



## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНОМ – ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ В ХИРУРГИИ

**И.М. КОЛЕСНИК**

*Курская горбольница № 2*

*e-mail: kolesnik\_inga@mail.ru*

В статье представлены результаты экспериментального изучения влияния дистантного ишемического preconditionирования на выживаемость изолированного кожного лоскута на питающей ножке и возможности инициации процесса preconditionирования рекомбинантным эритропоэтином.

Ключевые слова: preconditionирование, эритропоэтин, цитопротекция, АТФ-зависимые калиевые каналы, оксид азота.

Профилактика и коррекция последствий локальной ишемии, развивающейся при различных хирургических вмешательствах, является актуальной проблемой современной медицины. В связи с этим высок интерес к изучению ишемического preconditionирования, суть которого состоит в том, что короткие подпороговые периоды ишемии активируют эндогенные защитные механизмы, снижающие степень повреждения клеток в результате последующего продленного ишемического эпизода. Феномен был открыт Murry и соавт. в 1986 г. Ученые впервые продемонстрировали, что четыре коротких эпизода коронароокклюзии, перемежающиеся пятиминутными периодами реперфузии, перед длительной, сорокаминутной коронароокклюзией уменьшали размер инфаркта миокарда почти в 2 раза [2, 7].

Исследования последних лет показали, что одного эпизода преходящей ишемии достаточно, чтобы вызвать preconditionирование. Защитные свойства проявляются уже через 5 минут реперфузии. Тогда наступает первая защитная фаза preconditionирования. Продолжительность её – 1-2 часа. Затем эффект исчезает и возобновляется в промежутках времени от 24 до 96 часов. Это вторая защитная фаза [2, 8].

В 1993 году было открыто дистантное ишемическое preconditionирование, при котором кратковременные эпизоды ишемии одного органа (почки, брыжейки, нижней конечности) повышают устойчивость других органов к тяжелым ишемическим повреждениям [2, 10]. Открытие подтвердило предположение о том, что эффект preconditionирования реализуется не локально, а представляет систему многоуровневого иерархического дублирования, включающую нейрогенный компонент, гуморальный и внутриклеточный. Последнее привело к необходимости поиска гуморального агента выделяющегося в ответ на ишемию и способного при экзогенном введении инициировать процесс без ишемии. С клинической точки зрения preconditionирование фармакологическими средствами выглядит предпочтительнее, так как технологически проще и лишено потенциальной опасности ишемических эпизодов для измененных тканей [11, 12]. Еще больший интерес для клинического применения представляет возможность дозировать введение фармакологических средств, что делает управляемым временной интервал периода толерантности к ишемии.

Наиболее перспективным для изучения с нашей точки зрения является эритропоэтин. Это гликопротеиновый гормон; главным фактором, регулирующим его продукцию, является гипоксия [4]. Период полувыведения эритропоэтина значительно выше, чем у других гуморальных агентов preconditionирования (аденозин, брадикинин, опиоиды), следовательно, временной интервал периода толерантности к ишемии, инициируемый им, должен быть существенно шире. Кроме того, открытие рецепторов эритропоэтина на мезангиальных клетках и в миокарде, фибробластах мышечной ткани и нейронов позволило изучить неэритропоэтические функции гормона [4].

В связи с вышеизложенным **целью нашего исследования** явилось: установить влияние дистантного ишемического preconditionирования на выживаемость изолированного кожного лоскута на питающей ножке и возможность инициации процесса preconditionирования рекомбинантным эритропоэтином.

**Материалы и методы.** Опыты проводили на 90 белых крысах линии Wistar массой 220-250 г.

Для исследования взяты крысы без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим. В ходе эксперимента животные содержались в условиях стандартной экспериментальной биологически чистой комнаты, температура воздуха составляла 22-24°C,



освещение – 12 ч/12 ч светлый/темный цикл, все крысы получали гранулированный корм и фильтрованную водопроводную воду.

Операции и другие манипуляции на крысах проводились в условиях общего обезболивания внутривенным введением водного раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг веса. Выведение животных из эксперимента осуществляли в соответствии с «Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», принятой Советом Европы (Strasbourg, Франция, 1986) и Директивой Совета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 «По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях», передозировкой хлоралгидрата, вводимого внутривенно.

Животных распределяли по группам путем стратифицированной рандомизации со стратификацией по массе тела, условиям содержания и питания, а также по проводимым операциям и манипуляциям.

