



ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ В СОЧЕТАНИИ С РЕКОМБИНАНТНЫМ ЭРИТРОПОЭТИНОМ

Л.М. Даниленко¹
М.В. Покровский¹
О.О. Новиков¹
В.И. Кочкаров¹
А.Е. Королев²
Л.В. Корокина²
Б.В. Трифонов¹
О.В. Харитонова¹

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет

² Курский государственный медицинский университет

e-mail: Danilenko_L@bsu.edu.ru

В статье изложены данные о влиянии дистантного ишемического preconditionирования на воспалительный процесс. Известно, что клетку можно подготовить к резкой смене гипоксии нормоксией, происходящей при ишемии/реперфузии, через адаптацию путем воздействия кратковременных периодов гипоксии, сменяющихся такими же периодами нормоксии, то есть ишемического preconditionирования. Этот защитный механизм является одной из наиболее развиваемых научных проблем, поскольку представляет собой наиболее совершенное природное устройство адаптации к ишемическому стрессу. На уровне организма одним из важных гуморальных эффекторов preconditionирования может являться эритропоэтин (ЭПО). ЭПО проявляет ряд эффектов, связанных с адаптацией к многим видам стресса на уровне ткани, клетки и ряда сигнальных путей. В настоящее время идет интенсивная разработка путей использования рекомбинантного ЭПО для терапии многих патологических состояний человека.

Ключевые слова: preconditionирование, дистантное preconditionирование, эритропоэтин, воспаление.

Введение. В настоящее время вызывает особый интерес среди исследователей изучение механизмов адаптации к ишемии и поиску эндогенных медиаторов, обеспечивающих формирование толерантности сердца к ишемии. Данный интерес к проблеме связан с тем, что подобные подходы в клинической практике помогут существенно увеличить эффективность терапии острого инфаркта миокарда, а также избежать многих осложнений, возникающих как при кардиохирургических вмешательствах, так и связанных с ишемией сердца [8].

Разнообразные, но координированные действия по защите укладываются в концепцию ишемического preconditionирования [3, 7]. В результате сердце приобретает повышенную устойчивость к повреждающему действию длительного нарушения коронарного кровотока. Это проявляется замедлением истощения запасов АТФ в зоне ишемии и уменьшением объема зоны некроза.

Восстановление кровоснабжения органов после определенного периода отсутствия потока приводит к ишемическим паренхиматозным повреждениям. Критический период ишемии у человека зависит от органа и составляет 15-20 мин в печени и почках, 2,5 ч в скелетных мышцах, 5 мин в мозге, что приводит к значительной гибели нейронов и инфаркту [10]. После периода ишемии ткани начинают адаптироваться к анаэробному метаболизму. Ключевым событием на начальном этапе реперфузии является активация макрофагов, которые являются источником внеклеточной активной формы кислорода (АФК). АФК являются основными инициаторами реперфузии повреждений, которые приводят к эндотелиальным повреждениям и дальнейшему освобождению провоспалительных цитокинов [1].

Следует отметить, что одним из звеньев патогенетической адаптации к гипоксии служит увеличение продукции эритропоэтина (ЭПО). Так, количество циркулирующего в плазме ЭПО возрастает примерно в 1000 раз и достигает 5-30 ед/мл. В ответ на снижение кислорода фактор индукции гипоксии (HIF-1 α) активирует выработку ЭПО [12].

В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования явилась оценка местного противовоспалительного эффекта при моделировании дистанционного ишемического preconditionирования и сочетании его с рекомбинантным эритропоэтином.



Материалы и методы исследования. Эксперименты проведены на 40 мышах весом 20-23 грамма и на 12 кроликах-альбиносах весом 2-2,5 кг. Животные находились на стандартном пищевом рационе и получали воду.

