

УДК: 616.36-089:615.273

DOI: 10.18413/2313-8971-2015-1-4-9-14

**Алехин С.А.
Колмыков Д.И.
Покровский М.В.****ВЛИЯНИЕ ГРАДИЕНТНЫХ ДОЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО
РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА НА ИШЕМИЧЕСКУЮ
И РЕПЕРФУЗИОННУЮ ТРАВМУ ПЕЧЕНИ**

- 1) кандидат медицинских наук, ассистент кафедры хирургических болезней №2 Курского государственного медицинского университета. ул. К. Маркса 3, г.Курск, РФ, 305041. e-mail: s_alehin@mail.ru
- 2) ассистент кафедры хирургических болезней №2 Курского государственного медицинского университета ул. К. Маркса 3, г.Курск, РФ, 305041. e-mail: kolmikov.dmitrij@yandex.ru
- 3) доктор медицинских наук, профессор; Медицинского института НИУ «БелГУ». ул. Победы, 85, г. Белгород, РФ, 308005. e-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru

Аннотация. В работе исследовано влияние различных доз человеческого рекомбинантного эритропоэтина на скорость объемного кровотока и морфологические изменения в печени при ее ишемической и реперфузионной травме. В ходе исследования показано, что оптимальной прекондиционирующей дозировкой является 50 МЕ/кг.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, печень, кровоток, морфологические изменения.

**Alehin S.A.,
Kolmykov D.I.,
Pokrovsky M.V.****HUMAN RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN GRADIENT DOSAGE
INFLUENCE ON ISCHEMIC AND REPERFUSION LIVER INJURY**

- 1) Phd in Medical Sciences, assistant. Department of Surgery. Kursk State Medical University K.Marksa str.3, Kursk, 305041, Russia. e-mail: s_alehin@mail.ru
- 2) Assistant. Department of Surgery. Kursk State Medical University K.Marksa str.3, Kursk, 305041, Russia. e-mail: kolmikov.dmitrij@yandex.ru
- 3) Doctor of Medical Sciences, Professor; Department of pharmacology Belgorod State National Research University. 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia e-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru

Abstract. We investigate influence of human recombinant erythropoietin different dosage on blood flow velocity and morphological changes in liver during ischemic and reperfusion injury. It was proved what optimal preconditioning dosage is 50 IU/kg.

Key words: ischemia, reperfusion, liver, blood flow, morphological changes.

Ишемические и реперфузионные осложнения занимают лидирующую роль в развитии многих заболеваний органов брюшной полости, в том числе и повреждений печени во время различных хирургических вмешательств сопровождающихся снижением кровотока в печеночных сосудах.

Особый интерес вызывает возможность фармакологического моделирования протекторного действия феномена прямого и дистантного ишемического прекондиционирования.

Наибольший интерес среди целого ряда веществ, в отношении фарммоделирования ишемического прекондиционирования, представляет рекомбинантный человеческий эритропоэтин показавший свою эффективность в защите тканей сердца и головного мозга от патологического влияния ишемии/реперфузии.

Однако, если в отношении защитного влияния рекомбинантного эритропоэтина при ишемии сердца и головного мозга проведено достаточно много исследований и его эффективность однозначно и достоверно доказана, то в отношении ишемических повреждений печени остается много неясного. Так имеются противоречивые данные, как в отношении прекондиционирующих доз, так и в отношении самой возможности фармакологического прекондиционирования эритропоэтином [4, 5].

В связи с чем целью нашей работы стало исследование влияния различных доз человеческого рекомбинантного эритропоэтина на скорость объемного кровотока в печени крыс, как скрининг метода исследования позволяющего оценить микроциркуляторные расстройства, развивающиеся при ишемии/реперфузии.

