადამე, როგორც ჩანს, NO მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ჰიპოვოლემიური შოკის პათოგენეზში და სამომავლოდ ის, შესაძლოა, ახალ თერაპიულ სამიზნესაც კი წარმოადგენდეს.

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ჰემორაგიული შოკის დროს არტერიული წნევის რეგულაციის მიზნით კალციუმის ბლოკატორებთან ერთად NO-ს სინთეზის მოდულატორების გამოყენება პერსპექტიულად გვესახება.

დასახული კვლევის **მიზანია** ჰემორაგიული შოკის დროს ჰიპოვოლემიის განვითარების ზოგიერთი

მოლეკულური მექანიზმის დადგენა მისი ფარმაკოლოგიური ანალიზის გზით.

კვლევის ძირითადი ამოცანები:

1. ექსპერიმენტული ჰემორაგიული შოკის საწყის ეტაპზე (უხვი სისხლკარგვიდან 15 წუთის შემდეგ):
   ა) ვაზოაქტიური ნივთიერებების, აზოტის ჟანგის (NO) და ენდოთელინის შემცველობის განსაზღვრა სისხლში;
   ბ) სისხლის რედოქს-აქტიური ნაერთების, სუპეროქ-სიდრადიკალების (O_2^-) და ლიპოპეროქსიდების (LOO^-) შემცველობის განსაზღვრა;
   გ) სისხლის პრო- და ანტიოქსიდანტურ სისტემათა აქტივობის განსაზღვრა;
   დ) ფილტვის არტერიაში Ca^{2+} იონების შემცველობის განსაზღვრა;
   ე) ღვიძლში NO-ს შემცველობის, მიტოქონდრიული და მიკროსომული ელექტრონული სატრანსპორტო ჯაჭვის შესწავლა;
   ვ) ღვიძლში მიკრომორფოსტრუქტურული ცვლილებების დადგენა.
2. ექსპერიმენტულ ჰემორაგიულ შოკზე სხვადასხვა პრეპარატის (კალციუმის ანტაგონისტების (იზოპტინის), NO-სინთეზის ბლოკატორების (L-NAME) და პლაფერონ ლბ-ს (პლბ)) წინასწარი ზემოქმედების ფონზე ზემოთ ჩამოთვლილი პარამეტრების ცვლილებათა გამოვლენა.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე

1. პირველად იქნა კომპლექსურად შესწავლილი ჰემორაგიული შოკით ინდუცირებული ჰიპოვოლემიის განვითარების მოლეკულური მექანიზმები. გამოვლენილია ჰემორაგიული შოკით

ინდუცირებული ჰიპოვოლემიის დროს NO-ს საკვანძო პათოგენეზური როლი სისხლძარღვების ტონუსის რეგულაციაში – კონსტრიქციულ და დილატაციურ მექანიზმებს შორის ბალანსის უზრუნველყოფისა და შენარჩუნების პროცესში.

2. ნაჩვენებია, რომ ჰემორაგიული შოკის დროს NO-დამოკიდებული რელაქსაციური მექანიზმების (მიოზინის მსუბუქი ჯაჭვების დეფოსფორილირება, მემბრანის ჰიპერპოლარიზაცია Ca^{2+}-დამოკიდებული K^{+}-ის არხების მონაწილეობით, უჯრედშიგა დეპოებიდან კალციუმის გამოთავისუფლების ინჰიბირება და სარკოპლაზმურ რეტიკულუმში მისი სეკვესტრაციის აქტივაცია) Ca^{2+}-დამოკიდებულ კოსტრიქციულ მექანიზმებზე პრევალირება არტერიული წნევის მკვეთრ დაქვეითებას განაპირობებს.

3. პირველად არის ნაჩვენები, რომ ჰემორაგიული შოკის დროს კალციუმის ანტაგონისტის – იზოპტინის არტერიულ წნევაზე მასტაბილიზებელ მოქმედებას საფუძვლად უდევს Ca^{2+}-ის შემცველობის შემცირებით განპირობებული ენდოთელური eNOS-ს აქტივობის დაქვეითება და სისხლძარღვების გლუვი კუნთის NO-დამოკიდებული დილატაციური მექანიზმების მოშლა.

4. პირველად არის დადგენილი, რომ ანტიოქსიდანტური ბუნების პრეპარატის, პლაფერონ ლბ-ს ზემოქმედებით ორგანიზმის რედოქს-ჰომეოსტაზისა და რედოქს-დამოკიდებული NO-ს სინთეზის ნორმალიზების პირობებში სისხლძარღვების ვაზოაქტივობის რეგულაციის მოწესრიგება და არტერიული წნევის სტაბილიზაცია ხდება.

დაცვაზე გამოტანილი ძირითადი დებულებები

1. ჰემორაგიული შოკით ინდუცირებული ჰიპოვოლემიის პათოგენეზში NO ასრულებს საკვანძო როლს სისხლძარღვების ტონუსის მარეგულირებელ კონსტრიქციულ და დილატაციურ მექანიზმებს შორის ბალანსის უზრუნველყოფასა და შენარჩუნებაში.
2. ჰემორაგიული შოკით ინდუცირებული ჰიპოვოლემიის დროს ორგანიზმის რედოქს-ჰომეოსტაზის და რედოქს-დამოკიდებული NO-ს სინთეზის ნორმალიზება სისხლძარღვების რეაქციულობის რეგულაციის აღდგენას უწყობს ხელს.

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება.

ჩატარებული კვლევის საფუძველზე დადგენილია ჰემორაგიული შოკით ინდუცირებული ჰიპოვოლემიის პათოგენეზში NO-ს და ჟანგვითი ჰომეოსტაზის მნიშვნელოვანი როლი. მიღებული შედეგების საფუძველზე, რეკომენდაციას ვუწევთ ანტიოქსიდანტური პრეპარატების ჩართვას ჰემორაგიული შოკის მკურნალობის სქემაში.

ნაშრომის აპრობაცია.

დისერტაციის ძირითადი დებულებები მოხსენებულია საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის სამედიცინო ბიოტექნოლოგიის ს/კ ინსტიტუტის ბიოტექნოლოგიისა და იმუნოლოგიის განყოფილებების გაერთიანებულ სხდომაზე.

პუბლიკაციები.

სადისერტაციო თემის ირგვლივ გამოქვეყნებულია 3 სამეცნიერო ნაშრომი, მათ შორის 2 საერთაშორისო მიმოქცევის ჟურნალებში.

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა.

სადისერტაციო ნაშრომი შეიცავს 100 ნაბეჭდ გვერდს. შედგება თავებისაგან: შესავალი, ლიტერატურის მიმოხილვა, კვლევის მასალა და მეთოდები, საკუთარი გამოკვლევები, მიღებული შედეგების განხილვა, დასკვნები და პრაქტიკული რეკომენდაციები. დისერტაცია ილუსტრირებულია 7 დიაგრამით, 4 ფოტოსურათით, 7 ცხრილით. გამოყენებული ლიტერატურის ნუსხა მოიცავს 210 წყაროს.

მასალა და მეთოდები

1. ჰემორაგიული შოკის მოდელირება

ექსპერიმენტები ჩატარებულია უჯიშო მამრობითი სქესის სქესობრივად მომწიფებულ თეთრ ვირთაგვებზე წონით 180-200 გ.

ჰემორაგიულ შოკს ვიწვევდით საძილე არტერიიდან უხვი სისხლკარგვით. სისხლის დანაკარგი სხეულის მასის 2-3%-ს შეადგენდა (არტერიული წნევის 60 mm Hg-მდე). შემდგომში 15 წუთის განმავლობაში ვაწარმოებდით დაკვირვებას არტერიული წნევის ცვლილებების დინამიკაზე ვერცხლისწყლის მონომეტრის საშუალებით, რომლის კანულა ფიქსირდებოდა ცხოველების საძილე არტერიაში.

ჰიპოვოლემიის განვითარების მექანიზმების დადგენის მიზნით ჩავატარეთ წნევის დინამიკის ფარმაკოლოგიური ანალიზი, რისთვისაც ჰემორაგიულ შოკს ვიწვევდით სხვადასხვა მოქმედების პრეპარატების ფონზე: კალციუმის ანტაგონისტის – იზოპტინის; NO-სინთაზას ინჰიბიტორის

– LNAME-ს (N^{ω}-L-arginine metylesther (SIGMA)) და ანტიოქსიდანტის – პლაფერონ ლბ-ის. გამოყენებული პრეპარატები შეგვყავდა ჰემორაგიული შოკის გამოწვევამდე 15 წუთით ადრე.

ცხოველები გაყოფილი იყო ოთხ ჯგუფად:

I. ჰემორაგიული შოკი;

II. იზოპტინი (დოზით 1,4 მგ/კგ) + ჰემორაგიული შოკი;

III. L-NAME (დოზით 0,5 მგ/კგ) (Molnar M., et al., 1994, Martinez-Orgado J., et al., 2003) + ჰემორაგიული შოკი;

IV. პლაფერონი ლბ (დოზით 8,0 მგ/კგ) + ჰემორაგიული შოკი.

საკონტროლო ჯგუფს შეადგენდნენ ინტაქტური ცხოველები.

ექსპერიმენტის ბოლოს (ჰემორაგიული შოკის გამოწვევიდან 15 წუთის შემდეგ) ცხოველები ექვემდებაებოდნენ ევთანაზიას ზოგადი ანესთეზიის პირობებში (ნატრიუმის ეთამონალი დოზით 40 მგ/კგ).

ვირთაგვების სისხლში ვიკვლევდით თავისუფალი NO-ს, სუპეროქსიდრადიკალების და ლიპოპეროქსიდების შემცველობას ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსის (ეპრ) სპექტროსკოპული და სპინ-ხაფანგების მეთოდით; ენდოთელინის შემცველობას იმუნოფერმენტული მეთოდით; ვირთაგვების ფილტვის არტერიაში Ca^{2+} იონების შემცველობას ვსაზღრავდით ალიანი ფოტომეტრიის მეთოდით. ვაწარმოებდით ღვიძლის ეპრ-სპექტროსკოპულ და ჰისტოლოგიურ კვლევას.

2. ლაბორატორული კვლევები.

ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსის (ეპრ) სპექტროსკოპული მეთოდი.

ეპრ კვლევები ტარდებოდა რადიოსპექტრომეტრზე РЭ-1307 (რუსეთი), რომელიც ოპერირებს ზემაღალი სიხშირის არეში 9.77 GHz მოდულაციის სიხშირით 50 kHz , თხევადი აზოტის (-196^{0}C) ტემპერატურაზე..

ვსწავლობდით სისხლის და ღვიძლის ეპრ სპექტრებს. სპექტრების რეგისტრაცია ტარდებოდა მოდულაციის ამპლიტუდაზე 0,6 mT და მიკროტალღოვანი გამოსხივების სიმძლავრეზე 100 mVt.

სისხლში და ღვიძლში თავისუფალი აზოტის ჟანგის განსაზღვრის მიზნით ვიყენებდით სპინ-ხაფანგს, ნატრიუმის დიეთილდითიოკარბამატი (DETC) (SIGMA). DETC (დოზით 500 მგ/კგ) და Fe^{2+}-ციტრატი (50 მგ$FeSO_{4+}$· $6H_2O$+ 250 მგ ნატრიუმის ციტრატი კგ-1) შეგვყავდა ინტრაპერიტონიალურად (Mikoyan V.D., et al., 1995). ცხოველებს ვკლავდით სპინხაფანგის შეყვანიდან 15 წუთის შემდეგ; NO-Fe^{2+}-$(DETC)_2$ კომპლექსების ეპრ სპექტრები ისაზღვრებოდა თხევადი აზოტის ტემპერატურაზე მიკროტალღოვან სიმძლავრეზე 20 mVt (Галаган М.Е., и др., 1997).

სისხლში პეროქსილრადიკალების ($LOO^{\cdot}$) განსაზღვრის მიზნით ვიყენებდით სპინხაფანგს α-ფენილ-*tert*ბუტილნიტრონ (PBN) (SIGMA), რომელიც შეგვყავდა ინტრაპერიტონიალურად (PBN-ის 150 мM/l-ზე Tris-ბუფერის 25мM/lkg (pH=7,4)) (Tabatabaie T., et al., 1997). ცხოველებს ვკლავდით სპინხაფანგის შეყვანიდან 15 წუთის შემდეგ. $LOO^{\cdot}$-ს ეპრ სპექტრებს ვსაზღვრავდით ოთახის ტემპერატურაზე მიკროტალღოვან სიმძლავრეზე 20 mВт.

სისხლში ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების (სუპეროქსიდრადიკალების) განსაზღვრის მიზნით ვიყენებდით სპინ-ხაფანგს 5,5 დიმეთილ-I-პიროლინ-IV-ოქსიდი (DMPO) (SIGMA). ვაწარმოებდით სისხლის ინკუბაციას DMPO-თან (დოზით 50 mM на 1 მლ სისხლზე) 3 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე (Kramer

H.J., et al., 1994, Xia Y., Zweer J.L., 1997). სუპეროქსიდრადიკალების ეპრ სპექტრებს ვსაზღრავდით ოთახის ტემპერატურაზე მიკროტალღოვან სიმძლავრეზე 20 mВт.

