

ХОДОСОВСКИЙ М.Н., ЗИНЧУК Вл.В.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МЕХАНИЗМОВ ТРАНСПОРТА КИСЛОРОДА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ

Кафедра патологической физиологии им. Д.А. Маслакова
(зав. кафедрой – профессор Максимович Н.Е.)
Гродненский государственный медицинский университет
Гродно, Беларусь

Резюме. Исследовали параметры кислородтранспортной функции крови ($p50_{\text{станд}}$, $p50_{\text{реал}}$, pO_2 , pCO_2 , pH , HCO_3^- , TCO_2 , ABE, SBC и др.) при ишемии-реперфузии печени в условиях предварительного однократного введения эритропоэтина в дозе 1000 МЕ/кг у крыс. Ишемию печени (30 мин.) вызывали маневром Прингла, реперфузионный период длился 120 мин. Показано, что моделирование синдрома ишемии-реперфузии печени у крыс приводило к развитию метаболического ацидоза, сдвигу кривой диссоциации оксигемоглобина вправо. Однократное введение экспериментальным животным эритропоэтина способствовало увеличению сродства гемоглобина к кислороду и улучшению параметров кислотно-основного состояния в остром постишемическом периоде.

Ключевые слова: кислород, эритропоэтин, печень, ишемия, реперфузия, крысы.

Введение. Среди механизмов повреждений, возникающих при ишемии-реперфузии печени (ИРП), важную роль отводят расстройствам микроциркуляции и нарушению механизмов транспорта кислорода [4]. Индуктором данных расстройств является ишемия. Однако показано, что короткие периоды ишемии перед основным ее периодом оказывают выраженный протективный эффект, который получил название ишемического preconditionирования (ischemic preconditioning) [6]. Предполагают, что механизм защитного эффекта данного способа связан с повышением продукции оксида азота (NO) эндотелием и улучше-

нием условий микроциркуляции в органе, активацией белков теплового шока, снижением продукции провоспалительных цитокинов и ингибированием апоптоза, увеличением синтеза гипоксией индуцируемым фактором (ГИФ) [6, 16]. В последние годы интенсивно разрабатываются новые способы preconditionирования, которые базируются на способности некоторых соединений запускать схожие с ишемическим preconditionированием механизмы адаптации к ишемии и последующей за ней реперфузии. Одним из таких соединений считают эритропоэтин (ЭПО) [14].

Известно, что гипоксия/ишемия является основным фактором повышения синтеза ЭПО в организме. Долгое время данный гликопротеин считали ответственным за механизмы долговременной адаптации к условиям гипоксии. В последние годы показано, что ЭПО обладает защитным эффектом при краткосрочном использовании на различных моделях ишемии/гипоксии органов [7, 12, 14]. В последующем выяснено, что рецепторы к ЭПО имеются у нервных клеток, кардиомиоцитов, эпителия легких, эндотелия сосудов и др. Более того, некоторые из тканей способны синтезировать данный гликопротеин [2]. Цитопротективный эффект краткосрочного использования ЭПО связывают со способностью этого гликопротеина ингибировать механизмы апоптоза, подавлять экспрессию провоспалительных цитокинов, процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), улучшать функцию эндотелия и условия микроциркуляции [7, 15]. Вместе с тем известно, что долгосрочные защитные эффекты ЭПО реализуются через изменение кислородсвязывающих свойств крови, а состояние параметров кислородтранспортной функции (КТФ) крови может влиять на развитие окислительного стресса при различной патологии [3, 4, 5]. Краткосрочное влияние ЭПО на параметры КТФ крови при ишемии-реперфузии органов остается неизученным.

Цель данного исследования – изучить влияние однократного использования ЭПО на параметры КТФ крови при моделировании синдрома ишемии-реперфузии печени у крыс.

Материалы и методы. Работа выполнена на 26 взрослых белых крысах-самцах, весом 280-360 г, предварительно содержавшихся в стандартных условиях вивария. Под комбиниро-

ванным наркозом (тиопентал натрия – 30 мг/кг, в/б, калипсол – 100 мг/кг, в/м) ишемию печени вызывали наложением сосудистого зажима на а. hepaticapropria и v. portae (маневр Прингла) в течение 30 минут, реперфузионный период длился 120 минут. В конце эксперимента осуществляли забор смешанной венозной крови и тканей печени для оценки параметров КТФ крови. Все оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с нормами, принятыми комиссией по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета.

