

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 14188

(13) С1

(46) 2011.04.30

(51) МПК (2009)

A 61K 33/00

A 61K 33/26

A 61P 9/00

(54) СРЕДСТВО, УВЕЛИЧИВАЮЩЕЕ СРОДСТВО ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ

(21) Номер заявки: а 20081704

(22) 2008.12.29

(43) 2010.08.30

(71) Заявитель: Учреждение образования
"Гродненский государственный ме-
дицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Ходосовский Михаил Ни-
колаевич; Зинчук Виктор Влади-
мирович (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение обра-
зования "Гродненский государствен-
ный медицинский университет" (ВУ)

(56) SU 442421, 1974.

SU 1608583 A1, 1990.

БОРИСОВА А.Г. и др. Экология. Экс-
периментальная генетика и физиоло-
гия. Труды Карельского научного
центра РАН. Вып. 11. Петрозаводск,
2007, С. 10-13.

ХОДОСОВСКИЙ М.Н. и др. Бюлле-
тенъ экспериментальной биологии и
медицины. - 2006. - Т. 142. - № 12. -
С. 631-634.

(57)

Применение нитропрусида натрия в качестве средства, увеличивающего сродство ге-
моглобина к кислороду при ишемии-реперфузии печени.

Изобретение относится к области медицины, а именно к применению лекарственных
средств по новому назначению.

Повреждения печени после ишемии-реперфузии часто встречаются в клинике при ре-
зекциях, трансплантации органа, а также при геморрагическом шоке с последующим воз-
мещением кровопотери [1, 2]. Важным механизмом данных повреждений является
истощение факторов антиоксидантной защиты при одновременной активации свободнора-
дикальных процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран
клеток печени (окислительный стресс), что приводит клетки к гибели от некроза или
апоптоза [3]. Кислородзависимая природа образования свободных радикалов предполагает
влияние кислородтранспортной функции (КТФ) крови на активность процессов ПОЛ в
биологических системах [4]. Показано, что сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина
(КДО) вправо, т.е. уменьшение сродства гемоглобина к кислороду (СГК), имеющий поло-
жительное значение на начальных этапах ишемии, в условиях восстановления кровотока
не способствует поддержанию оптимального уровня прооксидантно-антиоксидантного
состояния печени [5]. Установлено, что изменение режима кислородного снабжения орга-
низма может влиять на глубину нарушений прооксидантно-антиоксидантного состояния и
тяжесть повреждений печени после ишемии-реперфузии, причем степень последних
меньше, когда КДО в конце реперфузии находится левее, чем у контрольных животных

[6]. Выявлено, что предварительная гипербарическая оксигенация ослабляет ишемические и реперфузионные повреждения печени [7], что, возможно, обусловлено наблюдаемым смещением КДО влево, возникающим как следствие гипероксии [8].

Таким образом, изложенные факты указывают на необходимость разработки новых способов модификации СГК при ишемии-реперфузии печени.

Известен способ направленного снижения СГК с помощью RSRI3, который способствует уменьшению развивающихся повреждений нейронов при неполной ишемии головного мозга [9].

Недостатком данного способа является то, что при более глубокой, "глобальной" ишемии этот защитный эффект не наблюдается, возможно, в связи с изменением соотношения доноров и акцепторов электронов при ишемических состояниях различной степени тяжести.

Также установлен эффект ингибитора NO-синтазы на СГК при лихорадке [4]. Хотя в данном случае КДО смещалась влево, что сопровождалось уменьшением активности ПОЛ, недостатком способа является тот факт, что ингибиторы NO-синтазы, как правило, оказывают неблагоприятный эффект при ишемии - реперфузии печени [10].

Известно, что гипероксия способствует смещению КДО влево [8]. Описан способ предварительной гипербарической оксигенации для уменьшения тяжести ишемических и реперфузионных повреждений печени [7]. Недостаток метода заключается в том, что он требует дорогостоящего оборудования. Кроме того, высокие концентрации кислорода могут оказать токсическое действие на ткани, усугубляя реперфузионные повреждения организма [11].

Задача изобретения - расширение арсенала средств, модифицирующих СГК при ишемии-реперфузии печени.

Поставленная задача решается применением нитропруссид натрия в качестве средства, увеличивающего сродство гемоглобина к кислороду при ишемии-реперфузии печени.

Нитропруссид натрия ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$) - высокоэффективный периферический вазодилататор. Расширяет артериолы и частично вены, при внутривенном введении оказывает быстрый гипотензивный эффект, улучшает показатели сердечной гемодинамики. Применяют нитропруссид натрия при острой сердечной недостаточности, сердечной астме, гипертонических кризах. Механизм действия нитропруссид натрия связывают с нитрозогруппой (NO), соединенной через группы CN с атомом железа. Однако из известных свойств не вытекает, что можно использовать препарат для модификации СГК при ишемии-реперфузии печени.