იმუნოფემენტული მეთოდი.

სისხლში ენდოთელინ-1-ის განსაზღვრას ვაწარმოებდით იმუნოფერმენტული მეთოდით კიტ-ნაკრების (Endothelin-1 Enzyme Immunoassay Kit, Cayman Chemical) გამოყენებით.

სპექტროფოტომეტრული მეთოდი.

სისხლის შრატში ანტიოქსიდანტური ფერმენტის, კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა

ანტიოქსიდანტურ ფერმენტ კატალაზას აქტივობას ვსაზღვრავდით Aebi-ის მეთოდით (1984), რომელიც მოდიფიცირებულ იქნა М. А. Королюк, Л. И. Иванова-ს და სხვების მიერ (1988) სპექტროფოტომეტრი СФ-46 ЛОМО-ს გამოყენებით.

მეთოდის პრინციპი დამყარებულია წყალბადის ზეჟანგის უნარზე მოლიბდენის მარილებთან წარმოქმნას მყარი შეფერილი კომპლექსი. 0.1 მლ სისხლის შრატს ვუმატებდით 2.0 მლ 0.03% H_2O_2-ის ხსნარს. ცრუ სინჯში შრატის ნაცვლად ვიღებდით 0.1 მლ დისტილირებულ წყალს. რეაქციას ვაჩერებდით 10 წთ-ის შემდეგ 1.0 მლ 4%-იანი ამონიუმის მოლიბდატით. წარმოქმნილი შეფერილობის ინტენსივობას ვსაზღვრავდით 410 ნმ ტალღის სიგრძეზე სპექტროფოტომეტრ СФ-46 ЛОМО-ზე საკონტროლო სინჯის მიმართ, რომელშიც H_2O_2-ის მაგივრად ვუმატებდით 2 მლ წყალს.

კატალაზას აქტივობას შრატში ვიკვლევდით შემდეგი ფორმულით:

$E=(A_{ცრუ}-A_{ცდა})V_1$(მკატ/ლ-ზე)t

სადაც E არის კატალაზის აქტივობა (მკატ/ლ-ზე), $A_{ცრუ}$ და $A_{ცდა}$ – ცრუ და ცდის სინჯის ექსტინქციები; V შეტანილი სინჯის რაოდენობა (0,1მლ), t-ინკუბაციის დრო (10წთ), k – H_20_2-ის მილიმოლარული ექსტინქციის კოეფიციენტი, $22,2*10^3$ მ $^{-1}$ სმ$^{-1}$.

სისხლის შრატში სუპეროქსიდდისმუტაზას (სოდ) აქტივობის განსაზღვრა.

სუპეროქსიდდისმუტაზას (სოდ) აქტივობას ვსაზღვრავდით რიედ-ის (1970) მეთოდით, რომელიც მოდიფიცირებული იყო E. B. Макаренко-ს მიერ (1988).

ერითროციტებს ვრეცხავდით ფიზიოლოგიურ ხსნარში. 0.5 მლ ერითროციტული მასის ჰემოლიზს ვახდენდით 0,5 მ ტრის- HCI-ით (pH=7,4). ჰემოგლობინის დალექვის მიზნით ჰემოლიზატს ვუმატებდით 0,25 მლ 96%-იან ეთანოლს და 0.15 მლ ქლოროფორმს; ვრეცხავდით 5წთ-ის განმავლობაში სიცივეზე და ვაცენტრიფუგებდით 10წთ 5000გ-ზე.

სოდ-ის განსაზღვრისათვის 0.02 მლ სუპერნატანტს ვუმატებდით საინკუბაციო არეს, რომელიც შეიცავდა 2,7 მლ ბუფერს (0,05M K_2HPO_4 და 0.1 mM EDTA-ს), 0.1 მლ 1.5 მ ნიტროლურჯ ტეტრაზოლს, 0.1 მლ - მეთილ-ფენაზონ-მეთილსულფატს და ვსაზღვრავდით ოპტიკურ სიმკვრივეს 540 ნმ ტალღის სიგრძეზე. შემდეგ სინჯს ვუმატებდით 0.1 მლ NADH-ს, ვტოვებდით 10 წთ სიბნელეში t=30^{0}C ტემპერატურაზე და ამის შემდეგ ისევ ვზომავდით ოპტიკურ სიმკვრივეს. რეაქციაზე ვმსჯელობდით შთანთქმას შორის მიღებული სხვაობით, აქტივობის ერთეულად ვიღებდით ნიტროლურჯი ტეტრაზოლის აღდგენის რეაქციის დამუხრუჭების 50%-ს.

ფერმენტის აქტივობას გამოვხატავდით 1 მლ ერითროციტებზე.

ალიანი ფოტომეტრიის მეთოდი.

ფილტვის არტერიის ქსოვილში Ca^{2+}კალციუმის იონების განსაზღვრის მიზნით ვაწარმოებდით არტერიის წინასწარ მინერალიზაციას. მინერალიზაციის პროდუქტს, მასით 100 მგ ვხსნიდით HNO_3-ში (1 მლ ქიმიურად სუფთა HNO_3 + 9 მლ დისცილირებული წყალი). იონიზირებულ ხსნარში კალციუმის იონების შემცველობას ვსაზღვრავდით ალიანი ფოტომეტრის (ფოტომეტრზე ПФМУ42) საშუალებით.

ჰისტოლოგიური კვლევები.

ექსპერიმენტული ცხოველების ღვიძლის ქსოვილი ფიქსირდებოდა 12%-ან ფორმალინში და ყალიბდებოდა ცელოიდინში. ანათლებს ვღებავდით ჰემატოქსილინ-ეოზინით.

სტატისტიკური დამუშავება.

მიღებული შედეგების სტატისტიკურ ანალიზს ვაწარმოებდით სტანდარტული სტატისტიკური მეთოდის გამოყენებით. სხვაობის სარწმუნო შეფასებას ვაწარმოებდით სტიუდენტის t კრიტერიუმის გამოყენებით.

საკუთარი კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

ჰიპოვოლემიური შოკი ჰემორაგიული შოკის ერთ-ერთი სახეა. უხვი სისხლკარგვის (ჰემორაგიის) შედეგად მოცირკულირე სისხლის მოცულობა მცირდება, რაც საშუალო არტერიული წნევის დაქვეითებას, ვენური შევსების შემცირებას, გულის კუნთის შეკუმშვის ძალის დაქვეითებას და შოკის განვითარებას განაპირობებს.

ჰემორაგიული შოკით ინდუცირებული ცირკულაციური ჰიპოტენზია მრავალი ფაქტორითაა განპირობებული. მათ შორის აღსანიშნავია არტერიების გლუვკუნთოვანი უჯრედების ჰიპომგრძნობელობა კონსტრიქციული სტიმულების მიმართ, ქსოვილების ჟანგბადით არასაკმარისი მომარაგება და ვაზოდილატაციური მოქმედების მქონე ფაქტორების გააქტივება. ამ ფაქტორებს შორის ურთიერთდამოკიდებულება და ურთიერთქმედება ბოლომდე არ არის დადგენილი. ჩვენი კვლევის მიზანია ჰემორაგიული შოკის დროს ჰიპოვოლემიის განვითარების ზოგიერთი მოლეკულური მექანიზმის დადგენა, რისთვისაც შევისწავლეთ ჰიპოვოლემიის მიმდინარეობა სხვადასხვა მოქმედების მექანიზმების მქონე პრეპარატების (კალციუმის ანტაგონისტების (იზოპტინის (ვერაპამილის)), NO-სინთაზას ბლოკატორის (LNAME) და ანტიოქსიდანტის (პლაფერონ ლბ-ს)) წინასწარი ზემოქმედების ფონზე.

ჩვენი კვლევის შედეგებით დადგინდა, რომ ჰემორაგიული შოკის (ა.წ. 60 mm Hg) განვითარებიდან 15 წუთის შემდეგ ვირთაგვების არტერიული წნევა (აწ) ქვეითდებოდა და აღწევდა 50 mm Hg-ს. იზოპტინის, L-NAME-ის და პლაფერონ ლბ-ის წინასწარი შეყვანის ფონზე 15 წუთის განმავლობაში ჰემორაგიული შოკის მდგომარეობაში მყოფი ვირთაგვების არტერიული წნევა იზრდებოდა დაახლოებით 33%-ით (ცხრილი 1).

ჰემორაგიული შოკის დროს ჰიპოვოლემიის განვითარების ერთ-ერთი მიზეზი - მოცირკულირე სისხლის მასას და სისხლძარღვების მოცულობას შორის შეუსაბამობაა. უხვი სისხლკარგვის (ჰემორაგიის) შედეგად მცირდება მოცირკულირე სისხლის მოცულობა, რაც არტერიული წნევის დაქვეითებას, ვენური შევსების შემცირებას, გულის კუნთის შეკუმშვის ძალის დაქვეითებას და შოკის განვითარებას განაპირობებს.

ჰემორაგიული შოკით ინდუცირებული ცირკულაციური ჰიპოტენზია მრავალი ფაქტორითაა განპირობებული. მათ შორის აღსანიშნავია არტერიების გლუვკუნთოვანი უჯრედების სტრუქტურების (α-ადრენორეცეპტორების) ჰიპომგრძნობელობა კონსტრიქციული სტიმულების მიმართ (Kai l., et al., 2004), ქსოვილების ჟანგბადით არასაკმარისი მომარაგება, და ვაზოდილატაციური მოქმედების მქონე ფაქტორების, აზოტის ჟანგის და TNF-α-ს, პროდუქციის გაძლიერება (Scott J.A., et al., 1999, Goren M.Z., et al., 2001).

ჩვენ დავინტერესდით, თუ როგორ იცვლება ჰიპოვოლემიური შოკის დროს (მის საწყის ეტაპებზე) სისხლში ანტაგონისტური მოქმედების მქონე ვაზოაქტიური ნაერთების (ვაზოდილატატორის, თავისუფალი აზოტის ჟანგის, და ვაზოკონსტრიქტორის, ენდოთელინის) შემცველობა. ჩვენი კვლევის შედეგად დადგენდა, რომ ჰემორაგიული შოკის განვითარებიდან 15 წუთის შემდეგ სისხლში მკვეთრად იზრდება (47%-ით) თავისუფალი აზოტის ჟანგის შემცველობა, პარალელურად ენდოთელინის რაოდენობის 18%-ით გაზრდით (ცხრილი 2).

ენდოთელინი – პოტენციური ხანგრძლივი მოქმედების ვაზოკონსტრიქტორია როგორც *in vitro,* ისე *in vivo* (Luscher T.F., et al., 1992, Kiowaski W.et al., 1991,. Luscher T.F., et al., 1990). შინაგან ორგანოებსა და კორონარულ არტერიებში ენდოთელინ-1-ის დაბალი და ზღურბლოვანი კონცენტრაციები (რომლებიც არ ავლენენ მნიშვნელოვან კონსტრიქციულ ეფექტს) სხვა ვაზოკონსტრიქტორების მოქმედების პოტენციირებას უზრუნველყოფს (Yang Z., et al., 1990, Dohi Y.,et al., 1992). გარდა ამისა, ენდოთელინს გააჩნია ენდოთელურ უჯრედებში რელაქსაციური ფაქტორების – პროსტაციკლინის და NO-ს გათავისუფლების აქტივაციის უნარი, რომელიც ხორციელდება მისი ET_B-

რეცეპტორებთან ურთიერთქმედებით (Arai H., et al., 1990, Sakurai T., et al., 1990). NO, თავის მხრივ, აინჰიბირებს ენდოთელინის სინთეზს (Boulanger C., Luscher T.F. 1990, 85, 587-590).

კომპენსაციური ჰემორაგიული შოკის დროს სისხლის მიმოქცევის ჰომეოსტაზის რეგულაციის მექანიზმები მიმართულია კარდიალური დებიტის და არტერიული წნევის ნორმალურ დონემდე აღდგენისკენ. არტერიული წნევის ჰომეოსტაზის რეგულაციის მექანიზმების მოშლის შემთხვევაში ადგილი აქვს შოკური მდგომარეობის პროგრესირებას. შოკის პროგრესირება სხვადასხვა ქსოვილში და სისტემაში ჰუმორული და მეტაბოლური (ვაზოაქტიური (ვაზოკონსტრიქტორების და ვაზოდილატატორების), მეტაბოლური, ენდოკრინული, ფერმენტული) ფაქტორების შენაცვლებითი აქტივაციის და დეპრესიის, მანკიერი ციკლების მთელი კომპლექსის ჩამოყალიბების შედეგს წარმოადგენს. უხვი სისხლკარგვის შედეგად არტერიული წნევის მკვეთრი შემცირება კორონარული ნაკადის დაქვეითებას, მიოკარდიუმის კუმშვადობის და კარდიალური დებიტის შემცირებას განაპირობებს. არტერიული წნევის და ქსოვილების პერფუზიის პროგრესული დაქვეითება და იშემიის განვითარება ვაზოდილატაციური აქტივობის მქონე ნაერთების აკუმულაციას და სისხლძარღვების რეზისტენტობის დაქვეითებას უწყობს ხელს. პერიფერიული სისხლძარღვების დილატაცია კაპილარების ჰიდროსტატიკური წნევის მომატებას განაპირობებს, რაც შემდგომში სითხის დაკარგვას და არტერიული წნევის ვარდნას უწყობს ხელს (Prasad K., Lee P., 2002).

