

УДК 612.116.3:612.117:612.35

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ В ПЕЧЕНЬ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ЦЕЛЬЮ ОПТИМИЗАЦИИ КОЛЛОИДНО-ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ КРОВИ ПОСЛЕ КРОВОПОТЕРИ

Д.А. Ксейко, Т.П. Генинг

Ульяновский государственный университет

Представлены результаты оценки эффективности использования аутологичных клеток крови для адресной доставки в печень аскорбиновой кислоты в дозах 25, 50 и 100 мг/кг для оптимизации коллоидно-осмотического давления крови после кровопотери. Одной из ведущих тенденций, проявляющихся в современной фармакологии, является создание систем направленного транспорта лекарств. Это позволяет концентрировать лекарственный препарат в зоне, охваченной патологическим процессом, и устранить сам процесс и его негативные последствия.

Получение эритроцитарных контейнеров с аскорбиновой кислотой производилось методом гипотонического лизиса. Показано, что из используемых доз наиболее эффективной является 100 мг/кг, так как при ее применении увеличивается общее содержание белка за счет повышения процентного содержания альбуминов в сыворотке крови, обуславливающих ее коллоидно-осмотическое давление.

Ключевые слова: кровопотеря, гипоксия, синтез белка, аскорбиновая кислота, альбумины, белковый обмен, коллоидно-осмотическое давление, направленный транспорт, эритроциты.

Введение. Кровопотеря – это состояние организма, возникающее после кровотечения и характеризующееся развитием ряда приспособительных и патологических реакций [17, 22].

Одной из приспособительных реакций на потерю крови является перераспределение кровотока внутри сосудистой системы – централизация кровообращения. При этом происходит мобилизация крови из органов брюшной полости, раскрытие артерио-венозных шунтов. Активацию артерио-веноулярного шунтирования в печени при кровопотере справедливо относят к компенсаторным явлениям. Тем не менее оно способствует еще большему расстройству кислородного режима гепатоцитов, вызывая нарушения метаболизма в органе и, как следствие, нарушение гомеостаза организма [9–11].

В рамках перестройки в системе микроциркуляции при кровопотере происходят изменения фильтрационно-абсорбционного рав-

новесия, вызванные диспропорцией обычных перепадов гидростатического и коллоидно-осмотического давления на протяжении обменных сосудов – капилляров [5].

В условиях кровопотери особенно важна нормализация коллоидно-осмотического давления, позволяющая сохранить соответствующий объем плазмы крови и уровень обмена жидкости в микроциркуляторном русле. Это давление обусловлено в основном низкомолекулярными белками плазмы крови – альбуминами, а их содержание зависит от функциональной активности печени [7, 8]. Поэтому с целью коррекции функционального состояния печени в условиях кровопотери необходимо использовать вещества, предотвращающие развитие гипоксии в органе, а также ускоряющие нормализацию функций гепатоцитов в постгипоксический период. В качестве такого вещества нами выбрана аскорбиновая кислота (АК) – полифункциональное вещество с исключительно широким

спектром антигипоксического действия [13]. Мы предположили, что АК повысит уровень устойчивости и адаптационную способность печени к кровопотере.

Одной из ведущих тенденций, проявляющихся в современной фармакологии, является создание систем направленного транспорта лекарств. Такие системы позволяют концентрировать лекарственный препарат исключительно или хотя бы преимущественно в зоне, охваченной патологическим процессом, и устранять сам процесс и его негативные последствия [14, 15, 19]. С позиций экстракорпоральной фармакотерапии наиболее целесообразно применять эритроциты при патологических процессах в органах, богатых эритрофагоцитирующими клетками; к таким органам относится печень [14, 15].

Традиционная инфузионно-трансфузионная программа восполнения кровопотери, основанная на применении коллоидных и кристаллоидных кровезамещающих растворов, имеет риск возникновения посттрансфузионных реакций (пирогенных, аллергических) и осложнений [2, 20].

Цель исследования. Оценить эффективность использования аутологичных клеток крови для адресной доставки в печень аскорбиновой кислоты, способствующей оптимизации коллоидно-осмотического давления крови после кровопотери.