Материалы и методы: Исследование выполнено на 70 белых крысах (самцы и самки) массой 280 - 300 г. Дизайн исследования состоял из 7 групп, по 10 животных в каждой. Все вмешательства выполнены под общим обезболиванием (золетил 100 в дозе 60 мг/кг и хлоралгидрат в дозе 125 мг/кг внутривенно). Транзиторная глубокая ишемия печени воспроизводилась путем временного пережатия аналога гепатодуоденальной связки на 30 минут с последующим возобновлением кровотока [2, 3]. Человеческий рекомбинантный эритропоэтин («Эпокрин» производства ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА ФГУП, Россия) вводили внутривенно в дозе 50 МЕ/кг за 30 минут до ишемии. Скорость объемной перфузии измеряли при помощи программно-аппаратного комплекса Biopaq systems MP150 с датчиком TSD144 и выражали в перфузионных единицах (ПЕ), во время срединной лапаротомии под общим обезболиванием на всем протяжении исследования [1].

Прямое ишемическое preconditionирование производили за 30 минут до эпизода более глубокой 30 минутной ишемии, путем пережатия аналога гепатодуоденальной связки крысы на более короткий срок 10 минут.

В качестве контрольного метода исследования подтверждающего уровень гепатоцеллюлярного повреждения использовали гистологическое исследование ткани печени, для чего вырезали кусочки размерами 1x1 см в стандартных местах, фиксировали в 10% Таблица), однако статистической разницы между данными группами не установлено. Кроме того, незначительная разница с группой с

нейтральном забуференном формалине по Лили, проводили в этиловых спиртах восходящей крепости, хлороформе, заливали в парафин. С помощью полуавтоматического санного микротомы MC-1 из каждого кусочка получали серийные срезы толщиной 5-6 мкм. Препараты окрашивали гематоксилин и эозином.

В ходе исследования было установлено, что уровень объемного кровотока в интактной печени крысы находится на уровне 850,48±19,75 ПЕ. Эпизод глубокой ишемии приводит к падению перфузии практически до нуля, с восстановлением к первой минуте реперфузии до уровня 120,17±4,7 ПЕ, сменяющейся транзиторной гиперемией до уровня 1983,22±63,35 ПЕ к 15 минуте восстановления кровотока и снижением до 611,63±27,43 ПЕ к 30 минуте. Из полученных данных становится понятно, что оптимальной точкой сравнения является 15 минута восстановления кровотока, как точка с наибольшей волатильностью.

Применение прямого ишемического preconditionирования значительно уменьшает величину транзиторной гиперемии печени, которая к 15 минуте находится на уровне 1338,46± 14,06 ПЕ, уменьшаясь до уровня 500,16± 16,41 ПЕ к 30 минуте исследования скорости объемного кровотока.

При исследовании человеческого рекомбинантного эритропоэтина в дозировках 5, 25, 50, 100, 200, 500 МЕ было установлено, что максимально транзиторную гиперемию уменьшает ЭПО в дозе 200 и 500 МЕ (при применении ЭПО в дозе 100 МЕ делает более предпочтительное использование дозировки 50 МЕ.

Таблица 1

Влияние рекомбинантного человеческого эритропоэтина в различных дозировках на скорость объёмного кровотока в микроциркуляторном русле печени при ишемии и реперфузии (ПЕ) (M±m, n=10)

Table 1

Human recombinant erythropoietin different dosage effect on blood flow velocity in liver microvascular vessels during ischemia and reperfusion (PU) (M±m, n=10)

Группы	15 минута реперфузии
И/Р	1983,22±63,35*
И/Р+ЭПО в дозе 5 МЕ/кг	1856,38±72,12**
И/Р+ЭПО в дозе 25 МЕ/кг	1789,28±22,58**
И/Р+ЭПО в дозе 50 МЕ/кг	1447,93± 23,72**
И/Р+ЭПО в дозе 100 МЕ/кг	1367,81± 34,28**
И/Р+ЭПО в дозе 200 МЕ/кг	1295,26± 54,82**
И/Р+ЭПО в дозе 500 МЕ/кг	1308,14± 31,87**
И/Р+ИПК	1338,46± 14,06**

* – p≤0.05 в сравнении с показателями интактной группы, ** – p≥0,05 – в сравнении с группой ишемии/реперфузии.