ჰემორაგიული შოკის დროს აღიარებული ვაზოდილატატორის, NO-ს მკვეთრი მომატება ზემოთ აღწერილი ვაზოდილატაციური კომპენსაციური რეაქციის

შედეგს წარმოადგენს. ამ დროს ვაზოკონსტრიქციული აქტივობის მქონე ენდოთელინის გამოყოფის სუსტ გაძლიერებას (18%-ით) აქვს ადგილი, რაც შეიძლება განპირობებული იყოს აქტივირებული ენდოთელური უჯრედების მიერ მისი სინთეზის გაძლიერებით ან სისხლის პლაზმაში ენდოთელინის კლირენსის დაქვეითებით (Voerman et al., 1992, Mitaka et al., 1998, Avontuur et al., 1999). ითვლება, რომ, ექსტრემალურ პირობებში NO-ს და ენდოთელინის რეცეპტორებს შორის ურთიერთდამოკიდებულების მექანიზმები განსხვავდება ამ ვაზოაქტიურ ნაერთებს შორის ფიზიოლოგიურ პირობებში ბალანსის დამყარების მექანიზმისაგან (Wiley K. E., Davenport A.P., 2001). ჰემორაგიული შოკის დროს ეს ბალანსი მიმართულია NO-ს დილატაციური მოქმედე-ბისკენ, რაც შეიძლება განპირობებული იყოს ჭარბი NO-ს მიერ ენდოთელინის რეცეპტორების ნიტროზილირებით (Wiley K. E., Davenport A.P., 2001). აღნიშნულის შედეგად არტერიული წნევა აგრძელებს კლებას, რაც ჩვენი კვლევის შედეგებით მტკიცდება.

Ca^{2+} - მნიშვნელოვანი მეორადი მესენჯერია, რომელიც გლუვი კუნთის კუმშვადობისა და სისხლძარღვების ტონუსის რეგულაციაში მონაწილეობს (Jian H., Stephens N.L., 1994, Sobol C.V., Nesterov V.P. 1997).

სისხლძარღვების გლუვი კუნთის კუმშვად აქტივობას მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება არტერიული წნევის რეგულაციის პროცესში. უჯრედებში კალციუმის დაგროვება ხორციელდება პოტენციალდამოკიდებული კალციუმის არხებით, აგრეთვე, სარკოპლაზმური რეტიკულუმიდან და მიტოქონდრიებიდან (უჯრედშიდა კალციუმის 90%-ზე მეტია ლოკალიზებული ამ ორგანელებში) გათავისუფლების გზით. სისხლძარღვების გლუვი კუნთის უჯრედებში კალციუმის ნაკადის გაძლიერება უჯრედშიდა თავისუფალი კალციუმის დონეს

მომატებას განაპირობებს. Ca^{2+} იონები კალმოდულინთან კომპლექსში იწვევენ მიოზინის მსუბუქი ჯაჭვების ფოსფორილირების მაინდუცირებელი კინაზას გააქტიურებას და სისხლძარღვების გლუვი კუნთის კონსტრიქციას უწყობენ ხელს.

ამის გარდა, Ca^{2+} იონები ააქტიურებენ ენდოთელური eNO-სინთაზას და ხელს უწყობენ NO-ს სინთეზის ინტენსიფიკაციას. აქვე აღსანიშნავია, რომ ენდოთელურ უჯრედებში უჯრედშიდა კალციუმის მომატება ასოცირებს ენდოთელინ-1-ის პროდუქციის გაძლიერებასთან (Boulanger C., Lucher T.F. 1990). ანუ, Ca^{2+} იონები სისხლძარღვებში ორმაგ როლს ასრულებენ – მონაწილეობენ გლუვი კუნთის კონსტრიქციის მექანიზმებში და უზრუნველყოფენ ვაზოდილატატორის NO-ს სინთეზის ინტენსიფიკაციას.

ჩვენი კვლევების შედეგად დადგინდა, რომ ჰემორაგიული შოკის დროს ვირთაგვების ფილტვის არტერიის პრეპარატში Ca^{2+} იონების შემცველობა საკონტროლო მაჩვენებლებთან შედარებით 2-ჯერ იზრდებოდა (ცხრილი 2).

ცნობილია, რომ მწვავე ჰემორაგიული შოკის დროს სისხლძარღვების გლუვი კუნთის უჯრედებში იზრდება Ca^{2+}- და ATP-დამოკიდებული K^{+}-არხების განვლადობა (Kai., et al., 2001, Szabo C., Salzman A.L., 1996). K^{+}-არხების აქტივაცია მემბრანული პოტენციალის სტაბილიზაციას უზრუნველყოფს, რაც უჯრედის აგზნებადობას და Ca^{2+}-ის ნაკადის შემცირებას უწყობს ხელს (Kai L., et al., 1997). მაშასადამე, მწვავე ჰემორაგიული შოკის დროს განვითარებული ჰიპოქსია/იშემიის პირობებში ვირთაგვების ფილტვის არტერიაში Ca^{2+}-ის იონების შემცველობის მომატება ძირითადად ამ იონების უჯრედშიდა დეპოებიდან (მიტოქონდრიებიდან და სარკოპლაზმური რეტიკულუმიდან) გათავისუფლებით

უნდა იყოს განპირობებული. კალციუმის ჭარბი დაგროვება ენდოთელური eNOS აქტივაციას და NO-ს გაძლიერებულ წარმოქმნას უზრუნველყოფს. ამ დროს სისხლში NO-ს შემცველობა საკონტროლო მაჩვენებლებთან შედარებით 58%-ით იზრდებოდა. NO cGMP-დამოკიდებული მექანიზმით მიოზინ-დეფოსფატაზას გამააქტივებელ კინაზას ააქტივებს და ამ გზით სისხლძარღვების გლუვი კუნთის კონსტრიქციას უშლის ხელს (Landry D.W., Oliver J.A., 2001).

არსებობს მრავალი ჰიპოთეზა NO-ს გლუვი კუნთის ტონუსის რეგულაციის მექანიზმებში მონაწილეობის შესახებ (Karaki H., et al., 1997). ითვლება, რომ NO მონაწილეობს cGMP- და Ca^{2+}-დამოკიდებული K^{+}-ის არხების აქტივაციაში და მემბრანის ჰიპერპოლარი-ზაციაში, რაც თავის მხრივ, L-არხების საშუალებით კალციუმის უჯრედში შესვლას უშლის ხელს. არ არის გამორიცხული, აგრეთვე, K^{+}-ის არხების პირდაპირი ნიტროზილირება (Landry D.W., et al., 2001). ცნობილია, რომ აზოტის ჟანგი აჩქარებს სარკოპლაზმურ რეტიკულუმში კალციუმის იონების სეკვესტრაციას Ca^{2+}-ის ტუმბოს გააქტივებით (Cohen R.A., et al., 1999). ითვლება, აგრეთვე, რომ NO ხელს უწყობს სისხლძარღვების გლუვი კუნთის უჯრედებში Ca^{2+} დონის დაქვეითებას ამ იონების უჯრედული დეპოებიდან გათავისუფლების ინჰიბიციის საშუალებით (Hirata M., et al., 1990).

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ვვარაუდობთ, რომ ჰემორაგიული შოკის დროს (განვითარებიდან 15 წუთის შემდეგ) ენდოთელიუმის უჯრედებში ჭარბად წარმოქმნილი NO სისხლძარღვების გლუვი კუნთის უჯრედებში კალციუმის L-არხების განვლადობას აინჰიბირებს (Ca^{2+}-დამოკიდებული K^{+}-ის არხების ნიტროზილირების ან cGMP-დამოკიდებული აქტივაციის გზით), სარკოპლაზმური რეტიკულუმის Ca^{2+}-ის ტუმბოს

გააქტივებას და კალციუმის იონების უჯრედულ დეპოებში დაგროვებას უზრუნველყოფს და ამ გზით თავისუფალი Ca^{2+}-იონების შემცველობის შემცირებასა და სისხლძარღვების ტონუსის დაქვეითებას უწყობს ხელს.

ჩვენი საკუთარი შედეგების და ლიტერატურის მონაცემების ანალიზის საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ექსპერიმენტული ჰემორაგიული შოკის დროს სისხლძარღვების ენდოთელურ უჯრედებში ჰიპოქსია/იშემიის პირობებში ადგილი აქვს Ca^{2+} იონების დაგროვებას, კალციუმდამოკიდებული eNOS გააქტიურებას და ჭარბი NO-ს წარმოქმნას. ჭარბი NO-ს დაგროვების პირობებში NO-დამოკიდებული რელაქსაციის მექანიზმები (მიოზინის მსუბუქი ჯაჭვების დეფოსფორილირება, მემბრანის ჰიპერპოლარიზაცია Ca^{2+}-დამოკიდებული K^{+}-ის არხების მონაწილეობით, უჯრედშიდა დეპოებიდან კალციუმის გათავისუფლების ინჰიბიცია და მისი სარკო-პლაზმურ რეტიკულუმში სეკვესტრაციის ინტენსიფიკაცია) პრევალირებს Ca^{2+}-დამოკიდებული კონსტრიქციის პროცესებზე, რაც არტერიული წნევის მკვეთრ დაქვეითებას განაპირობებს. NO-დამოკიდებული ვაზოდილატაციის განვითარებას სისხლძარღვების კონსტრიქციული ენდოთელური ET_A-რეცეპტორების ნიტროზილირებას უწყობს ხელს.

ჩვენი ჰიპოთეზის შემოწმების მიზნით, ჰემორაგიული შოკის დროს გამოვიყენეთ კალციუმის ანტაგონისტი, იზოპტინი. ჩვენს ექსპერიმენტებში იზოპტინის ფონზე განვითარებული ჰემორაგიული შოკის დროს არტერიული წნევის მომატებასთან ერთად ვირთაგვების სისხლში თავისუფალი NO-ს შემცველობა საკონტროლო მაჩვენებლების დონემდე დაქვეითდა, შემცირდა აგრეთვე კალციუმის შემცველობა ფილტვის არტერიის ქსოვილში (ცხრილი 2).

კალციუმის ანტაგონისტი, იზოპტინი ეფექტურად აბლოკირებს პოტენციალ-დამოკიდებული კალციუმის ნელ არხებს (L ტიპი) და ამ გზით ხელს უშლის უჯრედში კალციუმის იონების შესვლას და სისხლძარღვების გლუვი კუნთის კონსტრიქციას. დადგენილია, რომ იზოპტინი, ხელს უშლის, აგრეთვე, კალციუმის დაგროვებას ენდოთელურ უჯრედებში (Iozahen L., Devinck M.A., 1995) და eNOS მიერ NO-ს ჭარბ წარმოქმნას უზრუნველყოფს, რაც მისი დილატაციური აქტივობის დაქვეითებას განაპირობებს (Lantoine. F., et al., 1998).

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ჰემორაგიული შოკის დროს კალციუმის ანტაგონისტის ჩვენს მიერ გამოვლენილი ჰიპერტენზიული მოქმედება წარმოადგენს ორი საწინააღმდეგოდ მიმართული პროცესის, ვაზოდილატაციის და ვაზოკონსტრიქციის შეჯამების შედეგს. შესაბამისად, არტერიული წნევის იზოპტინით განპირობებული ცვლილებები დამოკიდებულია სისხლძარღვების ტონუსის მარეგულირებელ კონსტრიქციულ და დილატაციურ მექანიზმებს შორის ბალანსზე. სხვადასხვა ავტორის აზრით (Ruschitzka F.T., e al., 1999), კალციუმის ანტაგონისტების ზემოქმედების საპასუხო არტერიული წნევის ცვლილებების ხასიათი ვაზოკონსტრიქციული და ვაზოდილატაციური მექანიზმების დისბალანსის საუკეთესო ინდიკატორს წარმოადგენს.