Всем животным моделирование кожного лоскута на питающей ножке проводилось на вторые сутки эксперимента. После наркотизации животное фиксировали в положении на спине. Шерсть на брюшке тщательно выстригали, кожу обрабатывали 70% раствором этилового спирта. Отступив 1 см от мечевидного отростка по белой линии живота, предварительно наметив по трафарету размер, выкраивали кожный лоскут, 1 см – основание, 4 см – длина, (сохранив питающий сосуд) изолировали в полиэтиленовый пакет, края кожи ушивали узловым швом [3]. Оценку степени выживаемости кожного лоскута на ножке проводили на пятые сутки после моделирования (6-е сутки эксперимента) планиметрически по Автандилову, измеряя площадь выжившей ткани [1]. В дальнейшем рассчитывали показатель выживаемости (отношение площади выжившей ткани к изначальной площади лоскута  $\times 100\%$ ).

Блокаду АТФ-зависимых калиевых каналов проводили внутрижелудочным введением глибекламида (Glib., Sigma) 5 мг/кг за 30 мин. до проведения дистантного ишемического прекодиционирования и/или введения рекомбинантного эритропоэтина [6].

Дефицит оксида азота моделировали ежедневным внутривенным введением с первых суток эксперимента блокатора эндотелиальной NO синтазы N-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME, Sigma) в дозе 25 мг/кг/сут. [5].

Дистантное ишемическое прекодиционирование осуществляли 10-минутным пережатием бедренной артерии с последующей 30-минутной реперфузией непосредственно перед моделированием патологии, на 3-и и 5-е сутки. Бедренную артерию пережимали наложением жгута на верхнюю треть бедра. Контролем правильности наложения жгута служило отсутствие пульса на артериях голени [3].

Рекомбинантный эритропоэтин («Эпокрин» эпоэтин альфа; ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых препаратов» Федерального медикобиологического агентства г. Санкт-Петербург, РОССИЯ) вводили подкожно в дозе 50 МЕ/кг на первые, третьи и пятые сутки эксперимента. Доказано, что при данном режиме введения препарат не обладает эритроформирующим эффектом.

Экспериментальные животные были разделены на 9 групп, не менее 10 крыс в каждой, которым моделировали изолированный кожный лоскут на питающей ножке. Первая группа – контрольная. Во второй группе проводили коррекцию дистантным ишемическим прекодиционированием. В третьей группе – рекомбинантным эритропоэтином. Животным четвертой группы проводилось комбинированное лечение, включающее сочетание дистантного ишемического прекодиционирования и рекомбинантного эритропоэтина. Животным 5-й группы вводили глибенкламид. В 6-й и 7-й группах проводили коррекцию выживаемости изолированного кожного лоскута на питающей ножке дистантным ишемическим прекодиционированием и рекомбинантным эритропоэтином соответственно на фоне блокады АТФ-зависимых калиевых каналов. Животным 8-й группы вводили L-NAME. В 9-й группе проводили коррекцию выживаемости изолированного кожного лоскута на ножке рекомбинантным эритропоэтином, на фоне блокады эндотелиальной NO синтазы.

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Microsoft Excel версии 10.0 при помощи средств пакета анализа. «Описательная статистика» применялась для нахождения среднего значения (M) показателей и ошибки среднего (m) в каждой группе животных; данные в тексте и таблицах представлены в виде  $M \pm m$ . «Двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями» использовался для сравнения соответствующих показателей в различных группах животных и определения достоверности различий между ними путем вычисления вероятности возможной ошибки (p). Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего  $p < 0,05$ .



**Результаты и их обсуждение.** При моделировании кожного лоскута на питающей ножке выживает часть его длины, превосходящая ширину основания не более чем в 2 раза. Мы заведомо моделировали лоскут, длина которого в 4 раза превосходила ширину основания.

На пятые сутки в контрольной группе площадь выжившей ткани составила  $1,59 \pm 0,03 \text{ см}^2$ , показатель выживаемости – 40% от изначальной площади ( $4 \text{ см}^2$ ), что соответствует результатам, полученным другими исследователями, применявшими данную модель [3].

Все изучаемые методы коррекции способствовали достоверному увеличению площади выжившей ткани по сравнению с контрольной группой. Проведение дистантного ишемического прекондиционирования – до значения  $2,36 \pm 0,09 \text{ см}^2$  ( $p=0,00001$ ); введение рекомбинантного эритропоэтина – до  $2,51 \pm 0,05 \text{ см}^2$  ( $p<0,05$ ); сочетанное воздействие изучаемых методов – до  $2,64 \pm 0,16 \text{ см}^2$  ( $p=0,00018$ ). Следовательно, показатель выживаемости увеличился в 1,5; 1,6 и 1,7 раза соответственно.