* – p≤0.05 versus against intact group data, ** – p≥0,05 – versus against ischemia/reperfusion group data.

Патоморфологическое исследование препаратов печени установило, что ишемическое повреждение проявляется комплексом неспецифических морфологических изменений, характеризующихся резко выраженным малокровием портальных сосудов и синусоидных капилляров, выраженными дистрофическими и некробиотическими изменениями гепатоцитов, а также расстройствами микроциркуляции в виде стазов (

Реперфузионная травма морфологически проявлялась резкой дилатацией, полнокровием синусоидальных капилляров, очагами изменений по типу диапедезных кровоизлияний, нарастанием дистрофических и некробиотических изменений гепатоцитов с вакуолизацией цитоплазмы и явлениями кариопикноза ядер гепатоцитов (Рисунок 2).

Рисунок 1).

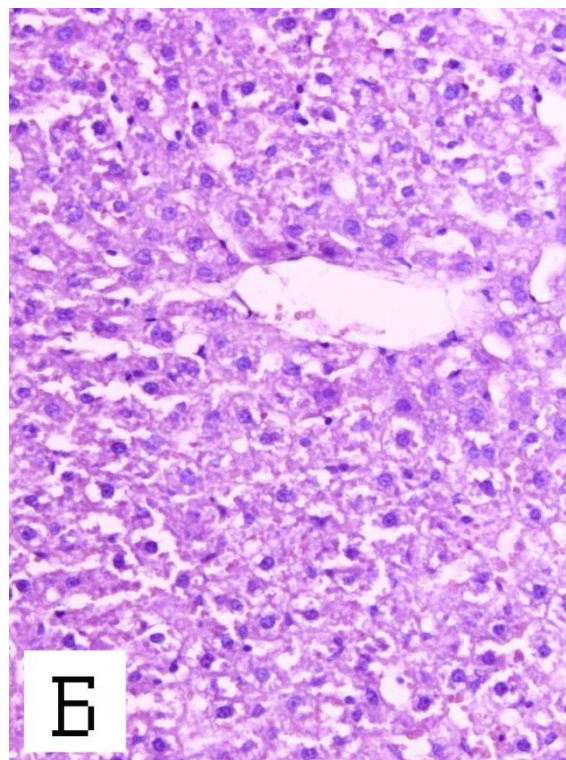
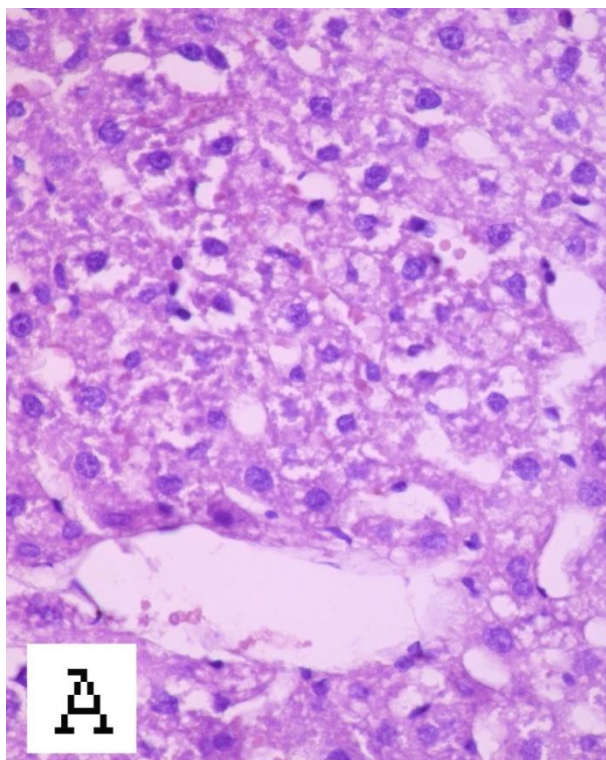


Рисунок 1. Ишемическое повреждение печени: центролобулярное малокровие, мелкозернистая дистрофия печени.

Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. А) X 200. Б) X400

Figure 1. Ischemic liver injury: centrilobular anaemia, compact grain liver dystrophy. Hematoxylin and eosin dye.

Microphoto. А) X 200. Б) X400

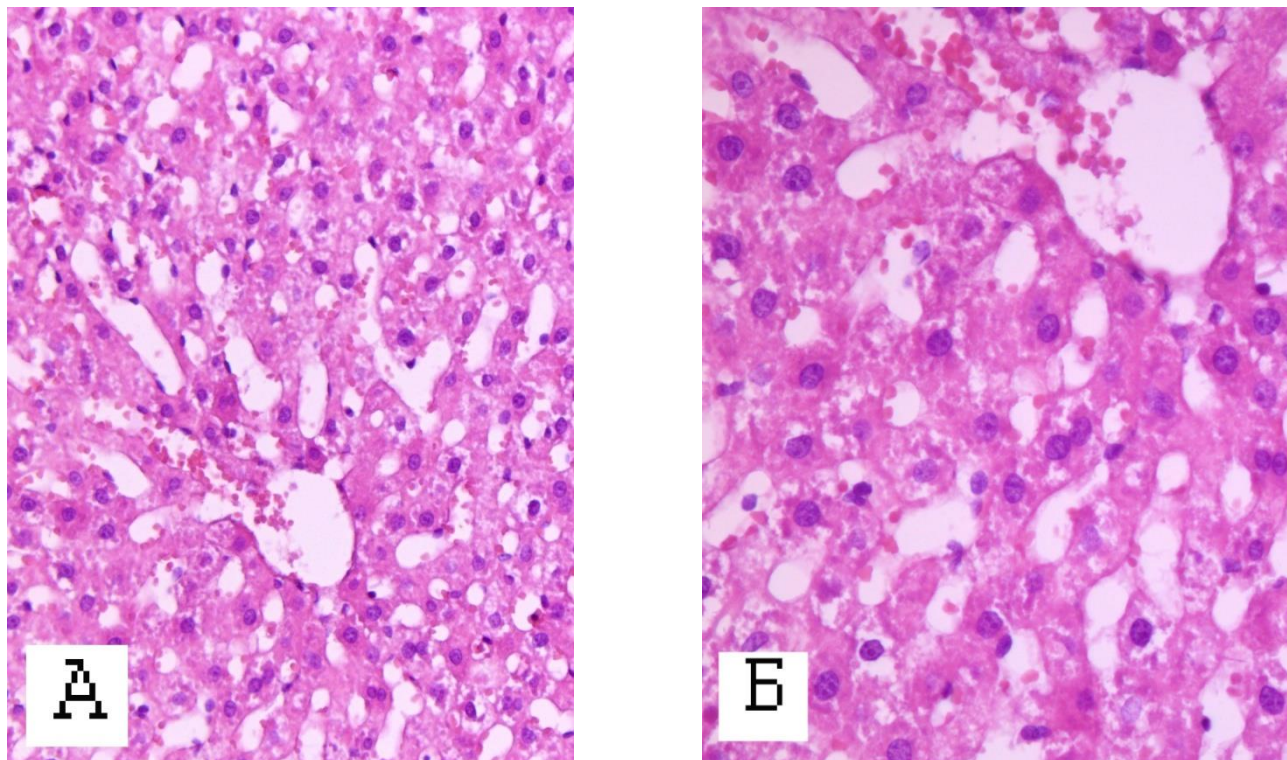


Рисунок 2. Реперфузионное повреждение печени: тяжелые некробиотические и дистрофические изменения, очаг диапедезного кровоизлияния. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. А) X 200. Б) X400

Figure 2. Reperfusion liver injury: severe necrobiotic and dystrophic changes, diapedetic haemorrhage focus. Hematoxylin and eosin dye. Microphoto. A) X 200. Б) X400