ჰემორაგიული შოკის დროს იზოპტინის პრევენციული ზემოქმედება სისხლძარღვების ენდოთელურ უჯრედებში კალციუმის დაგროვების ბლოკირებას, აზოტის ჟანგის კალციუმ-დამოკიდებული სინთეზის ინტენსიფიკაციის პრევენციას და NO-დამოკიდებული დილატაციური მექანიზმების მოშლას უზრუნველყოფს. ამ დროს ვლინდება ენდოთელინის

კონსტრიქციული აქტივობა. ჩვენი კვლევებით გამოვლინდა, რომ იზოპტინის პრევენციული მოქმედების ფონზე განვითარებული ჰემორაგიული შოკის დროს ენდოთელინის შემცველობა 18%-ით აღემეტებოდა საკონტროლო მაჩვენებლების დონეს (ცხრილი 2) და რჩებოდა ჰემორაგიული შოკისათვის დამახასიათებელ დონეზე. ჩვენი მონაცემები კორელირებენ ლიტერატურის მონაცემებთან იმის შესახებ, რომ უჯრედებში კალციუმის დაგროვების პრევენცია არ აინჰიბირებს ენდოთელინის გათავისუფლებას (Ruschitzka F.T., Noll G., Luscher T.F. 1999).

ენდოთელინი პოტენციალ-დამოკიდებული Ca^{2+}-არხების აქტივატორია (Yanagisawa M., 1988). კალციუმის ანტაგონისტების ზემოქმედების დროს ენდოთელინის ვაზოკონსტრიქციული ეფექტი არტერიის ტიპზეა დამოკიდებული: ზოგიერთ არტერიაში (ღორის აორტა, ადამიანის კორონალური არტერია) სისხლძარღვების გლუვი მუსკულატურის უჯრედების ენდოთელინის რეცეპტორი დაკავშირებულია პოტენციალ-დამოკიდებული Ca^{2+}-არხებთან G-პროტეინის საშუალებით (Goto K., et al., 1989, Godfraind T., 1989). ასეთ სისხლძარღვებში კალციუმის ანტაგონისტები ხელს უწყობენ ენდოთელინ-ინდუცირებული ვაზოკონსტრიქციის დაქვეითებას.

სხვა სისხლძარღვებში ენდოთელინ-ინდუცირებული კონსტრიქციული ეფექტები, ძირითადად, ხორციელდება Ca^{2+}-ის უჯრედშიდა დეპოებიდან გათავიუფლების გზით (ფოსფოლიპაზა C-ს აქტივაციის, ინოზიტოლ ტრიფოსფატის და გლიცეროლის წარმოქმნის შედეგად (Reink T.J., et al., 1988, Wallnofer A., Weir S., et al., 1989)). ასეთ სისხლძარღვებში Ca^{2+}-ანტაგონისტებს არ შეუძლიათ ენდოთელინ-ინდუცირებული კონსტრიქციის პრევენცია (Yang Z., et al., 1990).

შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ჰემორაგიული შოკის დროს იზოპტინის მიერ არტერიული წნევის

სტაბილიზაციას საფუძვლად უდევს NO-ს წარმოქმნის ინტენსივობის დაქვეითება და NO-დამოკიდებული დილატაციური მექანიზმების მოშლა. ეს კიდევ ერთხელ ადასტურებს ჩვენ მოსაზრებას ჰემორაგიული შოკის დროს ჰიპოვოლემიის განვითარების მექანიზმებში NO-ს მნიშვნელოვანი როლის შესახებ.

ჰემორაგიული შოკის განვითარებისას NO-სინთაზას ინჰიბიტორის, LNAME-ს, პრევენციული გამოყენების დროს არტერიული წნევის მომატებასთან ერთად მცირდება Ca^{2+}-იონების შემცველობა ფილტვის არტერიის პრეპარატში და ენდოთელინის შემცველობა სისხლში საკონტროლო მაჩვენებლების დონემდე, ხოლო თავისუფალი NO-ს ეპრ სიგნალი საერთოდ არ ვლინდება სისხლის ეპრ სპექტრში (ცხრილი 2), რაც სისხლში ამ ნაერთის ძალიან დაბალი შემცველობის შესახებ მეტყველებს. NO-სინთაზას ინჰიბიტორი, LNAME, სისხლძარღვების ენდოთელიუმში აზოტის ჟანგის წარმოქმნის დათრგუნვას უზრნველყოფს, რაც სისხლში მისი შემცველობის მკვეთრ შემცირებას განაპირობებს. შესაბამისად, გლუვი კუნთის უჯრედებში ადგილი აქვს NO-დილატაციური მექანიზმების მოშლას.

LNAME-ს წინასწარი ზემოქმედების ფონზე ჰემორაგიული შოკის განვითარების დროს ენდოთელინის და Ca^{2+}-იონების შემცველობის სტაბილობა კიდევ ერთხელ ადასტურებს ჩვენი ჰიპოთეზის სისწორეს ჰემორაგიული შოკით ინდუცირებული ჰიპოვოლემიის განვითარებაში NO-ს საკვანძო როლის შესახებ.

ჟანგბადის რეაქციულ ნაერთებს მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება მრავალი დაავადების პათოგენეზში. უდავოა, აგრეთვე, მისი როლი ჰემორაგიული შოკის დროს. მთელი რიგი ლიტერატურული მონაცემები მეტყველებენ ჰემორაგიული შოკის დროს ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების გაძლიერებული წარმოქმნის შესახებ (Prazad K., et al., 2002, Chambers D.E., et al., 1985, Van den Bosh H., 1980). ჟანგბადის

რეაქციული ნაერთები წარმოიქმნება ორგანიზმში უხვი სისხლკარგვის შემდეგ ქსოვილების ჟანგბადით არასაკმარისი მომარაგების და პროოქსიდანტური ფერმენტების (ქსანტინოქსიდაზას, უბიქინონების) გააქტივების (Chambers D.E., et al., 1985), არაქიდონის მჟავას (Van den Bosh H., 1980), კომპლემენტის სისტემის (Fruchterman T.M., et al., 1998), ციტოკინ-სტიმულირებული მაკროფაგების (Nathan C.F., et al.,1986), ლეიკოციტების (Berton G., et al., 1986), კატექოლამინების აუტოოქსიდაციის (Misra H.P., et al., 1972, Mullano K.M., 1989) აქტივაციის შედეგად. ჰემორაგიული შოკის დროს ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების გაძლიერებული წარმოქმნა ვლინდება ჩვენ ექსპერიმენტებში ვირთაგვების სისხლის ეპრ სპექტრში სუპეროქსიდრადიკალების და ლიპო-პეროქსიდების ინტენსიური ეპრ სიგნალის გამოჩენით (ცხრილი 3); ანტიოქსიდანტური ფერმენტების (სოდ, კატალაზა) აქტივობის დაქვეითებით და ღვიძლში ლიპოპეროქსიდრადიკალების ინტენსიური ეპრ სიგნალის მაღალი ინტენსივობით.

ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალები ზეგავლენას ახდენენ სხვადასხვა ქსოვილების ჰომეოსტაზზე, იწვევენ მათ დესტრუქციას. დადგენილია, რომ ჟანგბადის რეაქციული ნაერთები ვაზოაქტიურობით ხასიათდებიან; NO-ს მსგავსად მათ შეუძლიათ სისხლძარღვების გლუვი კუნთის ტონუსის რეგულაცია. ისინი მონაწილეობენ სარკოპლაზმური რეტიკულუმის Ca^{2+}-იონების ტუმბოს ინაქტივაციაში (Grover A.K., et al., 1988), ასტიმულირებენ IP_3-ინდუცირებული Ca^{2+}-იონების გათავისუფლებას გლუვი კუნთის ენდოპლაზმური რეტიკულუმიდან და, მაშასადამე, ვაზოკონსტრიქციის განვითარებას უწყობენ ხელს (Suzuki Y.J., Ford G.D. 1992). აღსანიშნავია, რომ თავისუფალი NO-ს სუპეროქსიდრადიკალებთან ურთიერთქმედებისა და პეროქსინიტრიტად

ტრანსფორმაციის უნარი ამ ნაერთის ვაზოდილატაციური აქტივობის შეზღუდვას უწყობს ხელს. მაშასადამე, ოქსიდრადიკალები, ისევე როგორც ენდოთელინი, კალციუმი და NO მონაწილეობენ სისხლძარღვების ტონუსის რეგულაციაში და ხასიათდებიან ვაზოკონსტრიქ-ციული მოქმედებით.

ამავე დროს ოქსიდაციური სტრესის პირობებში ადგილი აქვს ბირთვული ფაქტორის NFkB-ის აქტივაციასა და ინდუციბელური iNOS გაძლიერებულ ექსპრესიას, რომელიც წარმოქმნის NO-ს ნანომოლურ კონცენტრაციებში. ჭარბი NO კი მდგრადი ჰიპოვოლემიის განვითარებას უწყობს ხელს (Altavilla D., et al., 2001)..

ვაზოკონსტრიქციული და ვაზოდილატაციური ნივთიერებებისა და მექანიზმების რთული ურთიერთსაპირისპირო მოქმედება და მონაცვლეობა ჰემორაგიული შოკის პათოგენეზის სიმძიმესა და მკურნალობის დაბალ ეფექტურობას განაპირობებს.

ჰემორაგიული შოკის დროს შინაგანი ორგანოების არასაკმარისი პერფუზია ქსოვილების ოქსიდაციური დაზიანების მიზეზი ხდება. ამ დროს თვით დაზიანებული ქსოვილები გადაიქცევიან თავისუფალი ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების, ან მათი გენერატორის წყაროდ, რაც ორგანიზმში ოქსიდაციური სტრესის გაღრმავებას უწყობს ხელს.

ჩვენს მიერ გამოვლენილ იქნა ჰემორაგიული შოკის დროს ღვიძლის ქსოვილში მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის მუშაობის შეფერხება, რაც ღვიძლის ეპრ სპექტრში თავისუფალრადიკალური სიგნალების ნახევარგანის შემცირებით და სემიუბიქინონების მკვეთრი დაგროვებით ვლინდება. სემიუბიქინონები თავისუფალრადიკალური ჟანგვის მძლავრი პრომოტორები არიან. ისინი ხელს უწყობენ ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების გაძლიერებულ წარმოქმნას და ღვიძლის ქსოვილის ოქსიდაციურ

დაზიანებას, რაც ლიპოპეროქსიდული რადიკალების და Mn^{2+}-იონების დაგროვებით ვლინდება. ჰემორაგიული შოკის დროს ღვიძლის ქსოვილის დაზიანება ჩვენს მიერ გამოვლენილ იქნა ჰისტოლოგიური კვლევით. ჰემორაგიული შოკის დროს ღვიძლის ქსოვილში სლაჯის ფენომენი გამოვლინდა; ცენტრალური ვენები, ისევე, როგორც ინტერლობულური ვენები, გაფართოებული იყო და ერითროციტების დიდ რაოდენობას შეიცავდა. ადგილი ჰქონდა პერიპორტულ ლიმფოიდურ ინფილტრაციას. ღვიძლის უმეტეს ნაწილში წილების საერთო სტრუქტურა დარღვეული იყო. ღვიძლის წილებში მაღალი ეოზინოფილური პიკნოზური ბირთვის მქონე ჰეპატოციტების დიდი რაოდენობა გამოვლინდა, რაც უჯრედებში ნეკროზის განვითარებისთვისაა დამახასიათებელი. მორფოლოგიური ცვლილებები განსაკუთრებით ინტენსიური იყო პერიცენტრალურ ნაწილში, ცენტრალური ვენის ირგვლივ.

როგორც იზოპტინის, ასევე L-NAME-ს წინასწარი ზემოქმედების პირობებში მორფოლოგიური ცვლილებები ნაკლები ინტენსივობით ვლინდებოდა. იზოპტინის წინასწარი შეყვანის პირობებში ჰემორაგიული შოკის დროს განვითარებული სლაჯის ფენომენი არ გამოვლინდა. წილების არეში ადგილი ჰქონდა დეზორგანიზაციის უბნების ნორმალური სტრუქტურის მქონე უბნებით შენაცვლებას.

L-NAME-ს წინასწარი ზემოქმედების პირობებში სლაჯ-ფენომენი გამოვლინდა მხოლოდ რამდენიმე ცენტრალურ და ინტრალობურ ვენაში, ლიმფოიდური ინფილტრაცია საერთოდ არ ვლინდებოდა. დეზორგანიზაციის არე წილებში ჰემორაგიულ შოკთან შედარებით გაცილებით ნაკლები იყო. მაღალი ეოზინოფილური ციტოპლაზმის და პიკნოზური ბირთვის შემცველი ჰეპატოციტები ვლინდებოდა ნაკლები ინტენსივობით.