Материалы и методы. Работа выполнена на белых беспородных крысах массой 240–280 г. Гипоксию вызывали кровопусканием через катетер [23]. Объем кровопотери составил 2 % от массы животного. Животные были разделены на следующие группы: 1-я группа – интактные животные, 2-я группа – крысы с кровопотерей (материал для исследования брали через 6 и 24 ч после кровопотери), 3-я группа – контрольная (интактные крысы, получавшие АК путем направленного транспорта), 4-я группа – животные с кровопотерей, получавшие АК путем направленного транспорта. Получение эритроцитарных контейнеров (ЭК) с АК производилось методом гипотонического лизиса в модификации Т.П. Генинг [6]. ЭК с АК вводили внутривенно в дозах 25, 50 и 100 мг/кг однократно через 10 мин после кровопотери.

Общее содержание белка в сыворотке крови определяли унифицированным методом по биуретовой реакции [12]. Процентное содержание альбуминов в сыворотке крови определяли методом электрофореза на геле агарозы на аппарате Paragon фирмы Becton (США). Оценку электрофореграмм проводили с помощью денситометра. Статистическая обработка полученных данных производилась по t-критерию Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Экспериментальные исследования проводились с соблюдением биоэтических правил.

Результаты и обсуждение. Из данных нашего исследования, представленных в табл. 1, видно, что содержание общего белка в сыворотке крови крыс через 6 ч после кровопотери достоверно снижается на 13,11 % (с $70,80 \pm 4,56$ до $61,52 \pm 4,41$ г/л), а через 24 ч уже имеет тенденцию к нормализации. Снижение белоксинтезирующей способности печени может быть вызвано несколькими причинами. В результате перераспределения органного кровотока кровоснабжение, в частности, печени по ее микроваскулярному руслу ограничивается, в т.ч. за счет артериоло-веноулярного шунтирования. В результате в органе развивается вторичная тканевая гипоксия, уменьшаются энергетические ресурсы клетки, что приводит к разнообразным расстройствам функций печени [9, 13].

Одним из ведущих патогенетических механизмов развития поражений печени при кровопотере является активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1, 3]. Образовавшиеся в процессе развития перекисного окисления липидов диеновые конъюгаты и малоновый диальдегид в больших концентрациях обладают выраженной цитотоксичностью, тем самым подавляют процессы гликолиза и окислительного фосфорилирования, ингибируют синтез белка, подавляют активность цитозольных и мембраносвязанных ферментов [16].

В содержании альбуминов в сыворотке крови прослеживается лишь тенденция к увеличению на обоих сроках исследования по сравнению с их содержанием в сыворотке крови интактных крыс.

Таблица 1

Содержание общего белка и альбуминов в сыворотке крови белых крыс после кровопотери ($M \pm m$, $n=12$)

Показатель	Условия эксперимента		
	Интактные животные	6 ч после кровопотери	24 ч после кровопотери
Общий белок, г/л	70,80±4,56	61,52±4,41* (86,89 %)	66,44±4,41 (93,84 %)
Альбумины, %	47,53±4,50	52,24±6,71 (109,91 %)	49,96±6,82 (105,11 %)

Примечания:

- * – достоверность различий по отношению к интактным животным ($p < 0,05$).
- В процентах указаны изменения показателей относительно соответствующих значений интактных животных.

В табл. 2 показано, что введение АК интактным животным в дозе 25 мг/кг (контроль) не вызывает достоверного изменения содержания общего белка в сыворотке крови по сравнению с показателями нормы.

Однократное введение АК через 6 ч после кровопотери привело к достоверному повышению общего белка в сыворотке крови как по сравнению с интактными животными, так и по сравнению с животными с кровопотерей (соответственно на 7,97 и на 24,25 %). Через 24 ч содержание белка в сыворотке крови не отличалось от его содержания у интактных животных.

Таким образом, направленный транспорт в печень АК в дозе 25 мг/кг через 6 ч после кровопотери способствует достоверному повышению, а через 24 ч – нормализации уровня общего белка в сыворотке крови экспериментальных животных.

При направленном транспорте АК в дозе 50 мг/кг интактным животным (контроль) не происходило достоверного изменения содержания общего белка в сыворотке крови экспериментальных крыс по сравнению с показателями нормы.