Введение человеческого рекомбинантного эритропоэтина (Эпокрин) в дозе 50 МЕ/кг уменьшает выраженность гепатоцеллюлярного повреждения при ишемии и реперфузии, что выражается в практически полном отсутствии некробиотических изменений к 30 минуте и их незначительной выраженности на 30 минуте восстановления кровотока. Характерным отличием группы с применением рекомбинантного эритропоэтина является отсутствие микротромбозов и кровоизлияний как

при ишемической, так и при реперфузионной травме. Дистрофические изменения более выражены на сроке 30 минут восстановления кровотока и представлены мелкозернистой дистрофией, расстройства микроциркуляции имели место в виде малокровия центролобулярных сосудов на сроке 30 минут ишемии и их полнокровии при восстановлении кровотока (Рисунок 3, Рисунок 4). Микротромбозы и кровоизлияния характерные для группы ишемии/реперфузии отсутствовали.

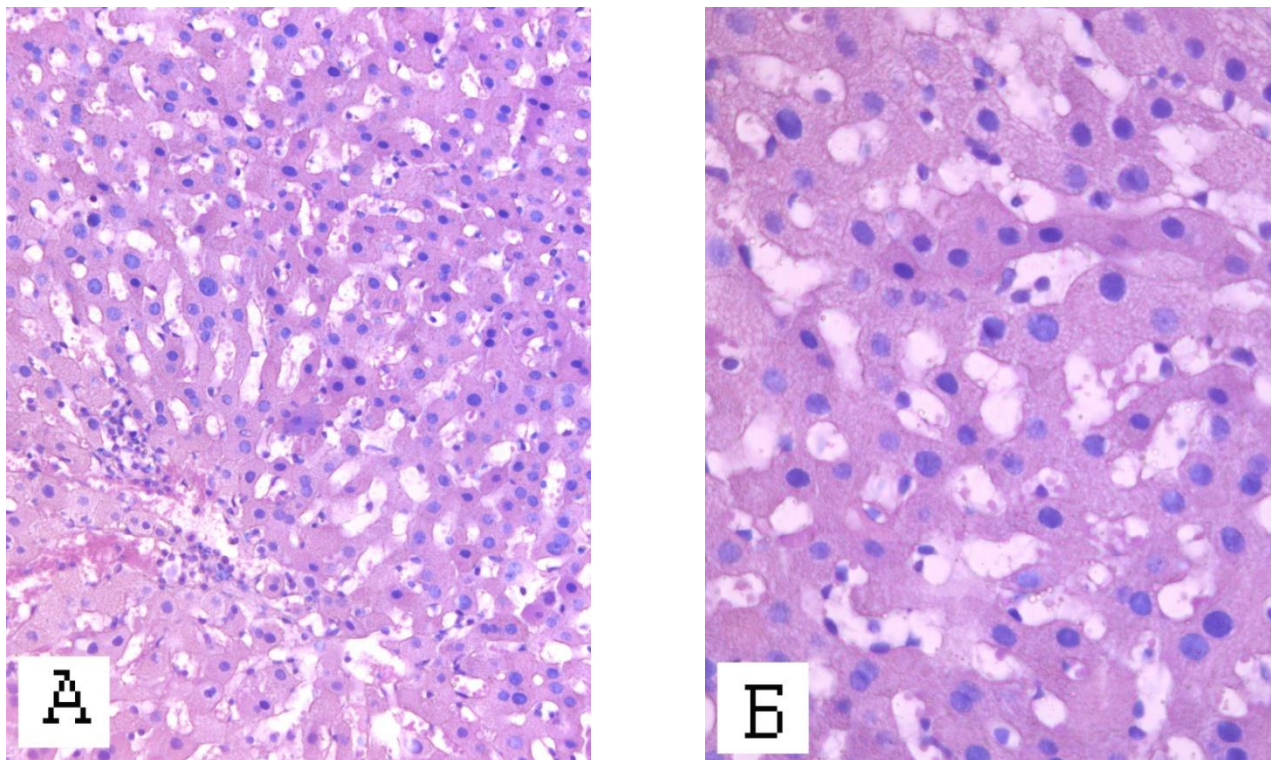


Рисунок 3. Влияние эритропоетина в дозе 50 МЕ/кг на ишемическую травму печени: Умеренное малоокровие центролобулярных сосудов и отсутствие дистрофических явлений. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. А) X 200 Б). X 400.