Достоверных отличий между показателями в названных опытных группах нами выявлено не было ( $p=0,17685$  при сравнении показателей в группах ДИП и ЕРО;  $p=0,15894$  и  $p=0,45228$  при сравнении их с группой сочетанного воздействия соответственно). Таким образом, дистантное ишемическое прекондиционирование способствует увеличению выживаемости изолированного кожного лоскута на питающей ножке. Рекомбинантный эритропоэтин в этой модели оказывает аналогичное действие.

Цитопротекторный эффект дистантного ишемического прекондиционирования в данной модели мы обуславливаем запуском каскадных реакций, ведущих к снижению уровня энергопотребления прекондиционированных тканей и активации молекулярных механизмов цитопротекции. Отсутствие достоверных отличий между показателями в опытных группах не опровергло наших предположений о способности эритропоэтина инициировать процесс прекондиционирования и привело к необходимости исследования роли основных звеньев механизма прекондиционирования в реализации цитопротекторного эффекта рекомбинантного эритропоэтина.

Введение глибенкламида животным контрольной группы (без лечения) не повлияло на выживаемость лоскута ( $p>0,05$ ). Введение его перед проведением дистантного ишемического прекондиционирования способствовало уменьшению площади выжившей ткани изолированного кожного лоскута на питающей ножке до значения  $1,62 \pm 0,02 \text{ см}^2$ , не имеющего достоверных отличий от показателя в контрольной группе ( $1,59 \pm 0,03 \text{ см}^2$ ) ( $p=0,43145$ ), аналогичный результат получен при введении глибенкламида животным перед применением рекомбинантного эритропоэтина –  $1,60 \pm 0,06 \text{ см}^2$  ( $p=1,0$ ). Блокада АТФ-зависимых калиевых каналов глибенкламидом полностью нивелировала цитопротекторный эффект как дистантного ишемического прекондиционирования, так и рекомбинантного эритропоэтина. Результат говорит о том, что основным эффекторным звеном в механизме реализации цитопротекторного действия и в том и в другом случае являются АТФ-зависимые калиевые каналы.

В развитии ишемического прекондиционирования имеют значение две различные изоформы NO-синтаз (NOS): кальцийзависимая эндотелиальная (eNOS), участвующая в ранних фазах ИПК, и кальцийнезависимая индуцибельная (iNOS), генерирующая оксид азота поздней защиты [9].

Авторы «гипотезы оксида азота» считают, что именно повышенная активность iNOS, регистрируемая через 24-72 ч после инициируемого ишемического эпизода, является ответственной за реализацию эффектов отсроченной фазы ИПК [2, 8].

Исследование роли эндотелиальной NO-синтазы в реализации цитопротекторного эффекта рекомбинантного эритропоэтина проводили на модели изолированного кожного лоскута на питающей ножке.

Введение L-NAME животным контрольной группы привело к достоверному уменьшению площади выжившей ткани лоскута ( $0,92 \pm 0,05 \text{ см}^2$ ) по сравнению с результатом в контрольной группе ( $1,59 \pm 0,03 \text{ см}^2$ ) ( $p<0,05$ ). Данный факт еще раз доказывает немаловажную позитивную роль оксида азота в реализации естественных механизмов защиты от ишемии. Блокада эндотелиальной NO-синтазы у животных, которым вводился рекомбинантный эритропоэтин, способствовала уменьшению показателя выживаемости изолированного кожного лоскута на питающей ножке, зарегистрированного нами ранее, до значения ( $1,68 \pm 0,06 \text{ см}^2$ ), не имеющего достоверных отличий от показателя в контрольной группе ( $1,59 \pm 0,03 \text{ см}^2$ ) ( $p=0,19249$ ). Результат, полученный в данной экспериментальной группе, свидетельствует о существенной роли эндотелиальной NO-синтазы в реализации цитопротекторного эффекта рекомбинантного эритропоэтина. Однако можно отметить, что в группе животных, которым на фоне блокады эндотелиальной NO-синтазы вводился рекомбинантный эритропоэтин, показатель выживаемости достоверно выше, чем в группе животных, которым блокада эндотелиальной NO-синтазы моделировалась без лечения ( $p<0,05$ ).

Такой результат можно объяснить тем, что активация АТФ-зависимых калиевых каналов осуществляется не только нитритэргической системой, но в некоторой степени протеинкиназами. В литературе есть сведения о возможности активации протеинкиназ эритропоэтином [4]. Нельзя исключать возможность прямого влияния эритропоэтина на АТФ-зависимые калиевые каналы.