Животных разделили на 3 группы: 1-я (n=9) – контрольная; во 2-й (n=8) – моделировали ИРП; в 3-й (n=9) группе за 30 мин. перед ИРП внутрибрюшинно вводили рекомбинантный человеческий эритропоэтин альфа (ЭПО, INTAS) в дозе 1000 МЕ/кг.

На микрогазоанализаторе «Synthesis-15» (Instrumentation Laboratory Company) 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 (ABE) и др. Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) определяли по показателю $p50$ (pO_2 крови, соответствующее 50% насыщению ее кислородом). $p50_{\text{станд}}$ измеряли при стандартных условиях (pH = 7,4; pCO_2 = 40 мм рт. ст. и $T = 37^\circ C$), а $p50_{\text{реал}}$ – рассчитывали для реальных значений этих факторов. На основании полученных значений $p50$ по уравнению Хилла определяли положение кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента или U-теста, в зависимости от нормальности распределения выборок. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Изменения параметров КТФ крови у экспериментальных животных представлены в таблице. Выявлено, что у крыс 2-й группы в конце постишемического периода в крови наблюдалось уменьшение значений показателей pH, ABE, SBE и SBC, отражая развитие метаболического ацидоза. Так показатель pH у крыс 2-й группы по отношению к животным 1-й группы снизился на 1,7% ($p < 0,01$). Показатель SBC в конце реперфузии уменьшался на 15,8% ($p < 0,05$) соответственно. В конце реперфузии у крыс 2-й экспериментальной группы в крови наблюдалось увеличение $p50_{\text{станд}}$ и $p50_{\text{реал}}$ на

10,1% ($p<0,05$) и 28,6% ($p<0,001$), свидетельствуя о сдвиге КДО вправо (рис. 1). Одновременно выявлено, что показатель pO_2 смешанной венозной крови у животных 2-й группы в конце реперфузионного периода повышался на 26,9% ($p<0,05$) по отношению к животным 1-й группы.

Инфузия ЭПО (1000 МЕ/кг) крысам 3-й группы сопровождалась улучшением параметров КТФ крови в конце реперфузии (табл.). Так, по отношению к животным 2-й группы здесь наблюдалось увеличение показателей pH, HCO_3^- , TCO_2 , ABE, SBE и SBC. Одновременно установлено смещение КДО влево по отношению к животным 2-й группы в конце реперфузии (судя по показателю $p50_{\text{реал}}$).

Таблица – Влияние эритропоэтина на показатели кислородтранспортной функции крови у крыс при ишемии-реперфузии печени ($M \pm m$)

Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа
n	9	8	9
$P50_{\text{реал}}$, мм рт. ст.	$32,37 \pm 0,53$	$41,62 \pm 0,58^*$	$35,07 \pm 1,9\#$
$P50_{\text{станд}}$, мм рт. ст.	$30,91 \pm 0,91$	$34,04 \pm 0,89^*$	$33,53 \pm 1,59$
Hb, г/л	$107,22 \pm 5,63$	$119,75 \pm 8,94$	$140,89 \pm 6,0^*$
MetHb, %	$0,63 \pm 0,18$	$0,41 \pm 0,13$	$0,72 \pm 0,21$
pO_2 , мм рт. ст.	$27,78 \pm 2,71$	$35,25 \pm 1,98^*$	$30,78 \pm 3,61$
pH, ед.	$7,353 \pm 0,024$	$7,227 \pm 0,029^*$	$7,348 \pm 0,019\#$
pCO_2 , мм рт. ст.	$48,31 \pm 4,59$	$56,68 \pm 3,24$	$57,94 \pm 4,7$
HCO_3^- , ммоль/л	$26,64 \pm 1,53$	$24,01 \pm 1,71$	$31,66 \pm 1,68^*\#$
TCO_2 , ммоль/л	$28,14 \pm 1,65$	$25,75 \pm 1,77$	$33,46 \pm 1,82^*\#$
ABE, ммоль/л	$1,21 \pm 1,13$	$-3,63 \pm 1,77^*$	$5,01 \pm 1,1^*\#$
SBE, ммоль/л	$0,89 \pm 1,41$	$-3,81 \pm 2,03^*$	$5,83 \pm 1,47^*\#$
SBC, ммоль/л	$24,61 \pm 0,81$	$20,73 \pm 1,39^*$	$28,4 \pm 1,38^*\#$

Примечания:

- 1) * – достоверное различие по отношению к 1-й группе ($p<0,05$);
- 2) # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе ($p<0,05$).