Прекодиционирование у данных видов животных проводили на правой задней конечности, наложением жгута на проксимальную часть конечности в течение 10 мин. После прекодиционирования проводилась реперфузия в течение 20 минут. У мышей после этого путем инъекции в правую заднюю стопу 0,02 мл 2% водного раствора формалина моделировали местное воспаление. В левую лапку того же животного параллельно вводили равный объем изотонического раствора NaCl.

Степень воспаления оценивали по приросту массы правой стопы в сравнении с левой стопой того же животного. Противовоспалительный эффект оценивали в сравнении с контрольной группой животных (группа животных без прекодиционирования). Ишемия контролировалась зоной окрашивания при введении синьки Эванса (25 мг/кг, Sigma, США) после освобождения жгута.

У кроликов исследование противовоспалительной активности прекодиционирования проводили по методу Ойвина. Кролики фиксировались, предварительно выстригалась шерсть на коже живота (участок 13 см). При проведении исследования кроликам-альбиносам проводилось прекодиционирование в течение 10 минут, затем проводилась реперфузия в течение 20 минут с последующим введением в краевую вену уха в виде 1%-ного раствора трипановой сини из расчета 2 мл на 1 кг массы животного. Контрольной группе животных внутривенно вводилась вода для инъекций. Затем на участок кожи живота наносили 12 капель 0-ксилола. Показателем проницаемости капилляров служило время появления на коже сине-окрашенных пятен и их диаметр. По разнице во времени появления пятен и их диаметру до и после введения препарата судили о его действии на проницаемость капилляров.

Для оценки противовоспалительной активности эритропоетина за полчаса до прекодиционирования животным вводился рекомбинантный эритропоедин («Эпокрин» эпоэтин альфа; ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых препаратов» Федерального медикобиологического агентства, г. Санкт-Петербург, Россия) подкожно в дозе 50 МЕ/кг.

Результаты исследования и обсуждение. Результаты исследования показали, что моделирование патологии воспаления у мышей характеризовалось резким увеличением отечности и массы стопы на $48,7 \pm 22,2\%$ в сравнении с массой лапки, в которую вводили 0,9%-ный раствор хлорида натрия. Дальнейшее изучение противовоспалительной активности ишемического прекодиционирования у мышей выявило значительное уменьшение степени прироста массы стопы по сравнению с интактными животными и составило $24,7 \pm 12,7\%$, что в 2 раза меньше, чем у животных без прекодиционирования ($48,7 \pm 22,2\%$).

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что однократное внутривенное введение рекомбинантного эритропоедина в дозе 50 МЕ/кг вызывает статистически достоверное уменьшение прироста массы стопы и составляет $29,5 \pm 23,2$ г, по сравнению с интактными животными. А сочетанное применение эритропоедина с прекодиционированием оказывает еще наиболее выраженный противовоспалительный эффект $20,2 \pm 12,6$ г.

Таблица 1

Противовоспалительная активность дистанционного прекодиционирования и рекомбинантного эритропоедина при формалиновом отеке стопы у мышей

Препараты, дозы (мг/кг)	n	Прирост массы стопы %	Ингибирующий эффект %
Контроль	10	$48,7 \pm 22,2$	-
Прекодиционирование	10	$24,7 \pm 12,7^*$	49,4
Эритропоедин	10	$29,5 \pm 23,2^*$	51,5
Эритропоедин + прекодиционирование	10	$20,2 \pm 12,6^*$	54,0

Примечание: * – значения при $p \leq 0,05$ в сравнении с контролем.



Результаты, полученные ранее у мышей, подтвердились и при исследовании антифлогистической активности у кроликов. У группы животных с прекондиционированием также обнаружилось статистически достоверное снижение проницаемости капилляров. Время появления пятен у группы животных с прекондиционированием увеличилось в среднем в 2 раза по сравнению с интактными животными и соответственно составило $387,75 \pm 17,52$ и $218,25 \pm 9,69$ с. Кроме того, у группы животных с прекондиционированием значительно уменьшился размер пятен, который составил $1,64 \pm 0,3$ см², тогда как у интактных – $2,05 \pm 0,2$ см².