Рис. Фрагмент механизма ишемического preconditioning и гипотетическая роль эритропоэтина в нем.

*Примечание.* EPO – эритропоэтин; K<sup>+</sup>АТФ каналы – АТФ-зависимые калиевые каналы; eNOS – эндотелиальная NO-синтаза; iNOS – индуцибельная NO-синтаза; L-NAME – N-нитро-L-аргинина метиловый эфир; NO – оксид азота; РФК – реактивные формы кислорода; ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2.

**Выводы.** Таким образом, в ходе проведенного исследования было выявлено, что дистантное ишемическое preconditioning и рекомбинантный эритропоэтин в субэритростимулирующей дозе обладают в равной степени выраженным цитопротекторным эффектом на модели изолированного кожного лоскута на питающей ножке. АТФ-зависимые калиевые каналы являются эффекторным механизмом в реализации цитопротекторного действия как дистантного ишемического preconditioning, так и рекомбинантного эритропоэтина. Оксид азота играет важную роль в реализации цитопротекторного эффекта рекомбинантного эритропоэтина. Синтез его осуществляется за счет активации индуцибельной NO-синтазы, однако в механизме цитопротекции большое значение имеет эндотелиальная NO-синтаза, выполняющая, по всей вероятности, триггерную роль. Из этого следует, что рекомбинантный эритропоэтин в субэритростимулирующей дозе можно рекомендовать как препарат для фармакологического preconditioning.

Результаты, полученные в проведенных нами экспериментальных исследованиях, позволяют проводить дальнейшее изучение возможности применения дистантного ишемического preconditioning и фармакологического preconditioning рекомбинантным эритропоэтином в субэритростимулирующей дозе для профилактики и коррекции ишемических повреждений тканей в хирургии.

### Литература

1. Автандилов, Г.Г. Основы патологоанатомической практики / Г.Г. Автандилов. – М. : РМАПО, 1994. – 512 с.
2. Бокерия, Л.А. Природа и клиническое значение «новых ишемических синдромов» / Л.А. Бокерия, И.Н. Чичерин. – М.: НИЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2007. – 302 с.
3. Влияние дистантного preconditioning на выживаемость ишемизированных тканей / И.М. Колесник, М.В. Покровский, В.А. Лазаренко и др. // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 214-217



4. Захаров, Ю.М. Неэритропоэтические функции эритропоэтина / Ю.М. Захаров // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 6. – С. 592-608.
5. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Покровская и др. // Кубанский науч. мед. вестн. – 2006. – № 10. – С. 72-77.
6. Роль АТФ-зависимых калиевых каналов в процессе гипоксического и ишемического preconditionирования у крыс с фокальной ишемией мозга / Н.С. Самойленкова, С.А. Гаврилова, А.И. Дубина и др. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2000. – Т.4, № 24. – С. 68-77.
7. Depre, C. Cardioprotection in stunned and hibernating myocardium / C. Depre, S.F. Vatner // Heart Fail. Rev. – 2007. – Vol. 12. – P. 307-317.
8. Dirnagl, U. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia from experimental strategies to clinical use / U. Dirnagl, K. Becker, A. Meisel // Lancet. – 2009. – Vol. 8, № 4. – P. 398-412.
9. Downey, J.M. Signaling pathways in ischemic preconditioning / J.M. Downey, A. M. Davis, M.V. Cohen // Heart. Fail. Rev. – 2007. – Vol. 12. – P. 181-188
10. Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning / C. Ren, X. Gao, G.K. Steinberg, H. Zhao // Neuroscience. – 2008. – Vol. 151. – P. 1099-1103
11. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomized trial / H.E. Botker, R. Kharbanda, M.R. Schmidt et al. // Lancet. – 2010. – Vol. 375. – P. 727-734.
12. Sommer, C. Ischemic preconditioning: postischemic structural changes in the brain / C. Sommer // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2008. – Vol. 67. – P. 85-92.

## **SURGICAL ASPECTS OF ERYTHROPOIETIN TO CORRECT ISCHEMIC DAMAGE OF ORGANS AND TISSUES**

**I.M. KOLESNIK**

*Kursk hospital №2*

*e-mail: kolesnik\_inga@mail.ru*

The article presents the results of an experimental study of the influence of distant ischemic preconditioning on the survival of isolated skin graft on feeding pedicle and the possibility of initiating the process of preconditioning with recombinant erythropoietin.

Keywords: preconditioning, erythropoietin, cytoprotection, ATP-dependent potassium channels, nitric oxide.