ჰემორაგიული შოკის პათოგენეზში ჟანგვითი სტრესის და NO-ს მნიშვნელოვანი როლის გათვალისწინებით, ჩვენ შევისწავლეთ პლაფერონ ლბ-ს ზემოქმედება ჰემორაგიული შოკის განვითარებაზე. პლაფერონ ლბ, როგორც ცნობილია, ხასიათდება მკვეთრად გამოხატული ანტიოქსიდანტური, NO-მოდულაციური აქტივობით. როგორც ჩვენი კვლევებით დადგინდა, პლაფერონ ლბ-ს ფონზე განვითარებული ჰემორაგიული შოკის დროს არტერიული წნევის მომატება მიმდინარეობდა სისხლში ენდოთელინის, თავისუფალი NO-ს და ფილტვის არტერიების ქსოვილში Ca^{2+}-იონების შემცველობის საკონ-ტროლო მაჩვენებლების დონემდე შემცირების ფონზე (ცხრილი 2).

ღვიძლის ჰისტოლოგიური კვლევებით დადგინდა, რომ პლაფერონ ლბ-ს ზემოქმედების პირობებში სლაჯ-ფენომენი და ლიმფოიდური ინფილტრაცია არ გამოვლინდა, შენარჩუნებულია ღვიძლის ქსოვილის ნორმალური სტრუქტურა. მაშასადამე, შეიძლება ითქვას, რომ ჰემორაგიული შოკის დროს პლაფერონ ლბ უზრუნველყოფს ღვიძლის ქსოვილის დაცვას დაზიანებისაგან.

მრავალრიცხოვანი კვლევები მოწმობენ პლაფერონ ლბ-ს ანტიოქსიდაციური, NO-მამოდულირებელი აქტივობის შესახებ. დადგენილია, რომ პლაფერონი ლბ არ ასრულებს ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების უშუალო სკავენჯერის როლს (C და E ვიტამინების, გლუტათიონთან შედარებით) და უზრუნველყოფს ორგანოებში და ქსოვილებში ადგილობრივი დარღვეული რედოქს-სტატუსის აღდგენას, რითაც ხელს უწყობს რედოქს-ჰომეოსტაზის აღდგენას მთელ ორგანიზმში, უზრუნველყოფს აზოტის ჟანგის რედოქს-დამოკიდებული ფიზიოლოგიური აქტივობის შენარჩუნებას და ამ გზით ხელს უწყობს ქსოვილების პერფუზიის ნაწილობრივ

ნორმალიზაციას, ორგანიზმში არტერიული წნევის სტაბილიზაციასა და ჰიპოქსიის შემცირებას.

როგორც ჩანს, პლაფერონ ლბ-ს პრევენციული ზემოქ-მედების ფონზეც NO-ს რედოქს-დამოკიდებული აქტივობის აღდგენა ხელს უწყობს არტერიული წნევის სტაბილიზაციას.

ჩვენი კვლევის შედეგების ანალიზის საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ აზოტის ჟანგს წამყვანი როლი ეკისრება სისხლძარღვების ტონუსის რეგულაციაში კონსტრიქციულ და დილატაციურ მექანიზმებს შორის ბალანსის უზრუნველყოფისა და შენარჩუნების პროცესში.

ცხრილი 1

1 ვირთაგვების არტერიული წნევის (mm Hg) ცვლილებები ჰემორაგიული შოკის და სხვადასხვა პრეპარატების ზემოქმედების ფონზე

დრო (t წუთი)	კონტ-როლი	ჰემ. შოკი	ჰემ. შოკი+ LNAME	ჰემ. შოკი +იზოპტინი	ჰემ. შოკი+ პლბ
0	120,0±2,5	60,0±2,4 P_1<0,001	60,0±1,9 P_1<0,001 P_2>0,1	60,0±2,3 P_1<0,001 P_2>0,1	60,0±1,3 P_1<0,001 P_2>0,1
5	123,0±1,3	60,0±2,5 P_1<0,001	75,0±1,3 P_1<0,001 P_2<0,001	70,0±2,9 P_1<0,001 P_2<0,01	65,0±1,3 P_1<0,001 P_2>0,1
10	120,0±2,3	60,0±2,1 P_1<0,001	80,0±2,0 P_1<0,001 P_2<0,01	80,0±2,3 P_1<0,001 P_2<0,01	70,0±2,3 P_1<0,001 P_2<0,05
15	123,0±2,8	50,0±2,1 P_1<0,001	85,0±2,8 P_1<0,001 P_2<0,01	80,0±2,6 P_1<0,001 P_2<0,01	80,0±2,1 P_1<0,001 P_2<0,01

P_1 – სარწმუნოობა კონტროლთან შედარებით

P_2– სარწმუნოობა ჰემორაგიულ შოკთან შედარებით

ცხრილი 2

ვირთაგვების სისხლში თავისუფალი NO-ს, ენდოთელინისა და Ca^{2+} იონების შემცველობის

ცვლილებები ჰემორაგიული შოკის და სხვადასხვა პრეპარატების ზემოქმედების ფონზე

	კონტროლი	ჰემ. შოკი	ჰემ. შოკი+ LNAME	ჰემ. შოკი +იზოპტინი	ჰემ. შოკი+ პლბ
NO (მმ/მგ)	11,0±1,5	18,2±2,8 P_1<0,001	-	11,3±1,3 P_1>0,1 P_2<0,01	12,5±1,4 P_1>0,1 P_2<0,01
ენდოთელინი (პგ/მლ)	1,1±0,03	1,3±0,02 P_1<0,01	1,0±1,02 P_1>0,1 P_2<0,01	1,3±1,02 P_1<0,01 P_2>0,1	1,1±1,01 P_1>0,1 P_2<0,01
Ca^{2+} (mM/ml)	2,4±0,2	4,9±0,1 P_1<0,001	2,5±0,2 P_1>0,1 P_2<0,01	2,5±0,1 P_1>0,1 P_2<0,01	2,8±0,2 P_1>0,1 P_2<0,01

P_1 – სარწმუნოობა კონტროლთან შედარებით
P_2– სარწმუნოობა ჰემორაგიულ შოკთან შედარებით

ცხრილი 3

ვირთაგვების სისხლში სუპეროქსიდრადიკალების და ლიპოპეროქსიდების შემცველობის ცვლილებები ჰემორაგიული შოკის და სხვადასხვა პრეპარატების ზემოქმედების ფონზე

	კონტროლი	ჰემ. შოკი	ჰემ. შოკი+ LNAME	ჰემ. შოკი +იზოპტინი	ჰემ. შოკი+პლბ
O_2^- (მმ/მგ)	-	18,5±2,5	7,0±3,0 P<0,001	10,0±2,0 P<0,001	4,0±1,0 P<0,001
$LOO^{\cdot}$ (მმ/მგ)	-	14,0±2,0	7,6±0,4 P<0,001	9,5±0,6 P<0,001	-

ცხრილი 4

ვირთაგვების ღვიძლში პარამაგნიტური ცენტრების ცვლილებები ჰემორაგიული შოკის და სხვადასხვა პრეპარატების ზემოქმედების ფონზე

		კონტროლი	ჰემ. შოკი	ჰემ. შოკი+ LNAME	ჰემ. შოკი +იზოპტინი	ჰემ. შოკი+ პლბ
თ.რ.	ΔH	11,0±0,5	9,0±0,5 P_1<0,01	10,0±0,7 P_1>0,1 P_2>0,1	10,2±0,5 P_1>0,1 P_2>0,1	10,7±0,5 P_1>0,1 P_1<0,01
	I	10,0±0,9	12,0±0,9 P_1<0,01	11,9±0,7 P_1<0,01 P_2>0,1	10,9±0,7 P_1>0,1 P_2>0,1	10,2±0,7 P_1>0,1 P_2<0,05
FeS		12,9±0,7	5,0±0,6 P_1<0,001	14,0±0,6 P_1>0,1 P_2<0,01	14,0±0,6 P_1>0,1 P_2<0,01	12,1±0,6 P_1>0,1 P_2<0,01
Mn^{2+}		1,0±0,4	2,0±0,5 P_1<0,05	1,4±0,3 P_1>0,1 P_2>0,1	1,3±0,3 P_1>0,1 P_2>0,1	1,3±0,3 P_1>0,1 P_2>0,1
$LOO^{\cdot}$		-	3,8±0,7	1,8±0,7 P_2<0,01	1,5±0,7 P_2<0,01	0,9±0,7 P_2<0,001

P_1 – სარწმუნოობა კონტროლთან შედარებით
P_2– სარწმუნოობა ჰემორაგიულ შოკთან შედარებით

დასკვნები

1. ჰემორაგიული შოკის დროს პროგრესული ჰიპოვოლემიის განვითარების პათოგენეზში NO-ს საკვანძო როლი ეკისრება სისხლძარღვების ტონუსის რეგულაციაში კონსტრიქციულ და დილატაციურ მექანიზმებს შორის ბალანსის უზრუნველყოფისა და შენარჩუნების პროცესში.
2. ჰემორაგიული შოკის დროს სისხლძარღვების ქსოვილში ჰიპოქსია/იშემია-ინდუცირებული Ca^{2+}-

იონების დაგროვება და კალციუმ-დამოკიდებულ eNOS-ს აქტივაცია NO-ს გაძლიერებულ წარმოქმნას, NO-დამოკიდებული რელაქსაციის მექანიზმების აქტივაციასა და არტერიული წნევის მკვეთრ დაქვეითებას იწვევს.

3. ჰემორაგიული შოკის დროს კალციუმის ანტაგონისტის, იზოპტინის (ვერაპამილის) ჰიპერტენზიულ მოქმედებას საფუძვლად უდევს კალციუმის შემცველობის შემცირებით ენდოთელური eNOS-ს აქტივობის დაქვეითება და სისხლძარღვების გლუვი მუსკულა-ტურის NO-დამოკიდებული დილატაციური მექანიზმების მოშლა.
4. ჰემორაგიული შოკის განვითარებისას LNAME-ს მიერ NO-სინთეზის ინჰიბირება NO-დამოკიდებული დილატაციის მექანიზმების მოშლას და არტერიული წნევას მომატებას განაპირობებს.
5. ჰემორაგიული შოკის დროს ანტიოქსიდანტური ბუნების პრეპარატი, პლაფერონ ლბ ოქსიდაციური ჰომეოსტაზის, რედოქს-დამოკიდებული NO-ს სინთეზის და არტერიული წნევის ნორმალიზაციას უზრუნველყოფს.

პრაქტიკული რეკომენდაციები

1. სისხლძარღვების ტონუსის რეგულაციის კონსტრიქციული და დილატაციური მექანიზმების კონკურენტული აქტივობის და მისი ორგანიზმის რედოქს-სტატუსზე დამოკიდებულებით რეკომენდაციას

ვუწევთ ჰიპოვოლემიის მკურნალობისას ორგანიზმის ანტიოქსიდანტური აქტივობის შეფასებას.

2. NO-ს დილატაციური აქტივობის რედოქს-დამოკიდებული ხასიათისა და არტერიული წნევის რეგულაციაში ამ მოლეკულის მნიშვნელოვანი როლის გათვალისწინებით, რეკომენდაციას ვუწევთ ჰემორაგიული შოკის დროს, არტერიული წნევის კორექციის მიზნით, ანტიოქსიდანტების გამოყენებას.

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებული შრომების სია იხ. გვ. 45-ზე

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Геморрагический шок является одной из разновидностей гиповолемического шока. Для гиповолемического шока характерна острая гипотензия, обусловленная рефлекторной вазодилятацией (Landry D.W., Oliver J.A., 2001). В результате массивной кровопотери (геморрагии) уменьшается объем циркулирующей крови, что способствует снижению артериального давления, венозного наполнения,
ослаблению работы сердца и развитию гиповолемического шока. Таким образом, ключевым звеном острой геморрагии является несоответствие между массой циркулирующей крови и объемом кровеносных сосудов.

В разитии гиповолемии наряду с резким увеличением содержания катехоламинов в плазме крови и активацией ренин-ангиотензивой системы, важная роль принадлежит снижению реактивности гладкой мускулатуры кровеносных сосудов, обусловленному нарушением синтеза вазоактивных соединений в клетках эндотелия и гладкой мускулатуры (Scott J.A., et al., 1999, Goren M.Z., et al., 2001).

Механизмы, определяющие развитие этих нарушений до конца не установлены (Pieder D., et al., 1999).

Многочисленные исследования свидетельствуют о важной роли оксида азота в регуляции артериального давления при гиповолемическом шоке. Вазодилятаторная активность NO при гиповолемическом шоке осуществляется посредством различных механизмов:

1. Активации фосфатазы легких цепей миозина, в результате чего имеет место дефосфорилирование миозина, расслабление гладкой мускулатуры кровеносных сосудов и развитие дилятации;
2. Активация калиевых каналов в плазматической мембране гладкой мускулатуры кровеносных сосудов посредством как непосредственного нитрозилирования каналов, так и активации cGMP-зависимой протеинкиназы;
3. Вазопрессин-зависимым механизмом, участвующим как в восстановлении тонуса кровеносных сосудов

посредтвом снижения NO-индуцированной активности cGMP, так и усилении вазодилятации путем активации зэндотелиальной NO-синтазы при участии рецепторов окситоцина в эндотелии.