Для доказательства возможности использования изобретения мы исследовали влияние нитропруссид натрия на показатели КТФ крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов. Ишемию печени вызывали наложением сосудистого зажима на а. hepatica propria в течение 30 мин, после снятия зажима реперфузионный период длился 120 мин. Исследовали показатели КТФ (СГК, $p\text{O}_2$, $p\text{CO}_2$, pH, ABE и др.) печеночной и смешанной венозной крови на протяжении ишемии-реперфузии печени. Установлено, что сдвиг КДО вправо, наблюдаемый после ишемии, усиливается в конце реперфузионного периода. Инфузия нитропруссид натрия перед началом реперфузионного периода предотвращала данные изменения СГК после ишемии, а также способствовала уменьшению правостороннего сдвига КДО в конце реперфузии.

Работа выполнена на взрослых кроликах-самцах весом 3,5-4,5 кг, предварительно выдержанных в стандартных условиях вивария. Анестезия поддерживалась внутривенной инфузией калипсола (1,5 мг/кг/мин). Ишемию печени вызывали наложением сосудистого зажима на а. hepatica propria в течение 30 мин, реперфузионный период длился 120 мин.

Вводили катетеры: один - в а. hepatica для взятия печеночной венозной крови, а другой - в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Забор образцов крови

для оценки показателей КТФ крови осуществляли до, в конце ишемии и через 120 мин после ее прекращения.

Животных разделили на 2 экспериментальные группы: в 1-ой - моделировали ишемию-реперфузию печени ($n = 10$), во 2-ой - на фоне ишемии-реперфузии печени проводили внутривенную инфузию нитропруссид натрия (Sigma, США) в дозе 2,5 мг/кг, которую начинали за 5 мин до начала реперфузионного периода ($n = 8$).

На микрогазоанализаторе ABL-330 "Radiometer" (Дания) оценивали показатели КТФ крови: $p50_{\text{станд}}$, $p50_{\text{реал}}$, pO_2 , pCO_2 , pH, бикарбонат плазмы (HCO_3^-), общий CO_2 плазмы (TCO_2), действительный избыток оснований (АВЕ). СГК определяли по показателю $p50$ (pO_2 крови, соответствующее 50 % насыщению ее кислородом) методом "смешивания" [12]. $p50_{\text{станд}}$ измеряли при стандартных условиях (pH = 7,4; $pCO_2 = 40$ мм рт.ст. и $T = 37$ °C), а $p50_{\text{реал}}$ - рассчитывали для реальных значений этих факторов. На основании полученных значений $p50$ по уравнению Хилла высчитывали положение кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО).

Статистическую обработку полученных данных проводили в зависимости от нормальности распределения выборок с использованием t-критерия Стьюдента для параметрических и U-теста Манн-Уитнея для непараметрических данных. Достоверным считали различие при вероятности $p < 0,05$.

В табл. 1 приведена динамика изменений показателей КТФ печеночной венозной крови у кроликов обеих групп при ишемии-реперфузии ($M \pm m$).

В табл. 2 показано влияние нитропруссид натрия на параметры КТФ смешанной венозной крови у кроликов при ишемии-реперфузии ($M \pm m$).

В 1-ой группе ишемия печени приводила к падению pO_2 печеночной венозной крови на 26,25 % от исходного уровня. Во 2-ой группе в конце ишемии pO_2 печеночной венозной крови снижалось на 28 % ($p < 0,05$). Одновременно в 1-ой группе животных наблюдалось смещение КДО вправо (увеличение показателя $p50_{\text{реал}}$ на 11,3 % ($p < 0,05$) в печеночной и на 11,8 % ($p < 0,05$) в смешанной венозной крови). После восстановления артериального кровотока в печени у кроликов 1-ой группы сдвиг КДО вправо сохранялся и на 120 мин реперфузии в печеночной и смешанной венозной крови показатель $p50_{\text{реал}}$ увеличился на 24,7 % и 24,4 % соответственно. В обеих экспериментальных группах во всех образцах венозной крови наблюдалось снижение показателей кислотно-основного состояния (КОС): pH, АВЕ, HCO_3^- , TCO_2 , SBE, and SBC в течение ишемии-реперфузии печени. Эти изменения кислотно-основного состояния были значительнее в конце реперфузии во 2-ой группе кроликов по сравнению с 1-ой группой. Однако при инфузии нитропруссид натрия на 30 мин ишемии показатель $p50_{\text{реал}}$ существенно не изменялся в обоих образцах крови. После ишемии данный показатель был значительно меньше, чем у животных 1-ой группы в смешанной венозной крови. Инфузия нитропруссид натрия приводила к существенной разнице в положении КДО, рассчитанном по показателю $p50_{\text{станд}}$, печеночной и смешанной венозной крови на 120-ой мин реперфузии между животными обеих групп, причем у животных 2-ой группы КДО располагалась левее, чем у животных 1-ой (фигура).