Figure 3. 50 IU/kg erythropoietin influence on ischemic liver injury: mild centrolobular enimia and absence of dystrophic changes. Hematoxylin and eosin dye. Microphoto. A) X 200. Б) X400

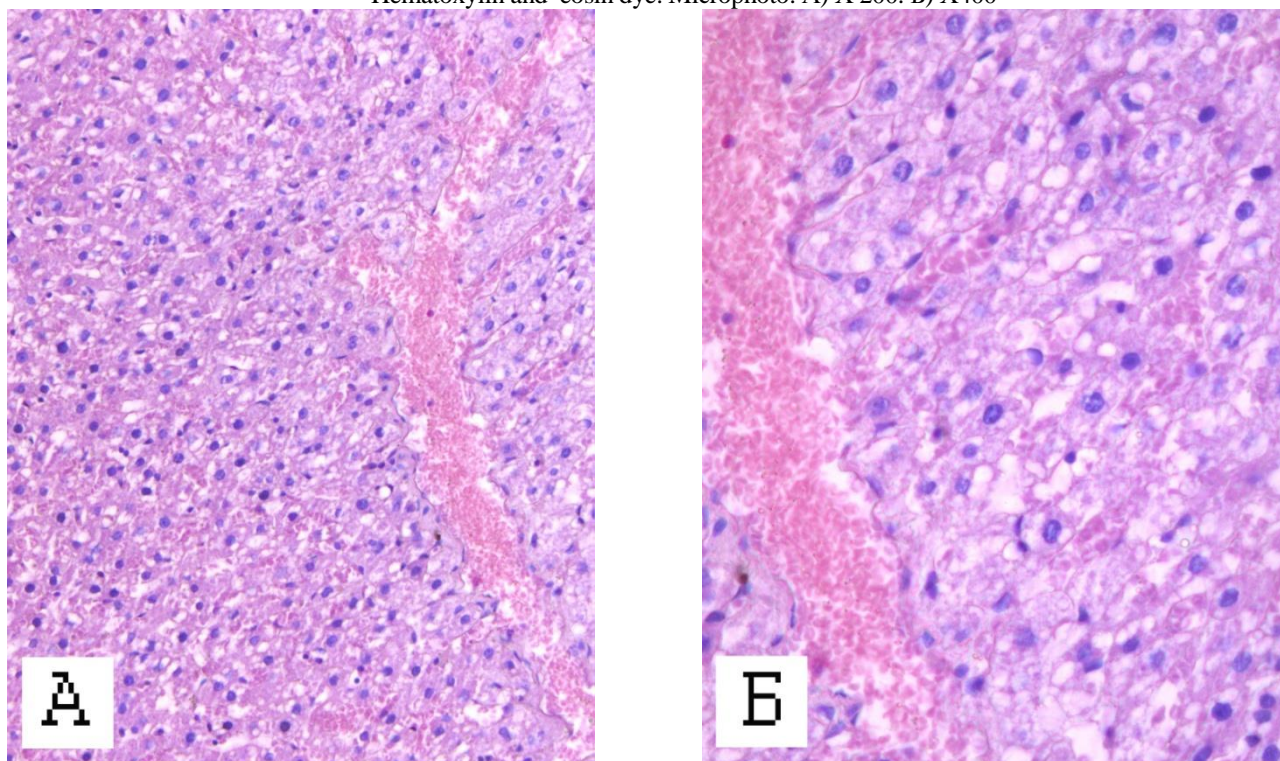


Рисунок 4. Влияние эритропоетина в дозе 50 МЕ/кг реперфузионную травму печени: венозное полнокровие, отсутствие кровоизлияний. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. А) – X 200 Б) – X 400.