Данные, представленные в табл. 2, подтверждают антифлогистическую активность у кроликов при однократном введении рекомбинантного эритропоэтина подкожно в дозе 50 МЕ/кг, который оказывал статистически достоверное антифлогистическое действие, выражающееся в уменьшении диаметра сине-окрашенных пятен и увеличении времени их возникновения $1,03 \pm 0,09$ см² и $493,92 \pm 24,58$ сек.

Сочетанное применение прекондиционирования оказывает наиболее выраженный антифлогистический эффект.

Таблица 2

Противовоспалительная активность дистантного прекондиционирования рекомбинантного эритропоэтина при исследовании антифлогистической активности у кроликов

Препараты	Кол-во пятен	Общая площадь пятен, см ²	Средняя площадь пятен, см ²	Время появления пятен, сек.
Интактные	12	24,58	$2,05 \pm 0,2$	$218,25 \pm 9,69$
Прекондиционирование	12	19,63	$1,64 \pm 0,3$	$387,75 \pm 17,52^*$
Эритропоэтин	12	12,4*	$1,03 \pm 0,09^*$	$493,92 \pm 24,58^*$
Эритропоэтин + прекондиционирование	12	7,9*	$0,67 \pm 0,08^*$	$685,17 \pm 16,83^*$

Примечание: * – при $p < 0,05$ по отношению к интактной группе.

Полученные результаты показывают, что дистантное прекондиционирование оказывает противовоспалительное действие на различных моделях острого воспаления: у мышей 2% водным раствором формалина по методике Ойвина – у кроликов. Так, при прекондиционировании конечности путем наложения жгута на проксимальную часть конечности в течение 10 мин у мышей происходит уменьшение степени прироста массы стопы по сравнению с интактными животными, а у кроликов уменьшается размер пятен и увеличивается время появления пятен.

При проведении прекондиционирования запускаются различные противовоспалительные механизмы. Во-первых, при воспалении повышается уровень свободных радикалов кислорода (СРК), которые, соединяясь с NO, образуют избыточное количество такой реактивной формы кислорода (РФК) как пероксинитрит (NOOO⁻). Пироксинитрит является высокотоксичным соединением, повреждает мембраны и ДНК клетки, вызывает мутации и перекисное окисление липидов низкой плотности. При этом возникает оксидантный стресс, активизирующий большое количество оксидантчувствительных факторов транскрипции (таких как нуклеарный фактор каппа-В (NF-κB), которые повышают экспрессию адгезивных молекул эндотелия (ICAM-1, VCAM-1), а также различного рода факторов роста и хемокинов, способствующих развитию воспалительных процессов [3, 7]. В условиях нашего эксперимента прекондиционирование вызвало блокаду фактора NF-κB, уменьшение экспрессии молекул эндотелия (ICAM-1, VCAM-1) и снижение развития воспаления.

При остром воспалении миграция нейтрофилов зависит также от посредников клеток [10]. Таким образом, вполне возможно, что защитный механизм прекондиционирования полиморфноядерных лейкоцитов связан с торможением макрофагов и образованием таких факторов как некроз опухолей альфа (ФНО-α) и интерлейкин (IL-1). Истощение цитотоксических посредников во время прекондиционирования как следствие снижения доступности таких медиаторов воспалительных процессов может быть связа-



но с сохранением структуры органов-мишеней [9]. Было доказано что ФНО- α причастен к развитию ишемического прекондиционирования, так как этот эффект не наблюдается у ФНО- α мышцей нокаутированных [13]. Роль воспаления четко коррелирует с интенсивностью высвобождения ФНО- α . Так как между продукцией ФНО- α и индукцией iNOS (индуцибельная NO-синтаза) существует прямая зависимость, это означает, что воспаление в значительной степени опосредовано усиленной продукцией NO [7, 9].

