



УДК 615.225:617.735-007.23

ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ СЕТЧАТКИ

А.С. ШАБЕЛЬНИКОВА
А.С. КАШУБА
А.А. ПЕРЕСЫПКИНА
М.В. ПОКРОВСКИЙ
А.А. ДОЛЖИКОВ
Л.К. БУСЛОВСКАЯ

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: annu_87_@mail.ru

Моделирование ишемии-реперфузии сетчатки у белых лабораторных крыс путем оказания механического давления на переднюю камеру глаза приводило к усилению регионарного кровотока в сетчатке после 1 ч. реперфузии с последующим развитием отека и снижению уровня микроциркуляции в сетчатке после 72 ч. реперфузии. В условиях этой модели выявлена выраженная коррекция нарушений микроциркуляции рекомбинантным эритропоэтином (50 МЕ/кг). Протективный эффект эритропоэтина снимался глибенкламидом, что свидетельствует о прекодиционирующем действии с участием К⁺-АТФ-азных каналов.

Ключевые слова: прекодиционирование, рекомбинантный эритропоэтин, ишемия-реперфузия сетчатки.

Профилактика и коррекция ишемических заболеваний сетчатки является актуальной проблемой, которую можно решить с помощью фармакологического прекодиционирования. Прекодиционирование может рассматриваться как универсальный инструмент предупреждения ишемического повреждения тканей, что подтверждается многочисленными исследованиями [3, 5]. В разных работах показано протективное действие эритропоэтина на ишемию-реперфузию в различных органах и тканях, включая головной мозг [8], спинной мозг [9], мышечную ткань сосудов [12], сердце [8, 11], заднюю конечность [6], почки [7], плаценту [4], печень [1]. Рекомбинантный эритропоэтин оказывает противовоспалительное действие, которое реализуется по механизму прекодиционирования с вовлечением АТФ-зависимых калиевых каналов, eNOS и iNOS [2].

Целью работы явилось изучение влияния дистантного ишемического прекодиционирования (ДИП) и фармакологического прекодиционирования рекомбинантным эритропоэтином на уровень микроциркуляции в сетчатке при моделировании ишемии-реперфузии глаза.

Материалы и методы. Опыты проведены на 140 белых лабораторных обоеполых крысах массой 225-275 г. Моделирование ишемии-реперфузии сетчатки глаза проводили под наркозом (хлоралгидрат, 300 мг/кг массы тела животного, внутривенно) путем оказания механического давления (110 мм.рт.ст.) на переднюю камеру глаза в течение 30 минут. Подтверждением формирования ишемии служило отсутствие глазного кровотока. Для изучения протективных свойств рекомбинантного эритропоэтина выполнено 7 серий экспериментов. Первая группа (n=10) – группа интактных животных, вторая (n=10) – с ишемией-реперфузией сетчатки (контроль), третья (n=10) – с коррекцией ДИП; четвертая (n=10) – с коррекцией эритропоэтином; пятая (n=10) – контроль + глибенкламид (блокатор АТФ-зависимых калиевых каналов); шестая (n=10) – ДИП + глибенкламид; седьмая (n=10) – эритропоэтин + глибенкламид. ДИП проводили 10-минутным пережатием бедренной артерии путем наложения жгута на проксимальную треть бедра за 40 мин до моделирования ишемии сетчатки, после чего следовал 30-минутный эпизод реперфузии. Рекомбинантный эритропоэтин («Эпокрин» (ФГУП ГосНИИ ОЧБ) вводили внутривенно в субэритроцистимулирующей дозе 50МЕ/кг однократно за 30 мин до моделирования ишемии. Глибенкламид («Манинил» (Берлин-Хеми АГ) вводили в дозе 5 мг/кг однократно за 60 мин до моделирования ишемии.

О выраженности протективного эффекта эритропоэтина и ДИП судили по уровню микроциркуляции в сетчатке крыс при помощи лазер-Доплера флоуметра Biopac-systems MP-150 и датчика игольчатого типа TSD-144 (США) через 1 и 72 часа реперфузии. Для этого под наркозом животное фиксировали и производили регистрацию уровня микроциркуляции в сетчатке в десяти точках по окружности склеры с шагом 1 мм. Запись кривой уровня микроциркуляции проводили в течение 20 секунд в каждой точке. Из полученных десяти значений выводили среднее, которое вносили в протокол и принимали за уровень микроциркуляции в сетчатке у данного животного. Из 10 полученных значений выводили среднее, которое принимали за уровень микроциркуляции в сетчатке в данной группе животных.