Таким образом, как видно, NO играет важную роль в патогенезе гиповолемического шока. Исходя из вышесказанного, с целью поддержания уровня артериального давления наряду с блокаторами кальциевых каналов считаем преспективным применение ингибиторов (модуляторов) NO-синтазы.

Целью исследования явилось установление некоторых молекулярных механизмов развития гиповолемии при геморрагическом шоке посредством фармакологического анализа.

Задачи исследования:

1. а) Определение содержания вазоактивных соединений, эндотелина и оксида азота (NO) в крови;
   б) определение содержания супероксидрадикалов (O_2^-) и липопероксидов ($LOO^\cdot$) в крови;
   в) определение про- и антиоксидантной активности крови;
   г) определение содержания ионов Ca^{+2} в ткани легочной артерии;
   д) исследование работы цепи электронного транспорта митохондрий в печени;
   е) исследование микроморфологических изменений в печени.
2. Исследование изменений вышеперечисленных параметров при геморрагическом шоке, протекающем на фоне предварительного введения различных препаратов (антогониста кальция верапамила), блокатора NO-синтазы (LNAME) и антиоксиданта (Плаферона ЛБ)).

Научная новизна работы

1. Впервые комплексно исследованы молекулярные механизмы развития гиповолемии при геморрагическом

шоке. Показано, что в патогенезе гиповолемии при геморрагическом шоке NO играет ключевую роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов и обеспечении баланса между констрикторными и дилятаторными механизмами.

2. Было показано, что резкое снижение артериального давления при геморрагическом шоке обусловлено превалированием NO-зависимых механизмов релаксации над Ca^{2+}-зависимыми механизмами констрикции.
3. Впервые было показано, что в основе стабилизирующего действия антогониста кальция, верапамила, на уровень артериального давления при геморрагическом шоке лежит снижение активности эндотелиальной eNOS, обусловленное уменьшением содержания внутриклеточного кальция, и нарушение NO-зависимых механизмов дилятации в клетках гладкой мускулатуры кровеносных сосудов.
4. Впервые показано, что препарат Плаферон ЛБ обеспечивает нормализацию редокс-гомеостаза организма и редокс-зависимый синтез NO и тем самым способствует восстановлению регуляции вазоактивности кровеносных сосудов и стабилизации артериального давления.

Положения, выносимые на защиту

1. В патогенезе индуцированной геморрагическим шоком гиповолемии NO принадлежит ключевая роль в регуляции и сохранении баланса между констрикторными и дилятаторными механизмами регуляции тонуса кровеносных сосудов.
2. При индуцированной геморрагическим шоком гиповолемии нормализация редокс-гомеостаза организма и интенсивости редокс-зависимого синтеза NO способствует восстановлению реактивности кровеносных сосудов.

Практическая значимость работы

В результате проведенных исследований установлена важная роль NO и окислительного гомеостаза в патогенезе гиповолемии, индуцированной геморрагическим шоком. На основании результатов исследования рекомендуем применение антиоксидантных препаратов при лечении геморрагического шока.

Апробация работы

Основные положения дисертации изложены на совместном заседании отделов биотехнологии и иммунологии НИИ медицинской биотехнологии АН Грузии.

Публикации

По теме дисертации опубликовано 3 научные статьи, среди них 2 – в международных журналах.

Объем и структура дисертации

Дисертация напечатана на 100 печатных страницах. Состоит из глав: введение, материалы и методы исследования, результаты собственного исследования, обсуждение полученных результатов, выводы и практические рекомендации. Дисертация илюстрирована 7 диаграммами, 4 фото, 7 таблицами. Список использованной литературы содержит 210 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Моделирование геморрагического шока.

Эксперименты проведены на беспородных половозрелых крысах самцах весом 180-200г (60 крыс).

Геморрагический шок воспроизводили массивным кровопусканием из сонной артерии (объем выпускаемой крови составлял 2-3% массы тела) до тех пор пока артериальное давление (АД) не достигало уровня 60±5 мм рт. ст. Контроль АД у экспериментальных живтных производился при помощи ртутного монометра. С этой целью у животных, фиксированных на спине, вскрывали артерию и в нее вводили канюлю, соединенную с манометром.

С целью установления механизмов гиповолемии проводили фармакологический анализ динамики артериального давления, для чего геморрагический шок воспроизводили на фоне препаратов различных по механизму действия: антагониста кальция (изоптина), ингибитора NO-синтазы (LNAME) и антиоксиданта (Плаферона ЛБ).

Животные были разделены на 4 группы:

1. геморрагический шок;
2. изоптин (дозой 0,5 м/.кг)+ геморрагический шок;
3. LNAME (дозой 150 мг/кг) + геморрагический шок;
4. Плаферон ЛБ (дозой 8,0 мг/кг) +геморрагический шок.

Контрольную группу составляли интактные животные.

В конце эксперимента (через 15 минут после воспроизведения геморрагического шока) животные забивались в условиях общей анестезии (этамонал натрия дозой 40мг/кг).

В крови крыс исследовали содержание свободного NO, супероксидрадикалов и липопероксидов методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и спин-ловушек; содержание эндотелина производили иммуноферментным методом; в легочной артерии крыс определяли содержание ионов Ca^{2+} методом пламенной фотометрии. Проводилось ЭПР-спектроскопическое и гистологическое исследование печени.

Лабораторные исследования.

ЭПР- спектроскопические исследования. ЭПР-спектроскопические исследования проводились на радиоспектрометре РЭ-1307 (Россия), оперирующего в области сверхвысокой частоты 9.77 GHz с модуляционной частотой 50 кГц при температуре жидкого азота (-196^{0}С). Для ЭПР спектроскопических исследований кусочки ткани яичников и кровь замораживались при температуре жидкого азота (-196°С).

Исследовали спектры ЭПР крови и печени крыс.

Для определения содержания свободного оксида азота в крови и печени крыс использовали спин-ловушку диэтилдитиокарбамат натрия (DETC) (SIGMA). DETC (500 мг/кг) и Fe^{2+}-цитрат (50 мг$FeSO_{4+}\cdot 6H_2O$+ 250 мг цитрата натрия кг$^{-1}$) (Beltran B., Orsi A., Clementi E., Moncada S., 2000) вводили внутрибрюшинно дозой 50 мг/кг за 10 минут до умерщвления

животных. Спектры ЭПР комплексов $NO\text{-}Fe^{2+}\text{-}(DETC)_2$ регистрировались при температуре жидкого азота и значении микроволновой мощности 20 мВт [Галаган М.Е., Киладзе А.Ф., 1997, Meng F., Lowell C.A., 1997).С целью определения содержания СКР в крови применялась спин-ловушка 5,5 диметил-I-пиролин-IV-оксид (DMPO) (SIGMA). Кровь инкубиовалась с DMPO (в дозе 50 mM на 1мл крови) в течении 3 минут при комнатной температуре (Sweet M.J., Hume D.A.. J., 1996). Спектры ЭПР РСК регистрировались при комнатной температуре при значении микроволновой мощности 20 мВт. С целью определения содержания пероксилрадикалов ($LOO^{\cdot}$) в крови использовали спин-ловушку α-фенилl-*tert*-бутилнитрон (PBN) (SIGMA). Кровь инкубиовалась с PBN (в дозе 50мМ на 1мл крови) в течении 3 минут при комнатной температуре (Sweet M.J., Hume D.A.. J., 1996). Спектры ЭПР $LOO^{\cdot}$ регистрировались при комнатной температуре при значении микроволновой мощности 20 мВт.

Биохимические исследования проводились на спектрофотометре СФ-46 ЛОМО.

Иммуноферментные исследования.

Содержание эндотелина -1 в крови крыс проводили иммуноферментным методом с помощью набора (Endothelin-1 Enzyme Immunoassay Kit, Cayman Chemical).

Определиние активности атиоксидантных ферментов, каталазы и супероксиддисмутазы, в плазме крови.

Определение активности каталазы в плазме крови.

Активность каталазы определяли в плазме крови по методу Albi, в модификации Королюка М.А.и соавторов **(**Королюк М.А., и др., 1988)**.** Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашиваемый комплекс. Оптическая плотность полученного раствора определялась при длине волны 410 нм. За единицу активности каталазы принимается количество фермента, необходимое для расщепления 1μмоля H_2O_2 в 1 минуту.

Определение активности супероксиддисмутазы в плазме крови.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли в эритроцитной массе крови по методу Fried, модифицированном Е. В. Макаренко (Макаренко Е.В.,1988). Эритроцитарная масса дважды отмывалась физиологическим раствором, 0,5 мл эритроцитарной массы гемолизировали с 0,5 трис- HCl (pH=7,4).С целью осаждения гемоглобина к гемолизату добавляли 0,25 мл 96% этанола, 0,15 мл хлороформа и центрифугировали при 5000g. Для определения СОД 0,02 мл супернатанта вводили в 3 мл инкубационной среды, содержащей 0,41мМ нитросинего тетразоля, 0,33 мМ ЭДТА, 0,01 мМ N-метилфеназоня метилсульфата. Измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм, затем добавляли в кювету спектрофотометра 0,1 мл 0,8 мМ $NAD^{\cdot}H$, перемешивали и оставляли в темноте на 10 мин., после чего повторно измеряли оптическую плотность. О реакции судили по разнице между первым и вторым показаниями спек-трофотометра. За единицу активности принимали 50% торможение реакции восстановления нитросинего тетразоля, активность фермента выражалась в условных единицах на 1 мл эритроцитов.

Определение активности глутатион редуктазы в плазме крови. Активность глутатион редуктазы (ГР) определяли в эритроцитах с помощью набора «Glutathion Reductase Assay Kit» (SIGMA) и выражали в наномолях NADPH окисленного до NADP в единице эритроцитов.

Определение содержания ионов Ca^{2+} в ткани легочной артерии.

Содержание ионов кальция в ткани легочной артерии предварительно проводили минерализацию ткани для чего кусочки легочной артерии массой 100 мг растворяли в HNO_3 (1 мл химически чистой HNO_3+ 9 мл дисцилированной воды. В ионизированном ратворе опредеояли содержание ионов кльция методом пламенной фотометрии на фотометре ПФМУ42.

Гистологсческие исследования. Для гистологических исследований ткань печени крыс фиксировались в 12%-ом

формалине и заливались в целоидин. Срезы окрашивались гематоксилином-эозином.

Статистическая обработка. Статистический анализ полученных данных проводился с применением стандартного статистического метода, достоверная оценка разницы производилась по критерию t Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Геморрагический шок является одним из видов гиповолемического шока. Вследствии сильной кровопотери (геморрагии) уменьшается объем циркулирующей крови, что способствует снижению среднего системного давления, уменьшению венозного наполнения, ослаблению работы сердца и развитию шока. Циркуляционная гипотензия, индуцированная геморрагическим шоком обусловлена многочисленными факторами, Среди них важно отметить гипочувствительность клеток гладкой мускулатуры артерий по отношению к констрикторным факторам, недостаточное снабжение тканей кислородом и активацию вазодилятаторных факторов. Взаимодействие и взаимозависимость, существующая между этими факторами до конца не установлены. Целью нашего исследования явилось установление некоторых молекулярных механизмов гиповолемии при геморрагическом шоке, для чего мы изучили развитие гиповолемии на фоне предварительного действия различных препаратов (антагониста кальция (изоптин), блокатора NO-синтазы (LNAME) и антиоксидата (Плаферона ЛБ).

В результате наших исследований было установлно, что через 15 минут после развития геморрагического шока (60 мм рт.ст.) артериальное давление крыс продолжало уменьшаться и достигало уровня 50 мм рт.ст. На фоне предварительного действия изоптина, LNAME и Плаферона ЛБ артериальное

давление крыс в течении 15 минут находящихся в состоянии геморрагического шока увеличивалось на 33%.

Одной из причин развития гиповолемии при геморрагическом шоке является несоответствие между массой циркулирующей крови и объемом кровеносных сосудов. В результате сильной кровопотери (геморрагии) уменьшается объем циркулирующей крови, что способствует снижению среднего системного давления, уменьшению венозного наполнения и развитию геморрагического шока.

Циркуляторная гипотензия, индуцированная геморрагическим шоком, обусловлена многочисленными факторами, среди которых надо отметить гипочувствительность клеточных структур (α-адренорецепторов) гладкой мускулатуры по отношению к констрикторным стимулам (Kai l., et al., 2004), недостаточное потребление кислорода тканями, и усиление продукции факторов с вазодилятаторной активностью, оксида азота и TNF-α (Scott J.A., et al., 1999, Goren M.Z., et al., 2001).

Мы заинтересовались характером изменения содержания вазоактивных соединений (вазодилятатора - свободного оксида азота, и вазоконстриктора - эндотелина) при гиповолемическом шоке (на его начальных стадиях). В результате наших исследований было установлено, что через 15 минут после развития геморрагического шока в крови резко возрастало (на 47%) содержание свободного оксида азота, параллельно возрастало количество эндотелина (на 18%).