В последние годы в развитии процесса воспаления отводится важное место оксиду азота (NO) [4]. Оксид азота принимает активное участие в регуляции большинства физиологических функций организма. Он является уникальным медиатором межклеточных взаимодействий, участвующих в поддержании гомеостаза организма. При воспалительных процессах NO реализует свои свойства путем фагоцитарной активности лейкоцитов. Под влиянием иммуногенных стимулов (γ интерферона, фактора некроза опухоли α , трансформирующего фактора роста β , факторов активации тромбоцитов и др.) происходит экспрессия гена, ответственного за синтез iNOS [8]. При этом макрофаги, нейтрофильные гранулоциты, моноциты, гепатоциты, фибробласты и прочие продуцируются на протяжении многих часов в тысячи раз больше, чем стимуляция конститутивной NO-синтазы. Предположительно еще одним из противовоспалительных механизмов является внеклеточная молекула аденозин, которая является спусковым крючком и посредником в механизмах прекондиционирования [9,10]. Образование аденозина происходит в миоцитах, эндотелиальных и сосудистых клетках. В ишемии дисбаланс между предложением и спросом кислорода приводит к распаду аденозинтрифосфата (АТФ) и высвобождению аденозина, который может увеличиться до 50 раз. Аденозин является цитопротектором и играет важную роль в защите от повреждения в сердце и печени и других органах. Аденозин также освобождается после прямого прекондиционирования скелетных мышц как физиологическая реакция в целях снижения уровня травматизма на микроциркуляцию и защиты от повреждения. Эффект аденозина включает расширение сосудов, торможение адгезии лейкоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов функции и свободных радикалов [5]. С этой точки зрения, противовоспалительный эффект от прекондиционирования в нашем исследовании может быть связан с увеличением образования аденозина после краткой ишемии задних конечностей.

Что касается влияния эритропоэтина при острых воспаления, то во многих исследованиях было показано протективное действие рекомбинантного эритропоэтина на ишемию – реперфузию в различных органах и тканях, включая головной мозг [3, 7], спинной мозг [4], почки [1], мышечную ткань сосудов [10], сердце [5, 7].

Предположительно, гипоксия приводит к снижению уровня кислорода в специфических сенсорных клетках почек, что вызывает усиление продукции простагландинов в клубочковых клетках. Индукция активности фосфолипазы A₂ в условиях гипоксии приводит к возрастанию уровня арахидонатов, которые при участии циклооксигеназы превращаются в эндопероксиды. ЭПО, в свою очередь, имеет прямое влияние на метаболизм арахидоновой кислоты, осуществляемый липоксигеназной системой.

В результате воспаления активировался и тумор-некротирующий фактор α (TNF- α), являющийся основным цитокином, запускающим цитокиновый каскад и инициирующий воспалительный ответ. Интрелейкин-1 (IL-1) – классический противовоспалительный цитокин, подавляющий синтез провоспалительных цитокинов (TNF- α IL-1, и IL-6), в то же время являющийся основным регулятором выработки противовоспалительных цитокинов. Кроме того, IL-1 играет важную защитную роль. ЭПО также может обладать внутриклеточной сигнальной трансдукцией через путь, включающий ядерный фактор NF- κ B.

Механизм реализации адаптации к гипоксии указывает на возможные точки приложения действия фармакологических агентов. Кроме того, данный механизм может быть активирован нефармакологическим путем – с помощью дистантного прекондиционирования.

Наши результаты позволяют предположить, что прекондиционирование задней конечности обеспечивает защитный эффект от острых воспалительных процессов. Хо-



ты механизмы противовоспалительного действия прекодиционирования еще вызывают много вопросов, в перспективе они могут включать в себя мощный и широкий спектр подавления воспалительного сигнала и иметь огромное клиническое применение. Например, компонент воспаления при инфаркте миокарда является ключевым звеном, которое при реперфузии распространяется на близлежащие к инфарктной зоне области миокарда.

Выводы. 1. Дистантное прекодиционирование оказывает выраженный противовоспалительный эффект на моделях острого воспаления (2% водный раствор формалина на мышцах и метод Ойвина на кроликах).