Для гистологических исследований глаза с непосредственно прилегающими тканями фиксировали в 10% растворе формалина. После фиксации материал полностью заливали в

стандартном режиме в парафин. Кусочки ориентировали в блоках таким образом, чтобы при изготовлении срезов получить препараты в меридианном направлении строго через середину глазного яблока. Срезы для стандартного гистологического исследования окрашивали гематоксилином и эозином. Описательное исследование гистологических препаратов выполняли под микроскопом Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Германия).

Достоверность изменений абсолютных параметров определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов, средней арифметической и вероятности возможной ошибки (p) по таблицам Стьюдента. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Результаты оценки уровня микроциркуляции в сетчатке крыс после 1 ч. реперфузии после моделирования ишемии-реперфузии глаза и ее коррекции ДИП и рекомбинантным эритропоезином в дозе 50 МЕ/кг представлены в таблице 1.

Уровень микроциркуляции в сетчатке интактных крыс составил $738,9 \pm 37,6$ п.е. (перфузионных единиц). Уровень микроциркуляции после моделирования патологии в группе контроля составил после 1 ч. реперфузии $1155,0 \pm 51,9$ п.е., что достоверно выше значения в группе интактных животных ($p < 0,001$). На фоне коррекции патологии ДИП уровень микроциркуляции в сетчатке после 1 ч. реперфузии достоверно снижался до $952,0 \pm 25,8$ п.е. ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля. При коррекции патологии эритропоезином уровень микроциркуляции в группе снижался до $798,5 \pm 12,3$ п.е. и также достоверно отличался от значений в группе контроля ($p < 0,001$). Введение глибенкламида в группах с коррекцией ДИП и эритропоезином предотвращало снижение уровня микроциркуляции (табл. 1).

Таблица 1

Влияние эритропоетина и дистантного ишемического preconditionирования на уровень микроциркуляции в сетчатке крыс после 1 ч. реперфузии при моделировании ишемии глаза ($M \pm m$; $n=10$)

№ п/п	Экспериментальные группы	Уровень микроциркуляции, п.е. (перфузионные единицы)
1.	Интактные	$738,9 \pm 37,6^y$
2.	ИГ (ишемия глаза)	$1155,0 \pm 51,9^*$
3.	ИГ + ДИП	$952,0 \pm 25,8^{*y}$
4.	ИГ + эритропоетин, 50МЕ/кг	$798,5 \pm 12,3^y$
5.	ИГ + глибенкламид, 5 мг/кг	$1135,8 \pm 31,2^*$
6.	ИГ + ДИП + глибенкламид, 5 мг/кг	$1144,7 \pm 20,7^*$
7.	ИГ + эритропоетин, 50МЕ/кг + глибенкламид, 5 мг/кг	$1148,5 \pm 14,3^*$

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных; y - $p < 0,05$ в сравнении с группой контроля.

Результаты морфологического исследования сетчатки подтвердили наличие протективных свойств ДИП, фармакологического preconditionирования эритропоезином в дозе 50 МЕ/кг при коррекции ишемии-реперфузии сетчатки после 1 ч. реперфузии (рис. 1, 2).

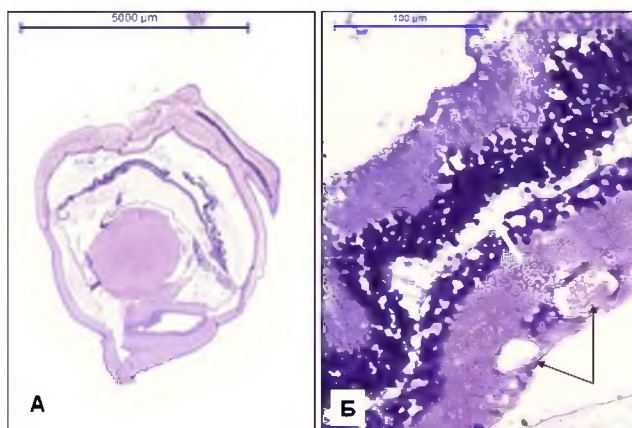


Рис. 1. Резкое изменение объемных и топографических соотношений структур глазного яблока в группе контроля за счет отека с частичным отслоением сосудистой оболочки и сетчатки (А); Б – отек и расслоение сетчатки на уровне наружного сетчатого слоя (светлая стрелка), дилатация и неравномерное кровенаполнение венозных сосудов на уровне ганглионарного слоя и слоя нервных волокон (двойная стрелка) в группе контроля. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. X10 (А), X400 (Б)