Эндотелин – потенциальный вазоконстриктор *in vitro* и *in vivo* (Luscher T.F., et al., 1992, Kiowaski W.et al., 1991. Luscher T.F., et al., 1990), характеризующийся длительным действием. Во внутренних органах и в коронарных артериях низкие и пороговые концентрации эндотелина (которые не проявляют значительный констрикторный эффект) потенциируют действие других вазоконстрикторных гормонов (Yang Z., et al., 1990, Dohi Y.,et al., 1992). Кроме этого эндотелин характеризуется способностью активировать релаксационные факторы, простаццикли́н и NO, в эндотелиальных клетках посредством взаимодействия с ET_B-рецепторами (Arai H., et al., 1990, Sakurai T., et al., 1990). NO, в свою очередь, ингибирует синтез эндотелина (Boulanger C., Luscher T.F. 1990, 85, 587-590).

Во время компенсируемого геморрагического шока механизмы прямой и обратной связи, регулирующие циркуляцию крови направлены на восстановление кардиального дебита и уровня артериального давления до нормального уровня. В случае неспособности компенсаторных механизмов сохранить артериальное давление на контрольном уровне имеет место прогрессирование шока. Прогрессирование шока яляется результатом действия порочного круга взаимносменяющейся депрессии и активации гуморальных, метаболических (вазоактивных (вазодилятаторных и вазоконстрикторных)) эндокринных, ферментных факторов в различых тканях и системах.

В результате острой геморрагии резкое снижение артериального давления обеспечивает уменьшение коронарного кровотока, снижение сократительной активности и кардиального дебита миокарда. Прогрессирующее снижение артериального давления и перфузии тканей и развитие ишемии способствует аккумуляции соединений с вазодилятаторной активностью и снижению резистентности кровеносных сосудов. Дилятация переферических кровеносных сосудов способствует увеличению гидростатического давления в капилярах, что в дальнейшем обеспечивает прогрессирование потери жидкости и дальнейшее падения давления (Prasad K., Lee P., 2002).

Выявленное нами увеличение содержания общепризнанного вазодилятатора, оксида азота, в крови является результатом вышеописанной вазодилятационной компенсаторной реакции. В это время слабое увеличение содержания обладающего констрикторной активостью эндотелина (на 18%) должно быть обусловлено усилением его синтеза активированными клетками эндотелия, или же снижением клиренса эндотелина в плазме крови (Voerman et al., 1992, Mitaka et al., 1998, Avontuur et al., 1999). Считается, что в экстремальных условиях механизмы взаимозависимости между NO и рецепторами эндотелина отличается от механизмов, обеспечивающим установление баланса между этими вазоактивными соединениями в физиологических условиях (Wiley K. E., Davenport A.P., 2001). Во время геморрагического шока этот баланс сдвинут в сторону дилятационного действия NO, что может быть обусловлено

нитрозилированием рецепторов эндотелина избыточными концентрациями NO (Wiley K. E., Davenport A.P., 2001). В результате, артериальное давление продолжает уменьшаться, что подверждается нашими исследованиями.

Ca^{2+} - важный вторичный мессенжер, участвующий в регуляции сократительной активности гладкой мускулатуры и тонуса кровеосных сосудов (Jian H., Stephens N.L., 1994, Sobol C.V., Nesterov V.P. 1997).

Сократительная активность гладкой мускулатуры кровеносных сосудов играет важную роль в регуляции артериального давления. Накопление кальция в клетках осуществляется посредством рецепторрегулируемых потенциалзависимых кальциевых каналов и высвобождения кальция из внутриклеточных депо, саркоплазматического ретикулума и митохондрий (где локализовано более, чем 90% внутриклеточного кальция). Увеличение потока кальция в клетках гладкой мускулатуры кровеносных сосудов способствует увеличению уровня свободного внутриклеточного кальция. Ионы Ca^{2+} в комплексе с кальмодулином активируют киназу, фосфорилирующую легкие цепи миозина? и вызывают констрикцию гладкой мускулатуры кровеносных сосудов.

Кроме этого ионы Ca^{2+} активируют eNO-синтазу и способствуют интенсификации синтеза NO. Тут же надо отметить, что увеличение содержания внутриклеточного кальция в эндотелиальных клетках ассоциируется с усилением продукции эндотелина (Boulanger C., Lucher T.F. 1990). Таким образом, ионы Ca^{2+} в кровеносных сосудах играют дуальную роль – участвуют в констрикторных механизмах гладкой мускулатуры и способствуют интенсификации синтеза вазодилятатора, NO.

В результате наших исследований было устновлено, что во время геморрагического шока в легочной артерии крыс содержание ионов кальция увеличивается в два раза по сравнению с контрольными значениями (таблица 2). Во время острого геморрагического шока в клетках гладкой мускулатуры кровеносных сосудов увеличивается чувствительность высокопроводимых Ca^{2+}-зависимых K^{+}- и АТР-чувствительных K^{+}-каналов (Kai., et al., 2001, Szabo C., Salzman A.L., 1996).

Активация K^+ каналов обеспечивает стабилизацию мембранного потенциала и способствует снижению возбудимости клетки и накопления внутриклеточного кальция (Kai L., et al., 1997). Таким образом, при остром геморрагическом шоке в легочной артерии крыс увеличение содержания внутриклеточного кальция может быть обусловлено высвобождением этих ионов из внутриклеточных депо (митохондрий и саркоплазматического ретикулума). При геморрагическом шоке в индуцированное гипоксией/ишемей накопление избыточного кальция в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов способствует активации eNOS и усиленному образованию NO. В это время содержание NO в крови увеличивается на 58% по сравнению с контрольным уровнем. NO посредством cGMP-зависимого механизма активирует киназу, активирующую миозин-дефосфатазу и этим путем препятствует констрикции гладкой мускулатуры кровеносных сосудов (Landry D.W., Oliver J.A., 2001).

Существуют многочисленные гипотезы об участии NO в механизмах регуляции тонуса кровеносных сосудов (Karaki H., et al., 1997). Считается, что NO участвует в активации cGMP- и Ca^{2+}-зависимых K^+-ых каналов и гиперполяризации мембраны, что в вою очередь препятствует вхождению ионов кальция в клетку посредством медленных кальциевых L-каналов. Не исключено, также, непосредственное нитрозилирование K^+ каналов (Landry D.W., et al., 2001). Известно, что оксид азота ускоряет секвестрацию ионов кальция в саркоплазматическом ретикулуме посредством активации Ca^{2+} насосов (Cohen R.A., et al., 1999). Считается, что NO способствует снижению уровня Ca^{2+} в клетках гладкой мускулатуры посредством рецепторзависимой ингибиции высвобождения этих ионов из клеточных депо (Hirata M., et al., 1990).

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что при геморрагическом шоке (через 15 минут) образующийся в избытке в эндотелиальных клетках оксид азота ингибирует проницаемость L-каналов кальция (посредством нитрозилирования Ca^{2+}-зависимых K^+-ых каналов или cGMP-зависимым путем), активирует Ca^{2+}-насос в саркоплазматическом ретикулуме и тем самым способствует секвестрации

ионов кальция в внутриклеточных депо, снижению содержания свободных ионов кальция в клетке и снижению тонуса кровеносных сосудов.

На основании результатов наших исследований и данных литературы можно заключить, что при экспериментальном геморрагическом шоке в условиях гипоксии/ишемии в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов имеет место накопление ионов Ca^{2+}, активация кальций-зависимой eNOS и образование избыточного NO. В условиях накопления избыточного оксида азота NO-зависимые механизмы релаксации (дефосфорилирование легких цепей миозина, гиперполяризация мембраны с участием Ca^{2+}-зависимых K^{+}-каналов, ингибирование высвобождения кальция из внутриклеточных депо и интенсификация их секвестрации в саркопламатическом ретикулуме) превалируют над Ca^{2+}-зависимыми процессами констрикции, что способствует значительному снижению артериального давления.

С целью подтверждения нашей гипотезы мы воспрозводили геморрагичекий шок на фоне антогониста кальция, изоптина. Предварительное действие изоптина способствовало стабилизации артериального давления и снижению содержания оксида азота в крови экспериментальных животных; уменьшалось также содержание ионов кальция в ткани легочной артерии.

Антогонист кальция изоптин эффективно блокирует потенциалзависимые кальциевые каналы (L тип) и этим путем препятствует накоплению ионов кальция в клетках и констрикции гладкой мускулатуры кровеносных сосудов. Установлено, что изоптин также препятствует накоплению кальция в эндотелиальных клетках (Iozahen L., Devinck M.A., 1995) и тем самым снижает производство NO eNO-синтазой, ограничивает дилятационную активность оксида азота (Lantoine. F., et al., 1998).

Исходя из вышесказанного можно заключить, что выявленное нами стабилизирующее воздействие изоптина на артериальное давление при геморрагическом шоке является результатом суммирования двух разнонаправленных процессов, вазодилятации и вазоконстрикции. Соответственно изменение

артериальнго давления в результате действия изоптина зависит от баланса между констрикционными и дилятационными механизмами, регулирующими тонус кровеносных сосудов. По мнению некоторых авторов (Ruschitzka F.T., e al., 1999), характер изменения артерильного давления в ответ на воздействие антогонистов кальция является наилучшим индикатором дисбаланса между вазодилятационными и констрикторными механизмами.

Предварительное действие изоптина при геморрагичесом шоке обеспечивает блокаду накопления кальция и интенсификации кальциум-зависимого синтеза оксида азота в эндотелиальных клетках, обеспечивает превенцию NO-зависимой дилятации кровеносных сосудов. В это время на первый план выступает констрикционная активность эндотелина. В результате наших исследований выявлено, что при развитии геморрагического шока на фоне предварительного действия изоптина, содержание изоптина на 18% превышало уровень контрольных значений (как и в случае геморргического шока). Наши данные коррелируют с данными литературы, согласно которым превенция накопления кальция в клетках не ингибирует высвобождение эндотелина (Ruschitzka F.T., Noll G., Luscher T.F. 1999).

Эндотелин – активатор потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов (Yanagisawa M., 1988). Под действием антогонистов кальция вазоконстрикторный эффект эндотелина зависит от типа артерий. В некоторых артериях (аорта свиньи, коронарная артерия человека) рецептор эндотелина в клетках гладкой мускулатуры кровеносных сосудов связан с потенциал-зависимыми Ca^{2+} каналами посредством G протеина (Goto K., et al., 1989, Godfraind T., 1989). В таких кровеносных сосудах антогонист кальция способствует снижению эндотелин-индуцированной вазоконстрикции.

В других кровеносных сосудах большинство эдотелин-зависимых констрикционных эффектов осуществляется посредством высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо (в результате актиации фосфолипазы С и образования инозитол-трифосфата и глицерола (Reink T.J., et al., 1988, Wallnofer A., Weir S., et al., 1989)). В таких кровеносных сосудах антогонисты

Ca^{2+} не способны обеспечить превенцию эндотелин-индуцированной констрикции (Yang Z., et al., 1990).

Можно заключить, что в основе стабилизирующего эффекта изоптина на артериальное давление при геморрагическом шоке лежит подавление NO-зависимых механизмов дилятации. Это еще раз подтверждает наше предположение о важной роли оксида азота в механизмах развития гиповолемии при геморрагическом шоке.

Предварительное введение ингибитора NO-синтазы LNAME животным, подвергнутым геморрагическому шоку также способствует одновременному увеличению артериального давления и содержания ионов Ca^{2+} в ткани легочной артерии; снижается также уровень эндотелина в крови, тогда как ЭПР сигнал свободного оксида азота вообще не регистрируется в спектре ЭПР крови, что указывает на значительное снижение содержания этого соединения в крови. Ингибитор NO-синтазы, LNAME, обеспечивает подавление ситеза NO в эдотелии кровеносных сорсудов, что способствует резкому снижению его содержния в крови животных. Соответственно, в клетках гладкой мускулатуры имеет место нарушение NO-зависимых дилятационных механизмов.

На фоне предварительного действия LNAME, стабильность содержания эндотелина и ионов кальция во время геморрагичского шока еше раз подтверждает гипотезу о ключевой роли оксида азота в патогенезе гиповолемии.

Реактивные формы кислорода играют важную роль в патогенезе различных заболеваний. Не вызывает сомнения роль этих соединений при геморрагическом шоке. Существуют многочисленные данные литературы об усиленном образовании реактивных форм кислорода при геморрагическом шоке (Prazad K., et al., 2002, Chambers D.E., et al., 1985, Van den Bosh H., 1980). Реактивные формы кислорода образуются в организме после массовой кровопотери в результате развития гипоксия/ишемии, вследствии недостаточного снабжения тканей кислородом и активации прооксидантных ферментов (ксантиноксидазы, убихинона) (Chambers D.E., et al., 1985),

активации арахидоновой кислоты (Van den Bosh H., 1980), системы комплимента (Fruchterman T.M., et al., 1998), цитокин-стимулировнных макрофагов (Nathan C.F., et al.,1986), лейкоцитов (Berton G., et al., 1986) и аутооксидации катехоламинов (Misra H.P., et al., 1972, Mullano K.M., 1989). Во время геморрагического шока усиленное образование актиных форм кислорода проявляется в нащих экспериментах интенсивными сигналами ЭПР супероксидраикалов и липопероксидов в спектре крови, снижением активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы) и появлением интенсивного сигнала ЭПР липопероксидов в спектре ЭПР печени (таблица 3).