Таблица 2

Влияние адресной доставки аскорбиновой кислоты в печень в дозировках 25, 50 и 100 мг/кг на содержание общего белка в сыворотке крови белых крыс ($M \pm m$, $n=12$), г/л

Условия эксперимента	Дозы аскорбиновой кислоты		
	25 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг
Контроль	69,50±2,60	71,99±4,52	75,90±4,33*
Направленный транспорт (6 ч)	76,44±2,22* ^	78,00±4,47* ^	79,89±4,88* ^
Направленный транспорт (24 ч)	72,89±1,83 ^	76,82±4,05* ^	79,82±2,97* ^

Примечание. * – достоверность различий по отношению к интактным животным; ^ – достоверность различий по отношению к животным с кровопотерей.

При введении АК животным с кровопотерей в сыворотке крови крыс наблюдалось достоверное повышение содержания общего белка как по сравнению с интактными животными, так и по сравнению с животными с кровопотерей. Так, через 6 ч его содержание повысилось на 10,17 %, а через 24 ч – на 8,5 % по сравнению с интактными животными. По

сравнению с животными с кровопотерей его содержание достоверно повысилось через 6 ч на 29,79 %, а через 24 ч – на 15,62 %.

Однократное введение АК интактным животным в дозе 100 мг/кг в ЭК (контроль) вызывает достоверное повышение уровня общего белка в сыворотке крови крыс на 7,20 % (с 70,80±4,56 до 75,90±4,33 г/л).

Как видно из данных табл. 2, однократное введение АК и через 6 ч, и через 24 ч после кровопотери способствует повышению уровня общего белка в сыворотке крови экспериментальных животных как по сравнению с интактными животными, так и по сравнению с животными с кровопотерей. Так, по отношению к содержанию общего белка у животных с кровопотерей его содержание в условиях коррекции через 6 ч достоверно повысилось на 29,86 % (с 61,52±4,41 до 79,89±4,88 г/л), а через 24 ч – на 20,14 % (с 66,44±4,41 до 79,82±2,97 г/л). По сравнению с интактными животными содержание общего белка через 6 ч достоверно повысилось на 12,84 %, а через 24 ч – на 12,74 %.

Таким образом, направленный транспорт в печень АК в ЭК в дозе 100 мг/кг приводит к достоверному повышению содержания общего белка в сыворотке крови на обоих изученных сроках после кровопотери.

Исследование показало (табл. 3), что введение АК интактным животным в дозе 25 мг/кг после включения в ЭК (контроль) не вызывает достоверного изменения процентного содержания альбуминов по сравнению с их уровнем в сыворотке интактных крыс, однако имеется тенденция к повышению.

Процентное содержание альбуминов через 6 и 24 ч после кровопотери при введении АК недостоверно отличалось от их содержания у интактных животных, но при этом имело тенденцию к повышению.

По сравнению с данными животных с кровопотерей содержание альбуминов через 6 ч имело тенденцию к снижению, а через 24 ч осталось на том же уровне.

Таким образом, однократное введение АК в дозе 25 мг/кг после кровопотери сохраняет процентное содержание альбуминов на уровне показателей интактных животных.

Таблица 3

Влияние адресной доставки АК в печень в дозировках 25, 50 и 100 мг/кг на содержание альбуминов в сыворотке крови белых крыс (M±m, n=12), %

Условия эксперимента	Доза аскорбиновой кислоты		
	25 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг
Контроль	49,29±2,02	47,79±5,84	56,24±1,95*
Направленный транспорт (6 ч)	49,30±1,51	46,53±3,24	59,83±3,43*^
Направленный транспорт (24 ч)	49,34±3,57	46,93±1,04	56,81±2,56*^

Примечание: * – достоверность различий по отношению к интактным животным; ^ – достоверность различий по отношению к животным с кровопотерей.

При введении АК интактным животным в дозе 50 мг/кг после предварительного включения ее в ЭК процентное содержание альбуминов достоверно не отличается от их содержания у интактных животных.

Введение АК ни через 6 ч, ни через 24 ч не вызывает достоверного изменения содержания альбуминов как по сравнению с интактными животными, так и по сравнению с данными животных с кровопотерей.

Результаты исследования показали, что направленный транспорт в печень АК в дозе 50 мг/кг сохраняет уровень процентного содержания альбуминов экспериментальных животных в норме на всех изучаемых сроках;

содержание альбуминов недостоверно отличается от уровня интактных животных.

Введение АК интактным животным в дозе 100 мг/кг путем направленного транспорта в печень вызывает достоверное изменение содержания альбуминов в сыворотке крови крыс в сторону повышения с 47,53±4,40 до 56,24±1,95 %, что составляет 118,33 % по сравнению с группой интактных животных.