2. Использование рекомбинантного эритропоэтина в монотерапии и в сочетании с дистантным прекодиционированием приводит к значительному увеличению противовоспалительного эффекта.

Литература

1. Руда, М.Я. О системе лечения больных с острым коронарным синдромом / М.Я. Руда // Кардиологический вестник. – 2006. – № 2. – С. 5-9.
2. Baigent, C. Selective cyclooxygenase 2 inhibitors, aspirin, and cardiovascular disease A reappraisal / C. Baigent, C. Patrono // *Arthritis Rheum.* – 2003 – Vol. 48. – P.12-20.
3. Fossilien, E. Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs / E. Fossilien // *Ann Clin Lab Sci.* – 2005. – Vol. 35- P.347-385.
4. Func, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in cicosanoid biology / C. D. Func // *Science.* – 2001. – Vol. 294. – P.1871-1875.
5. Gustafsson, A.B. Heart mitochondria: gates of life and death/ A.B.Gustafsson, R.A. Gottlieb // *Cardiovasc Res.* – 2007. – P.11.
6. Heyndrickx, G.R. Early Reperfusion Phenomena / G.R. Heyndrickx // *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia.* – 2006.- Vol. 10. – P.236-241.
7. Levick, S.P. Arachidonic Acid Metabolism as a Potential Mediator of Cardiac Fibrosis Associated with Inflammation / S.P.Levick, D.C. Loch, S.M.Taylor et al. // *J Immunol.* – 2007.- Vol. 178. – P.641-646.
8. Li, H. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues / H. Li, A.Samouilov, X.Liu et al. // *J Biol Chem.* – 2001. – P. 82-89.
9. McCully, J.D. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury / J.D.McCully, H.Wakiyama, Y.-J. Hsieh et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2004. – Vol. 286 – P. 923-935.
10. Memis, D. Effects of lornoxicam on the physiology of severe sepsis / D.Memis, B.Karamanlioglu, A.Turan et al. // *Crit Care.*- 2004. – Vol.8. – P.474-482.
11. White, W.B. Cardiovascular effects of the cyclooxygenase inhibitors / W.B.White // *Hypertension.* – 2007. – Vol. 49. –P.408-418.
12. Zarraga, I.G.E. Coxibs and heart disease. What we have learned and what else we need to know / I.G.E.Zarraga, E.R. Schwarz // *J Am Coll Cardiol.* – 2007. – Vol.49. – P.1-14.
13. Zhu, X.Y. Cyclooxygenase-1 in the spinalcord plays an important role in postoperative pain / X.Y.Zhu, D. Conklin, J.C. Eisenach // *Pain.* – 2003. – Vol. 104. – P.15-23.

ANTIINFLAMMATORY EFFECTS OF DISTANT ISCHAEMIC PRECONDITIONING IN COMBINATION WITH RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN

**L.M. Danilenko¹, M.V. Pokrovsky²
O.O. Novikov¹, V.I. Kochkarov¹
A.E. Korolev², L.V. Korokina²
B.V. Trifonov¹, O.V. Charitonova¹**

¹*Belgorod National Research University*

²*Kursk State Medical University*

e-mail: Danilenko_L@bsu.edu.ru

This article presents data on the impact of distant ischemic preconditioning on the inflammatory process. It is known that cells can prepare for jumpstarting normoxia hypoxia that occurs during ischemia / reperfusion through adaptation by the impact of short periods of hypoxia, such as successive periods of normoxia, ie, ischemic preconditioning. This protective mechanism is one of the fastest developing scientific problems, because it is the most perfect natural unit to adapt to ischemic stress. At the level of the organism as an important humoral effectors of preconditioning may be an erythropoietin (EPO).

EPO exhibits a number of effects associated with adaptation to many types of stress on the level of tissues, cells, and a number of signaling pathways. Currently, intensive development paths using recombinant EPO for the treatment of many pathological states of man.

Key words: preconditioning, distant preconditioning, erythropoietin, inflammation.