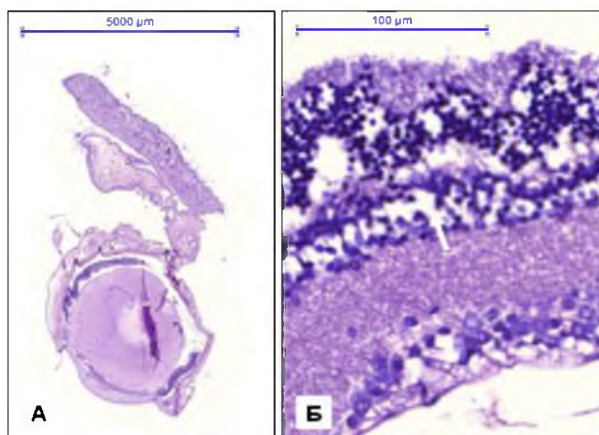


Рис. 2. Общий вид меридианного среза глаза с окружающими структурами (А) – топография и объемные соотношения структур без видимых изменений (коррекция эритропоезином); Б – минимальные структурные изменения сетчатки в виде отечных изменений и разрыхления внутреннего ядерного слоя (стрелка) (коррекция эритропоезином). Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. X10 (А), X400 (Б)

Результаты оценки уровня микроциркуляции в сетчатке крыс после 72 ч. реперфузии после моделирования ишемии-реперфузии сетчатки и ее коррекции ДИП, эритропоезином в дозе 50 МЕ/кг представлены в таблице 2.

Уровень микроциркуляции в сетчатке интактных крыс составлял 743,9±5,0 п.е. Уровень микроциркуляции через 72 ч. после моделирования патологии существенно снизился, и в группе контроля составил 353,3±11,7 п.е. (p<0,001), что свидетельствует о формировании повреждения сетчатки к 72 ч. реперфузии. На фоне коррекции патологии ДИП уровень микроциркуляции после 72 ч. реперфузии достоверно возрос до 638,5±15,8 п.е. (p<0,05) по сравнению с группой контроля (табл. 2).

Таблица 2

Влияние эритропоезина и дистантного ишемического preconditionирования (ДИП) на уровень микроциркуляции в сетчатке после 72 часов реперфузии при моделировании ишемии глаза крыс (M±m; n=10)

№ п/п	Экспериментальные группы	Уровень микроциркуляции, п.е.
1.	Интактные	743,9±5,0 ^y
2.	ИГ (ишемия глаза)	353,3±11,7*
3.	ИГ + ДИП	638,5±15,8 ^y
4.	ИГ + эритропоезин, 50МЕ/кг	724,0±4,1 ^y
5.	ИГ + глибенкламид, 5 мг/кг	359,4±10,3*
6.	ИГ + ДИП + глибенкламид, 5 мг/кг	361,7±13,9*
7.	ИГ + эритропоезин, 50МЕ/кг + глибенкламид, 5 мг/кг	372,3±13,4*

Примечание: * - p<0,05 в сравнении с группой интактных животных; ^y - p<0,05 в сравнении с группой контроля.

При коррекции ишемии эритропоезином уровень микроциркуляции увеличивался до 724,0±4,1 п.е., что достоверно отличалось от значений в группе контроля (p<0,001) и приближалось к значениям в группе интактных животных. Введение глибенкламида в группах с коррекцией ДИП и эритропоезином предотвращало повышение уровня микроциркуляции.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии протективных свойств ДИП и рекомбинантного эритропоезина в субэритростимулирующей дозе на модели ишемии-реперфузии сетчатки крыс, заключающихся в предотвращении увеличения микроциркуляции на 1 ч. после реперфузии и улучшении гистологической структуры слоев сетчатки с сохранением минимальных структурных изменений, а также в улучшении показателей уровня микроциркуляции в ишемизированной сетчатке на 72 ч. после реперфузии. Введение глибенкламида в группах с коррекцией ДИП и эритропоезином предотвращало коррекцию нарушений микроциркуляции в сетчатке за счет блокады АТФ-зависимых калиевых каналов, что подтверждает наличие preconditionирующих свойств эритропоезина в дозе 50МЕ/кг на модели ишемии-реперфузии сетчатки.

Preconditionирование способно уменьшать последствия ишемических явлений за счет активации АТФ-зависимых калиевых каналов митохондрий, уменьшать оксидативный



стресс за счет индукции ферментов антиоксидантной системы и синтеза белков теплового шока [10].