При введении АК животным после кровопотери содержание альбуминов через 6 ч достоверно повысилось на 14,53 % (с 52,24±6,71 до 59,83±3,43 %), а через 24 ч – на 13,71 % (с 49,96±6,82 до 56,81±2,56 %) по сравнению с животными с кровопотерей.

По сравнению с интактными животными содержание альбуминов через 6 ч тоже достоверно повысилось на 25,88 %, а через 24 ч – на 19,52 %.

Как следует из представленных материалов, однократное введение АК в дозе 100 мг/кг после кровопотери при использовании ЭК на всех изученных сроках сохраняет повышенное содержание альбуминов в сыворотке крови крыс.

Можно полагать, что эффективность АК в дозе 100 мг/кг связана с оказываемым ею мембраностабилизирующим и антиоксидантным действием в гепатоцитах. АК как донор электронов может отдавать их свободным радикалам и снижать их реактивность. Кроме того, аскорбиновая кислота в гетерогенных системах, содержащих липидную и водную фазы, выводит радикалы из легкоокисляющейся липидной фазы в водную [18]. В экспериментальных исследованиях было показано, что аскорбиновая кислота может восстанавливать α -токоферильный радикал, тем самым возвращая α -токоферолу антиоксидантные свойства [4]. Аскорбиновая кислота инициирует включение железа плазмы в состав тканевого ферритина, тем самым связывая каталитически активные формы железа, вызывающие перекисное окисление фосфолипидов [21].

Выводы:

1. В условиях кровопотери содержание общего белка в сыворотке крови крыс через 6 ч после кровопотери достоверно снижается, а через 24 ч уже имеет тенденцию к нормализации. В то же время в содержании альбуминов в сыворотке крови прослеживается тенденция к увеличению на обоих сроках исследования по сравнению с их содержанием в сыворотке крови интактных крыс, что, вероятно, является компенсаторным явлением в условиях кровопотери.

2. Введение АК после кровопотери в эритроцитарных контейнерах во всех изученных дозах сохраняет повышенный уровень общего белка в сыворотке крови экспериментальных животных.

3. Введение АК в эритроцитарных носителях в дозах 25 и 50 мг/кг нормализует содержание альбуминов в сыворотке крови, а в

высоких дозах (100 мг/кг) – значительно повышает, в результате чего повышается и коллоидно-осмотическое давление в условиях кровопотери.

1. *Биленко М. В.* Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения) / М. В. Биленко. – М. : Медицина, 1989. – 368 с.

2. *Бугаев А. А.* Заготовка аутоплазмы и проведение аутоплазматрансфузий при хирургическом лечении гинекологических больных / А. А. Бугаев, Ю. В. Цвелев, С. П. Калеко // Журн. акушерства и женских болезней. – 2003. – Т. LII, № 4. – С. 33–37.

3. *Буеров А. О.* Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени / А. О. Буеров // Российский журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2002. – № 4 – С. 21–25.

4. Возможности использования антиоксидантов и антигипоксантов в экспериментальной и клинической медицине / Н. П. Чеснокова [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 8. – С. 18–25.

5. Гемореологические изменения при различных видах гипоксии / А. Н. Тулупов [и др.] // Скорая медицинская помощь. – 2006. – № 1. – С. 64–72.

6. *Генинг Т. П.* Эритроциты млекопитающих в направленном транспорте биологически активных веществ / Т. П. Генинг. – Ульяновск : УЛГУ, 1996. – 306 с.

7. *Данаа Л. С.* Влияние плазмозамещающей терапии на показатели доставки и утилизации кислорода / Л. С. Данаа, А. Г. Самохин // Вестн. Новосибирского гос. ун-та. Сер. Биология, клиническая медицина. – 2009. – Т. 7, № 1. – С. 111–117.

8. *Жибурт Е. Б.* Современная терапия острой массивной кровопотери / Е. Б. Жибурт, Г. Р. Иваницкий, С. Ю. Пушкин // Тихоокеанский медицинский журн. – 2004. – № 4. – С. 11–15.

9. *Коваленко Н. Я.* Органоспецифические особенности кровоснабжения печени, почек и мозга при острой кровопотере у крыс с различной устойчивостью к циркуляторной гипоксии / Н. Я. Коваленко, Д. Д. Мациевский, Ю. В. Архипенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2001. – № 2. – С. 20–22.