Эксперименты показали, что ишемия-реперфузия печени приводит к существенным изменениям параметров КТФ крови, особенно показателей кислотно-основного состояния и СГК. В обеих экспериментальных группах параметры кислотно-основного состояния (pH, АВЕ, HCO_3^- , TCO_2 , SBE и SBC) снижались после ишемии, свидетельствуя о развитии метаболического ацидоза, который неизбежен после ишемии такого крупного внутреннего органа, как печень. Данные изменения кислотно-основного состояния были более выражены во 2-ой группе, чем в 1-ой группе в конце реперфузии. Известно, что ацидоз приводит к уменьшению СГК (эффект Бора). Согласно полученным данным об изменении КОС, можно было бы предположить, что во 2-ой экспериментальной группе СГК должно было бы быть меньше, чем в 1-ой в конце реперфузии. Однако при инфузии нитропрусси-

ВУ 14188 С1 2011.04.30

да натрия в обоих образцах венозной крови на 30 мин ишемии показатель $p50_{\text{реал}}$ существенно не изменялся по отношению к исходному уровню, а для смешанно венозной крови был значительно ниже, чем в 1-ой группе в соответствующий период. На 120-ой мин реперфузии инфузия нитропруссид натрия приводила к сдвигу КДО влево ($p50_{\text{станд}}$ меньше в обоих образцах венозной крови) по отношению к соответствующему периоду у животных 1-ой группы, указывая на способность нитропруссид натрия модифицировать СГК в конце реперфузионного периода.

Таблица 1

Влияние нитропруссид натрия на показатели кислородтранспортной функции печеночной венозной крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов ($M \pm m$)

Показатель	1-ая группа			2-ая группа		
	Исходный уровень	30 мин ишемии	120 мин реперфузии	Исходный уровень	30 мин ишемии	120 мин реперфузии
n	10	9	7	8	8	8
$p50_{\text{реал}}$, мм рт.ст.	32,1±0,9	35,8±1,4*	40,1±1,8*	29,9±1,0	31,5±2,0	37,9±2,4*
$p50_{\text{станд}}$, мм рт.ст.	26,9±0,6	28,4±0,8	28,0±0,7	26,9±0,9	25,9±1,9	23,4±1,8#
pO_2 , мм рт.ст.	30,4±3,0	22,4±2,3	25,1±3,7	37,8±1,7	26,4±3,6*	27,6±3,8*
pH, ед.	7,308±0,024	7,262±0,017	7,156±0,035*	7,380±0,028	7,293±0,016*	7,051±0,062*
pCO_2 , мм рт.ст.	53,7±2,7	58,7±3,4	62,1±1,8*	40,8±2,1#	45,3±3,0#	58,3±7,3*
HCO_3^- , ммоль/л	26,2±1,1	25,5±0,8	21,4±0,9*	24,6±0,9	22,1±1,2#	16,0±1,2*#
TCO_2 , ммоль/л	27,9±1,1	27,3±0,9	23,2±0,8*	25,8±0,9	23,5±1,2#	18,0±1,1*#
ABE, ммоль/л	-0,27±1,2	-1,72±0,7	-6,96±1,3*	0,13±1,1	-3,7±1,1*	-14,1±1,9*#
SBE, ммоль/л	0,24±1,2	-1,1±0,7	-6,26±1,2*	-0,69±1,2	-4,6±1,2*#	-15,3±2,0*#
SBC, ммоль/л	23,5±1,0	22,1±0,6	18,0±1,0*	24,3±0,9	20,9±0,8*	12,6±1,6*#

* - достоверная разница по отношению к исходному уровню в каждой группе ($p < 0,05$).

- достоверная разница между 1-ой и 2-ой группами для соответствующего периода ($p < 0,05$).