Установлено, что моделирование ИРП у животных 2-й группы приводило к снижению показателей кислотно-основного состояния (pH, ABE, SBE и SBC) крови, свидетельствуя о развитии метаболического ацидоза, который является неизбежным следствием ишемии данного внутреннего органа [11]. Одновременно, реперфузия печени сопровождалась значительным снижением СГК крови (судя по росту показателей $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд}}$), а также повышением её pO_2 , что – восстано-

ления кислорода (т.н. «утечки» электронов) и образования его активных свободнорадикальных форм, роста активности процессов ПОЛ, с последующим повреждением клеточных и субклеточных мембранных структур гепатоцитов.

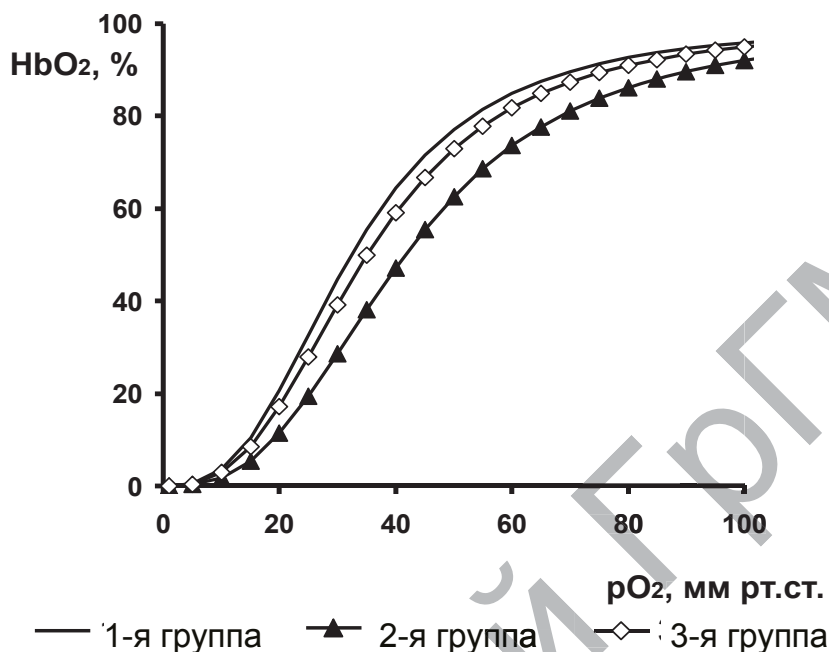


Рисунок 1 – Влияние эритропоэтина на положение кривой диссоциации оксигемоглобина у крыс при ишемии-реперфузии печени

Показано, что направленное снижение СГК в раннем пост-ишемическом периоде с помощью RSR13 способствовало уменьшению повреждений нейронов головного мозга у крыс при неполной ишемии, однако не оказывало протективного эффекта при более глубокой ишемии органа [8]. Возможно, глубокая ишемия мозга способствовала более выраженной блокаде дыхательной цепи митохондрий, а правосторонний сдвиг КДО и увеличение отдачи кислорода в ткани при реперфузии усугубляли дисбаланс между донорами и акцепторами электронов, усиливая генерацию АФК. В данном случае правосторонний сдвиг КДО мог препятствовать улучшению прооксидантно-антиоксидантного состояния, в результате которого усиливалось состояние «относительной гипероксии», когда доставка кислорода кровью с обычным или повышенным его содержанием приводит к усилению генерации АФК тканями после ишемии и развитию окислительного стресса [1, 4].