10. *Коваленко Н. Я.* Роль различных подтипов мускариновых холинорецепторов в развитии постгеморрагических нарушений системного и портального кровообращения у крыс / Н. Я. Коваленко, Д. Д. Мациевский, В. В. Решетняк // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – № 9. – С. 260–264.

11. *Коваленко Н. Я.* Центральное кровообращение у крыс с различной устойчивостью к острой кровопотере / Н. Я. Коваленко, Д. Д. Мациев-

ский, Ю. В. Архипенко // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 1998. – № 10. – С. 384–388.

12. Медицинские лабораторные технологии и диагностика : справ. / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1999. – Т. 2. – 656 с.

13. Механизмы развития острой гипоксии и пути ее фармакологической коррекции / М. А. Евсеева [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 3–25.

14. Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы / А. Г. Ивонин [и др.] // Известия Коми научного центра УрОРАН. – 2012. – № 9. – С. 46–55.

15. *Провоторов В. М.* Роль и место эритроцитов в системе направленного транспорта различных фармакологических средств / В. М. Провоторов, Г. А. Иванова // Клиническая медицина. – 2009. – № 9. – С. 4–8.

16. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А. П. Шепелев [др.] // Вопросы медицинской химии. – 2000. – № 2. – С. 110–116.

17. *Тимербулатов Ш. В.* Определение объема и степени острой кровопотери / Ш. В. Тимербулатов // Медицинский вестн. Башкортостана. – 2012. – Т. 7, № 2. – С. 69–72.

18. *Токаев Э. С.* Биологически активные вещества, улучшающие функциональное состояние печени / Э. С. Токаев, Н. П. Блохина, Е. А. Некрасов // Вопросы питания. – 2007. – № 4. – С. 4–8.

19. *Цой О. Г.* Клетки крови как транспортные системы целенаправленной доставки лекарственных препаратов / О. Г. Цой, Е. А. Тайгулов, Ю. Ш. Иманбаева // Астана Медициналык журналы. – 2011. – Т. 66, № 4. – С. 7–12.

20. *Шевченко Ю. Л.* Трансфузионные осложнения и их профилактика / Ю. Л. Шевченко, М. Ф. Заривчацкий, Е. Б. Жибурт // Руководство по общей и клинической трансфузиологии / Ю. Л. Шевченко [и др.]. – СПб. : Фолиант, 2003. – С. 561–588.

21. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives / H. Wakabayashi [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1999. – № 63 (5). – P. 955–957.

22. *Kamiyoshihara M.* The utility of an autologous blood salvage system in emergency thoracotomy for a hemothorax after chest trauma / M. Kamiyoshihara, T. Ibe, I. Takeyoshi // Gen. Thorac. Surg. – 2008. – № 56 (5). – P. 222–225.

23. *Sapirstein R. A.* Effect of hemorrhage on the cardiac output and its distribution in the rat / R. A. Sapirstein, E. H. Sapirstein, A. Bredemeyer // Circ. Res. – 1960. – № 8. – P. 135–147.

EFFICIENCY OF AUTOLOGOUS BLOOD CELLS USING FOR TARGETED DELIVERY OF ASCORBIC ACID TO THE LIVER IN ORDER TO OPTIMIZE THE COLLOID OSMOTIC PRESSURE OF BLOOD AFTER HEMORRHAGE

D.A. Kseyko, T.P. Gening

Ulyanovsk State University

The estimating results of efficiency of autologous blood cells using for targeted delivery of ascorbic acid at doses of 25, 50, 100 mg/kg to the liver in order to optimize the colloid osmotic pressure of blood after hemorrhage are presented. One of the key trends emerging in modern pharmacology is creating of systems of targeted transport of drugs. It allows concentrating the drug in the area covered by the pathological process and eliminates the process and its negative effects. The erythrocytic containers with ascorbic acid were produced according to the method of hypotonic lysis. It has been shown that the most effective of the used doses is 100 mg/kg, as when using it total protein content increased by raising the percentage of albumin in the blood serum that determines its colloid osmotic pressure.

Keywords: blood loss, hypoxia, protein synthesis, ascorbic acid, albumin, protein metabolism, colloid osmotic pressure, directed transport, erythrocytes.