Таблица 2

Влияние нитропруссид натрия на показатели кислородтранспортной функции смешанной венозной крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов ($M \pm m$)

Показатель	1-ая группа			2-ая группа		
	Исходный уровень	30 мин ишемии	120 мин реперфузии	Исходный уровень	30 мин ишемии	120 мин реперфузии
n	10	9	7	8	8	8
$p50_{\text{реал}}$, мм рт.ст.	32,6±1,1	36,4±1,1*	40,5±1,9*	30,4±0,8	32,5±0,6#	39,1±1,4*
$p50_{\text{станд}}$, мм рт.ст.	26,8±0,7	28,8±0,7	28,0±0,8	26,3±0,3	26,6±0,5	24,5±1,0#

Продолжение таблицы 2

Показатель	1-ая группа			2-ая группа		
	Исходный уровень	30 мин ишемии	120 мин реперфузии	Исходный уровень	30 мин ишемии	120 мин реперфузии
n	10	9	7	8	8	8
pO ₂ , мм рт.ст.	35,3±2,0	38,8±2,2	28,9±2,6	38,1±4,9	35,4±4,4	33,8±5,7
pH, ед.	7,293±0,015	7,260±0,018	7,146±0,036*	7,337±0,015	7,290±0,012*	7,026±0,057*
pCO ₂ , мм рт.ст.	55,8±2,1	56,9±2,9	60,2±2,1	44,1±0,9#	43,1±2,5#	60,4±7,6*
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	26,6±0,9	24,7±0,6	20,6±0,9*	24,0±0,9	21,0±1,3#	15,4±1,3*#
TCO ₂ , ммоль/л	28,4±0,9	26,6±0,7	22,5±0,8*	25,3±0,9#	22,4±1,4#	17,2±1,4*#
ABE, ммоль/л	-0,22±0,9	-2,6±0,6	-7,7±1,3*	-1,3±1,1	-4,7±1,3*	-14,3±1,9*#
SBE, ммоль/л	0,39±0,9	-1,9±0,6	-7,1±1,2*	-2,0±1,1	-5,7±1,5#	-15,7±2,0*#
SBC, ммоль/л	23,7±0,8	21,7±0,5	17,4±1,0*	23,2±0,8	20,4±0,9*	12,7±1,6*#

* - достоверная разница по отношению к исходному уровню в каждой группе (p < 0,05).

- достоверная разница между 1-ой и 2-ой группами для соответствующего периода (p < 0,05).

Известно, что взаимодействие оксида азота с гемоглобином может приводить к разнонаправленным изменениям СГК, которые реализуются через образование нитрозилгемоглобина (HbFe²⁺NO) или S-нитрозогемоглобина (SNO-Hb) [13]. Возможно, в течение ишемии-реперфузии печени нитропруссид натрия увеличивает СГК за счет высвобождения оксида азота и последующего формирования S-нитрозогемоглобина. Кроме того, смещение КДО влево в реперфузионном периоде может быть одним из механизмов положительного влияния нитропрусида натрия на прооксидантно-антиоксидантное состояние печени при ишемии-реперфузии [14].

Таким образом, нитропруссид натрия действительно увеличивает средство гемоглобина к кислороду при ишемии-реперфузии печени.

Источники информации:

1. Glantzounis G.K., Salacinski H.J., Yang W. et al.//Liver Transpl. - 2005. - Vol. 11. - No. 9. - P. 1031-1047.
2. Cerwenka H., Khoschorur G., Bacher H. et al.//Free Radic. Res. - 1999. - Vol. 30. -No. 6. - P. 463-469.
3. Jaeschke H., Lemasters J.J.//Gastroenterology. - 2003. - Vol. 125. - No. 4. - P. 1246-1257.
4. Zinchuk V.V. Respiration. - 1999. - Vol. 66. - No. 5. - P. 448-454.
5. Зинчук В.В., Ходосовский М.Н., Дремза И.К. Патол. физиология и эксперим. терапия. - 2002. - № 4. - С. 8-11.
6. Zinchuk V.V., Khodosovsky M.N., Maslakov D.A. Physiol. Res. - 2003. - Vol. 52. - No. 5. - P. 533-544.
7. Chen M.F., Chen H.M., Ueng S.W. et al. Liver. - 1998. - Vol. 18. - No. 2. - P. 110-116.
8. Иржак Л.И., Гладиллов В.В., Мойсеенко Н.А. Дыхательная функция легких в условиях гипероксии. - М.: Медицина, 1985.
9. Grocott H.P., Bart R.D., Sheng H. et al. Stroke. - 1998. - Vol. 29. - No. 8. - P. 1650-1655.

BY 14188 C1 2011.04.30

10. Fan C., Zwacka R.M., Engelhardt J.F. J. Mol. Med. - 1999. - Vol. 77. - No. 8. - P. 577-592.
11. Matsumoto F., Sakai H., Yamaguchi M. et al. Eur. Surg. Res. - 1997. - Vol. 29. - No. 6. - P. 429-437.
12. Scheid P., Meyer M. J. Appl. Physiol. - 1978. - Vol. 45. - P. 818-822.
13. Gao A.J., Stamler J.S. Nature. - 1998. - Vol. 391. - P. 169-173.
14. Ходосовский М.Н. Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук. - 2008. - № 3. - С. 23-27.