Введение ЭПО опытным животным способствовало улучшению параметров КТФ крови и сдвигу КДО влево в кон-

це реперфузионного периода. Известно, что сдвиг КДО влево способствует уменьшению отдачи кислорода в ткани [10]. Лимитирование отдачи кислорода в ткани после ишемии, возможно, явилось важным стабилизирующим фактором для работы митохондрий. Показано, что создание умеренной гипоксии при ИРП у кроликов уменьшало активность свободно-радикальных процессов [4]. Механизм левостороннего сдвига КДО в 3-й группе животных мог быть опосредован NO. Под влиянием оксида азота могут образовываться различные формы гемоглобина, разнонаправленно изменяющие СГК. Так, высокие концентрации метгемоглобина и S-нит-розогемоглобина (SNO-Hb) смещают КДО влево, тогда как повышенные концентрации нитрозилгемоглобина ($\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$) сдвигают данную кривую вправо. Учитывая отсутствие изменений в содержании метгемоглобина у исследуемых животных, можно предположить, что смещение КДО влево у крыс 3-й группы было обусловлено повышением концентрации SNO-Hb. Установлено, что предварительное введение ЭПО кроликам за 30 мин. до инъекции липополисахарида способствовало улучшению параметров КТФ крови, повышению СГК через NO-зависимый механизм, снижению окислительного стресса [5]. Нельзя исключить прямых модулирующих эффектов ЭПО на кислородсвязывающие свойства крови.

Известно, что активация продукции ЭПО в организме опосредуется ГИФ, ответственным за активацию транскрипции эритропоэтиновой информационной РНК, синтез фактора роста эндотелия сосудов, индуктора ангиогенеза, увеличивающего потребление кислорода тканями [2]. Возможно, окислительный стресс при ИРП препятствует реализации физиологических защитных эффектов ГИФ, тогда как введение ЭПО перед ИРП напрямую активирует рецепторы чувствительных к нему клеток, что приводит к коррекции реперфузионных повреждений органа. Важно отметить, что повышение продукции оксида азота при ИРП должно сопровождаться жестким контролем со стороны антиоксидантной системы, так как взаимодействие NO с АФК приводит к образованию мощного окислителя – пероксинитрита (ONOO^-), способного повреждать белки, липиды и ДНК клеток [13]. В этой связи гемоглобин, образуя SNO-Hb,

может отвлекать определенную часть NO от свободнорадикальных реакций, одновременно снижая поступление O₂ в ткани и генерацию в них АФК в постишемическом периоде. Кроме того известно, что СГК крови может принимать участие в механизмах антиоксидантной защиты тканей, контролируя поток кислорода и тканевое pO₂ [4, 9].

Таким образом, ИРП приводит к нарушению кислотно-основного состояния и снижению СГК крови у экспериментальных животных. Однократное введение ЭПО опытным животным способствует модификации кислородсвязывающих свойств и улучшению параметров кислотно-основного состояния, что отражает улучшение метаболических процессов в печени в остром постишемическом периоде. Выявленное повышение СГК крови при моделировании ИРП у крыс может быть важным механизмом протективного влияния ЭПО, лимитирующим эффекты окислительного стресса при данной патологии.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). – М.: Медицина, 1989.
2. Захаров Ю.М. Неэритропоэтические функции эритропоэтина // Росс. физиол. журн. им. Сеченова. 93 (6) : 592-608. 2007.
3. Зинчук В.В., Глуткин С.В., Шульга Е.В. Эритропоэтин и кислородтранспортная функция крови. Эксперим. и клин. фармакол. 75(1): 39-42. 2012.
4. Зинчук В.В., Ходосовский М.Н. Участие кислородзависимых процессов патогенезе реперфузионных повреждений печени // Успехи физиол. наук. 37 (4) : 45-56. 2006.
5. Зинчук В.В., Шульга Е.В., Гуляй И.Э. Влияние эритропоэтина на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние у кроликов при введении липополисахарида // Росс. физиол. журн. им. Сеченова. 96 (1) : 43- 49. 2010.
6. Alchera E., Dal Ponte C., Imarisio C., Albano E., Carini R. Molecular mechanisms of liver preconditioning. World J. Gastroenterol. 16 (48) : 6058-6067. 2010.
7. Bahcekapili N., Uzüm G., Gökkusu C., Kuru A., Ziylan Y.Z. The relationship between erythropoietin pretreatment with blood-brain barrier and lipid peroxidation after ischemia/reperfusion in rats. Life Sci. 80 (14): 1245-1251. 2007
8. Grocott H.P., Bart R.D., Sheng H., Miura Y., Steffen R., Pearlstein R.D., Warner D.S. Effects of a synthetic allosteric modifier of hemoglobin oxy-

gen affinity on outcome from global cerebral ischemia in the rat. *Stroke*. 29 (8): 1650-1655. 1998.