Активные формы кислорода оказывают влияние на гомеостаз тканей организма и вызывают их деструкцию. Как мы уже отмечали, при геморрагическом шоке одной из причин нарушения кальциевого гомеостаза в кровеносных сосудах и накопления ионов кальция в эндотелии является гипоксия-индуцированное снижение интенсивности энергогенеза, что в свою очередь способствует дальнейшему усилению генерации реактивных форм кислорода. Установлено, что свободнорадикальные формы кислорода подобно NO могут участвовать в регуляции тонуса гладкой мускулатуры кровеносных сосудов. Они участвуют в инактивации Ca^{+2} насоса саркоплазматического ретикулума (Grover A.K., et al., 1988), стимулируют IP_3—индуцированное высвобождение ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума клеток гладкой мускулатуры и, следовательно, способствуют развитию констрикции (Suzuki Y.J., Ford G.D. 1992). Надо отметить, что супероксидрадикалы взаимодействуют с NO, образуют пероксинитрит и тем самым способствуют ограничению вазодилятаторной активности этого соединения. Таким образом, оксирадикалы также, как и эндотелин, кальциум и NO участвуют в регуляции тонуса кровеносных сосудов и характеризуются вазоконстрикторной активностью.

В то же время в условиях окислительного стресса имеет место активация ядерного фактора NFkB и усиленной экспрессии iNOS, которая образует NO в наномольных концентрациях. Избыточное NO способствует развитию стабильной гиповолемии (Altavilla D., et al., 2001)..

Сложное взаимодействие и взаимочередование вазодилятаторных и вазоконстрикторных агентов и механизмов определяет тяжесть патогенеза геморрагического шока и низкую эффективность его лечения. При геморрагическом шоке недостаточная перфузия внутренних органов обуславливает высокую интенсивность окислительного повреждения тканей реактивными соединениями азота и кислорода. В это время поврежденные ткани сами генерируют свободные радикалы, что способствует развитию окислительного стресса в организме.

Во время геморрагического шока в ткани печени нами было выявлено нарушение работы цепи электронного транспорта митохондрий, что проявляется снижением полуширины свободнорадикального сигнала и накоплением убисемихинонов (таблица 4). Семиубихиноны - мощные промоторы процессов свобднорадикального окисления, способствуют усиленному образованию супероксидрадикалов, окислительному повреждению ткани печени. Повреждение ткани печени при геморрагическом шоке было выявлено нами гистологическими исследованиями. Во время геморрагического шока в ткани печени выявлен сладж феномен, центральные вены также, как интерлобулярные вены были расширены и содержали большое количество эритроцитов. Наблюдалась перипортальная лимфоидная инфильтрация. В печени структура большинства долей была нарушена. Выявлено большое количество гепатоцитов с пикнозным ядром, характерным для клеток, находящихся в состоянии некроза. Морфологические изменения особенно были интенсивны в перицентральной части печени, вокруг центральной вены.

На фоне предварительного действия изопина и LNAME морфологические нарушения печени выявились с меньшей интенсивностью. В условиях предварительного введения изоптина сладж-феномен не проявился, в области долей участки с дезорганизацией сменились участками с нормальной структурой.

В условиях предварительного введения LNAME сладж-феномен выявлен только в нескольких центральных и интралобулярных венах, лимфоидная инфильтрация вообще не проявилась. Область дезорганизации в долях была значительно меньше по сравнению с геморрагическим шоком. В некоторых участках, однако с меньшей интенсивностью, выявлены гепатоциты, содержащие пикнозное ядро и высокоэозинофильную цитоплазму.

С учетом важной роли окислительного стресса и NO в патогенезе геморрагического шока мы изучили влияние предварительного действия Плаферона ЛБ на динамику и механизмы изменения артериального давления. Как известно, Плаферон ЛБ характеризуется ярко выраженой антиоксидантной, NO-модулирующей активностью. Как следует из результатов наших исследований, во время геморргического шока, развивающегося на фоне Плаферона ЛБ увеличение артериального давления протекает на фоне уменьшения содержания эндотелина и свободного NO в крови и снижения кнцентрации ионов кальция в легочной артерии по сравнению с соответствующими параметрами, характерными для геморрагического шока, Считаем, что в основе защитного эффекта Плаферона ЛБ лежит редокс-зависимое воздействие этого препарата на интенсивность синтеза NO.

Гисологическими исследованиями печени было установлено, что Плаферона ЛБ препятствует развитию сладж-феномена и лимфоидной инфильтрации при геморрагичеком шоке, способствует сохранению нормальной структуры ткани печени. Таким образом, можно заключить, что Плаферон ЛБ

обеспечивает защиту печени от повреждения при геморрагическом шоке.

Многочисленные исследования свидетельствуют об антиоксидантной активности Плаферона ЛБ. Установлено, что Плаферон ЛБ не является прямым скавенджером свободных радикалов (подобно С и Е витаминам), а обеспечивает воостановление редокс-статуса в тканях и органах и этим путем способствует нормализации перфузии тканей, стабилизации артериального давления в организме, снижению гипоксии. На фоне предварительного действия Плаферона ЛБ восстановление редокс-зависимой активности NO способствует стабилизации артериального давления.

Таким образом, на основании анализа наших исследований можно заключить, что оксид азота играет ведущую роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов, обеспечении и сохранении баланса между констрикторными и дилятационными механизмами.

Таблица 1

Изменения артериального давления (mmHg) крыс при геморрагическом шоке на фоне воздействия различных препаратов

Время (t мин.)	контроль	гем. шок	гем. шок+ LNAME	гем. шок +верапа-мил	гем. шок +ПЛБ
0	120,0±2,5	60,0±2,4 P_1<0,001	60,0±1,9 P_1<0,001 P_2>0,1	60,0±2,3 P_1<0,001 P_2>0,1	60,0±1,3 P_1<0,001 P_2>0,1
5	123,0±1,3	60,0±2,5 P_1<0,001	75,0±1,3 P_1<0,001 P_2<0,001	70,0±2,9 P_1<0,001 P_2<0,01	65,0±1,3 P_1<0,001 P_2>0,1
10	120,0±2,3	60,0±2,1 P_1<0,001	80,0±2,0 P_1<0,001 P_2<0,01	80,0±2,3 P_1<0,001 P_2<0,01	70,0±2,3 P_1<0,001 P_2<0,05
15	123,0±2,8	50,0±2,1 P_1<0,001	85,0±2,8 P_1<0,001 P_2<0,01	80,0±2,6 P_1<0,001 P_2<0,01	80,0±2,1 P_1<0,001 P_2<0,01

P_1 – достоверность по сравнению с контролем
P_2– достоверность по сравнению с геморрагическим щоком

Таблица 2

Изменения содержания свободного NO, эндотелина и ионов Ca^{2+} в крови крыс при геморрагическом шоке на фоне воздействия различных препаратов

	контроль	гем. шок	гем. шок+ LNAME	гем. шок +изоптин	гем. шок +ПЛБ
NO (мм/мг)	11,0±1,5	18,2±2,8 P_1<0,001	-	11,3±1,3 P_1>0,1 P_2<0,01	12,5±1,4 P_1>0,1 P_2<0,01
эндотелин (пг/мл)	1,1±0,03	1,3±0,02 P_1<0,01	1,0±1,02 P_1>0,1 P_2<0,01	1,3±1,02 P_1<0,01 P_2>0,1	1,1±1,01 P_1>0,1 P_2<0,01
Ca^{2+} (mM/ml)	2,4±0,2	4,9±0,1 P_1<0,001	2,5±0,2 P_1>0,1 P_2<0,01	2,5±0,1 P_1>0,1 P_2<0,01	2,8±0,2 P_1>0,1 P_2<0,01

P_1 – достоверность по сравнению с контролем

P_2– достоверность по сравнению с геморрагическим щоком

Таблица 3

Изменения содержания супероксидрадикалов и липопероксидов в крови крыс при геморрагическом шоке на фоне воздействия различных препаратов

	контроль	гем. Шок	гем. шок+ LNAME	гем. шок +изоптин	гем. шок +ПЛБ
O_2^- (мм/мг)	-	18,5±2,5	7,0±3,0 P<0,001	10,0±2,0 P<0,001	4,0±1,0 P<0,001
$LOO^{\cdot}$ (мм/мг)	-	14,0±2,0	7,6±0,4 P<0,001	9,5±0,6 P<0,001	-

Таблица 4

Изменения содержания парамагнитных центров печени при геморрагическом шоке на фоне воздействия различных препаратов

		контроль	Гем. шок	Гем. шок + LNAME	Гем. шок +изоптин	Гем. шок +ПЛБ
Св. Р.	ΔH	11,0±0,5	9,0±0,5 P_1<0,01	10,0±0,7 P_1>0,1 P_2>0,1	10,2±0,5 P_1>0,1 P_2>0,1	10,7±0,5 P_1>0,1 P_1<0,01
	I	10,0±0,9	12,0±0,9 P_1<0,01	11,9±0,7 P_1<0,01 P_2>0,1	10,9±0,7 P_1>0,1 P_2>0,1	10,2±0,7 P_1>0,1 P_2<0,05
FeS		12,9±0,7	5,0±0,6 P_1<0,001	14,0±0,6 P_1>0,1 P_2<0,01	14,0±0,6 P_1>0,1 P_2<0,01	12,1±0,6 P_1>0,1 P_2<0,01
Mn^{2+}		1,0±0,4	2,0±0,5 P_1<0,05	1,4±0,3 P_1>0,1 P_2>0,1	1,3±0,3 P_1>0,1 P_2>0,1	1,3±0,3 P_1>0,1 P_2>0,1
$LOO^{\cdot}$		-	3,8±0,7	1,8±0,7 P_2<0,01	1,5±0,7 P_2<0,01	0,9±0,7 P_2<0,001

P_1 – достоверность по сравнению с контролем

P_2– достоверность по сравнению с геморрагическим щоком

ВЫВОДЫ

1. В патогенезе прогрессирующей гиповолемии при геморрагическом шоке NO принадлежит ведущая роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов, обеспечении и сохранении баланса между констрикторными и дилятяторными механизмами.

2. Во время геморрагического шока гипоксия/ишемия индуцированное накопление ионов кальция и активация кальций-зависимой eNOS в тканях кровеносных сосудов способствует усиленному образованию NO, активации NO-зависимых механизмов релаксации.

3. Во время геморрагического шока стабилизирующее действие антагониста кальция, верапамила, на уровень артериального давления обусловлено снижением активности кальций-зависимой eNO-синтазы и нарушением NO-зависимых механизмов дилятации в клетках гладкой мускулатуры.

4. Ингибирование NO-синтазы посредством LNAME обуславливает нарушение механизмов NO-зависимой дилятации и способствует увеличению артериального давления.

5. Антиоксидантный препарат Плаферон ЛБ способствует нормализации окислительного гомеостаза, редокс-зависимого синтеза NO и увеличению артериального давления.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С учетом конкурентной активности констрикторных и дилятаторных механизмов регуляции тонуса кровеносных сосудов и зависимости их от редокс–статуса организма, рекомендуем контроль антиоксидантной активости организма при лечении гиповолемии.

2. С учетом редокс-зависимого характера дилятаторной активности NO и важной роли этой молекулы в регуляции артериального давления при геморрагическом шоке рекомендуем применение антиоксидантов с целью коррекции артериального давления при геморрагическом шоке.

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებული შრომების სია

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Нозадзе Л.,С., Панцулаиа В.А., Мчедлишвили Т.В., Саникидзе Т.В.,Бахуташвили В.И. "Роль NO и некоторые механизмы эффективности Плаферона ЛБ при регуляции артериального давления во время геморрагического шока" Georgian Medical News., 2005, N5 (122), 60-65.

2. Lela Nozadze, Rusudan Ruxadze, Otar Kevlishvili, Vano Datunashvili. Possibility of preservation of the cellular damage of liver during hemorrhagic shock. Tbilisi State Medical University Annals of Biomedical research and Education. Volume 5, Issue 1, July-September 2005, p.31-33

3. Lela Nozadze, Otar Kevlishvili, Tamar Mchedlishvili, Ivan Datunashvili, Tamar Sanikidze. The role of vaso-active substances and some mechanisms of Plaferon LB effectiveness in regulation of arterial pressure during hemorrhagic shock. Tbilisi State Medical University Annals of Biomedical research and Education. Volume 6, Issue 1, January-March 2006, p 102-104