Полученные результаты совпадают с исследованиями, проведенными в «Центре доклинических и клинических исследований» ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» при моделировании ишемии-реперфузии сердца, кожного лоскута, конечности, печени, почек, поджелудочной железы, плаценты и кишечника у различных животных [1, 2, 3, 4, 6, 7], что свидетельствует об общебиологическом принципе реакции микроциркуляции и ее коррекции с помощью дистантного и фармакологического preconditionирования рекомбинантным эритропоэтином.

Литература

1. Алехин, С.А. Фармакологический анализ влияния прямого и дистантного preconditionирования на микроциркуляцию в печеночной паренхиме в условиях ее ишемии и реперфузии / С.А. Алехин, М.В. Покровский, Д.И. Колмыков и др. // Материалы IV фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». - М.: Фолиум, 2012. - С.9.
2. Влияние дистантного ишемического preconditionирования и рекомбинантного эритропоэтина на воспаление / Л.М. Даниленко, М.В. Покровский, А.Е. Королев и др. // V Конгресс «Рациональная фармакотерапия и клиническая фармакология». - СПб., 2010. - С. 98-99.
3. Колесник, И.М. Фармакологическое preconditionирование эритропоэтином – новые возможности оптимизации выживаемости ишемизированных тканей / И.М. Колесник, М.В. Покровский, В.А. Лазаренко // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". - 2010. №3. - С.32-36.
4. Пат. 2466462 Российская Федерация. Способ коррекции нарушения микроциркуляции в плаценте рекомбинантным эритропоэтином при ADMA-подобной модели гестоза / М.В. Покровский, В.В. Гуреев, О.С. Полянская [и др.]; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации». - № 2011116371/14; опубл.10.11.2012, Бюл. № 31. - 4 с.
5. Писаренко, О. И. Ишемическое preconditionирование: от теории к практике / О. И. Писаренко // Кардиология. - 2005. - Т. 45. - № 9. - 62-72.
6. Фармакологическое preconditionирование эритропоэтином при ишемии конечности / И.М. Колесник, М.В. Покровский, И.Н. Должикова и др. // Биомедицина. - 2011. - № 4. - 90-92.
7. Экспрессия эндоглина и эндотелиальной NO-синтазы в почках при дистантном и фармакологическом preconditionировании / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, И.Н. Должикова и др. // Буковинский медицинский вестник. - 2012. - Т. 16. - №3 (63), ч. 2. - С. 185 – 188.
8. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart / C. J. Parsa, J. Kim, R. U. Riel [et al.] // J. Biological. - 2004. - Vol. 279, N 20. - P. 655-662.
9. Circulating Erythropoietin Levels and Prognosis in Patients With Congestive Heart Failure. Comparison With Neurohormonal and Inflammatory Markers / J. George, S. Patal, D. Wexler [et al.] // Arch. Intern. Med. - 2005. - Vol. 165. - P. 1304-1309.
10. Downey, J. M. Signaling pathways in ischemic preconditioning / J. M. Downey, A. M. Davis, M. V. Cohen // Heart Fail Rev. - 2007. - N 12. - P. 181-188.
11. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction / P. Van der Meer, E. Lipsic, R. H. Henning [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. - 2005. - Vol. 46. - P. 125-133.
12. The upregulation of glial glutamate transporter-1 participates in the induction of brain ischemic tolerance in rats / M. Zhang, W. B. Li, J. X. Geng [et al.] // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. - 2007. - Vol. 27. - P. 1352-1368.

PROTECTIVE EFFECT OF ERYTHROPOIETIN IN MODELING RETINAL ISCHEMIA-REPERFUSION

A.S. SHABELNIKOVA
A.S. KASHUBA
A.A. PERESYPKINA
M.V. POKROVSKIY
A.A. DOLZHIKOV
L.K. BUSLOVSKAYA

*Belgorod National
 Research University*

e-mail: anny_87_@mail.ru

Modeling of retinal ischemia-reperfusion in white laboratory rats by providing mechanical pressure to the anterior chamber of the eye caused increasing regional blood flow in the retina after 1 h of reperfusion, followed by the development of edema and reduction of retinal microcirculation after 72 hrs. of reperfusion. In terms of this model revealed pronounced correction of microcirculation by recombinant erythropoietin (50 IU/kg). The protective effect of erythropoietin was shot glibenclamide, indicating that preconditioning action involving K⁺-ATP-ase channels.

Key words: preconditioning, recombinant erythropoietin, ischemia-reperfusion injury of the retina.