9. Hlutkin S.V., Zinchuk V.V. Effect of melatonin on the blood oxygen transport during hypothermia and rewarming in rats. *Adv. Med. Sci.* 53 (2): 234-239. 2008.

10. Hsia C.C. Respiratory function of hemoglobin. *N. Engl. J. Med.* 338 (4): 239-247. 1998.

11. Kanoria S., Glantzounis G., Jalan R., Davies N.A., Seifalian A.M., Williams R., Davidson B.R. A model to study total hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 36 (9): 2586-2589. 2004.

12. Moeini M., Nematbakhsh M., Fazilati M., Talebi A., Pilehvarian A.A., Azarkish F., Eshraghi-Jazi F., Pezeshki Z. Protective role of recombinant human erythropoietin in kidney and lung injury following renal bilateral ischemia-reperfusion in rat model. *Int. J. Prev. Med.* 4 (6) : 648-655. 2013.

13. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol. Int.* 3 (4): 526-536. 2009.

14. Nandra K.K., Collino M., Rogazzo M., Fantozzi R., Patel N.S., Thiemermann C. Pharmacological preconditioning with erythropoietin attenuates the organ injury and dysfunction induced in a rat model of hemorrhagic shock. *Dis. Model. Mech.* 6 (3): 701-709. 2013.

15. Shawky H.M., Younan S.M., Rashed L.A., Shoukry H. Effect of recombinant erythropoietin on ischemia-reperfusion-induced apoptosis in rat liver. *J. Physiol. Biochem.* 68 (1): 19-28. 2012.

16. Song X., Zhang N., Xu H., Cao L., Zhang H. Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury. *Int. J. Biol. Sci.* 8 (5): 707-718. 2012.

Summary

KHODOSOVSKY M.N., ZINCHUK V.V.

THE POSSIBILITIES OF ERYTHROPOIETIN USING FOR CORRECTION OF THE BLOOD OXYGEN TRANSPORT MECHANISMS DURING HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION

Grodno State Medical University

Grodno, Belarus

The parameters of blood oxygen transport ($p50_{\text{stand}}$, $p50_{\text{real}}$, pO_2 , pCO_2 , pH, HCO_3^- , TCO_2 , ABE, SBC ect.) were determined in rats during the hepatic ischemia/reperfusion (HIR) under preliminary single injections of recombinant human erythropoietin (rhEPO, i.p. 1000 IU/kg, 30 min before ischemia). Hepatic ischemia was induced for 30 min by Pringle maneuver, reperfusion lasted 120 min. The experiments had shown that HIR led to the significant decreases in the hemoglobin oxygen affinity and metabolic acidosis.

rhEPO infusion leads to oxyhemoglobin dissociative curve shift leftwards and improves parameters of blood acid-base balance at the end of reperfusion period.

Key words: oxygen, erythropoietin, liver, ischemia, reperfusion, rats.

УДК 616.53-002.282.[612.123+577.121.7]

ЯРМОЛИК Е.С., ХВОРИК Д.Ф., ГУЛЯЙ И.Э.

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА У ПАЦИЕНТОВ С РОЗАЦЕА

Кафедра дерматовенерологии

(зав. кафедрой – профессор Хворик Д.Ф.)

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Гродно, Беларусь

Резюме. В нашем исследовании изучены процессы перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы у 97 пациентов с папуло-пустулезной формой розацеа. Результаты исследования показывают, что розацеа является состоянием оксидативного стресса. Это подтверждается повышением активности показателей свободнорадикального окисления на фоне снижения антиоксидантной защиты. Данные изменения являются патогенетическим звеном развития заболевания и требуют коррегирующей терапии.

Ключевые слова: розацеа, папулопустулезная форма, этиопатогенез, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита.

Введение. Проблема диагностики, лечения и профилактики розацеа заслуживает пристального внимания клиницистов и экспериментаторов. В современном мире распространенность дерматоза составляет приблизительно 10% среди всего населения земли [1]. Этиология заболевания до конца не изучена. В течение нескольких десятилетий выдвигаются новые гипотезы, касающиеся этиологии и патогенеза розацеа, часто носящие