Figure 4. IU/kg erythropoietin influence on reperfusion liver injury: venous hyperaemia, absence of hemorrhage. Hematoxylin and eosin dye. Microphoto. A) X 200. Б) X400

Таким образом, в ходе исследования установлено, что оптимальной прекондиционирующей дозировкой человеческого рекомбинантного эритропоэтина является 50 МЕ/кг. Применение ЭПО в данной дозировке в 4,2 эффективнее дозировки 5 МЕ/кг и в 2,7 раза дозировки 25 МЕ/кг в отношении величины развивающейся на 15 минуте восстановления кровотока транзиторной гиперемии определенной методом лазердоплерографической флоуметрии. Положительное влияние человеческого рекомбинантного эритропоэтина в дозе 50 мг/кг подтверждается и данными морфологического исследования и проявляется в отсутствии тромбозом и кровоизлияний, незначительной выраженностью некробиотических изменений в виде центрлобулярных некрозов и венозного полнокровия.

Литература

1. Емельянов, Р.А. Исследование микроциркуляции методом лазердоплерографической флоуметрии в поджелудочной железе при остром экспериментальном панкреатите / Р.А. Емельянов, С.А. Алехин, Д.П. Назаренко // Кубанский научный медицинский вестник. – 2007. – № 1-2. – С. 50-51.
2. Жернакова, Н. И. Прекодиционирование при ишемических и реперфузионных поражениях печени / Н.И. Жернакова, С.А. Алехин, Д.И. Колмыков // Научные ведомости БелГУ. – 2012. – Т. 4(123), № 17/1. – С. 157-162.
3. Жернакова, Н.И. Влияние дистантного и прямого прекодиционирования на динамику

показателей стабильных метаболитов оксида азота при ишемии тонкого кишечника / Н.И. Жернакова, С.А. Алехин, М.В. Покровский // Научные ведомости БелГУ. – 2012. – Т. 4(123), № 17/1. – С. 163-167.

4. Ischemic preconditioning does not improve myocardial preservation during off-pump multivessel coronary operation / H.J. Penttilä, M.V.K. Lepojärvi, K. Paivi [et al.] // *Circulation*. – 2003. – Vol. 75. – P. 1246-1252.

5. Lack of protection of ischaemic preconditioning in the rat model of major hepatectomy with ischaemia reperfusion injury / Y. Qian, Z. Liu, X. Geng [et al.] // *Asian J Sur.* – 2008. – Jul; 31(3). – P. 140-147. DOI: 10.1016/S1015-9584(08)60075-5.

References

1. Emelianov R. A., Alehin S. A., Nazarenko D. P. Microcirculation investigation by laser Doppler flowmetry method in pancreatic gland during acute experimental pancreatitis. *Kuban's scientific bulletin*. №1-2 (2007): P. 50-51.
2. Gernakova N.I., Alehin S. A., Kolmykov D.I. Preconditioning in ischemic and reperfusion liver injury. *Scientific bulletin of BelSU*. V.4(123), 17/1 (2012): P.157-162.
3. Gernakova N.I., Alehin S. A., Pokrovsky M.V. Distant and direct ischemic preconditioning influence on NO stable metabolites dynamic at intestinal ischemia. *Scientific bulletin of BelSU*. V.4(123), 17/1 (2012): P.163-167.
4. Penttilä H.J., Lepojärvi M.V.K., Paivi K. et al. Ischemic preconditioning does not improve myocardial preservation during off-pump multivessel coronary operation. *Circulation*. Vol. 75. (2003): P. 1246-1252.
5. Qian Y, Liu Z, Geng X. Lack of protection of ischaemic preconditioning in the rat model of major hepatectomy with ischaemia reperfusion injury. *Asian J Sur.* Jul; 31(3) (2008): P. 140-147. DOI: 10.1016/S1015-9584(08)60075-5.