



ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ ПРИ ИШЕМИЧЕСКИХ И РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ПЕЧЕНИ

Н.И. ЖЕРНАКОВА¹
С.А. АЛЕХИН²
Д.И. КОЛМЫКОВ²
А.А. ДОЛЖИКОВ¹
И.М. КОЛЕСНИК²
Л.В. ИВАНОВА²
Т.Г. ПОКРОВСКАЯ¹
Д.В. ЛОПАТИН²
Л.В. КОТЕЛЬНИКОВА²

¹⁾ Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

²⁾ Курский государственный
медицинский университет

e-mail: mpokrovsky@yandex.ru

Длительная ишемия печени с последующей реперфузией ведет к значительному падению объемного кровотока в микроциркуляторном русле, что сопровождается выраженными дистрофическими и некробиотическими изменениями паренхимы. Прямое и дистантное ишемическое preconditioning значительно повышает уровень объемного кровотока в печеночной паренхиме, это особенно заметно к концу периода реперфузии, что сопровождается уменьшением зон некроза и дистрофических изменений.

Ключевые слова: ишемическое preconditioning, дистантное preconditioning, микроциркуляция.

Ишемическое повреждение тканей лежит в основе патогенеза многих заболеваний, реализуясь через целый ряд повреждающих процессов, нарастающих по интенсивности при увеличении продолжительности ограничения кровотока. С широким распространением сердечно-сосудистой хирургии исследователи также стали отмечать, что не только прекращение кровотока, но и его восстановление после эпизода длительной ишемии ведет к еще большему повреждению тканей органа, такие повреждения получили название реперфузионных. Было выявлено, что реперфузионные повреждения – серьезная причина увеличения зоны некроза при возобновлении кровотока, связанная с активацией воспалительного ответа через повышение экспрессии ядерного фактора транскрипции NFκB и последующим запуском каскада системного воспаления [2, 3, 4, 6, 7].

Однако ишемия может оказывать не только патологическое воздействие. В 1986 году группой под руководством С.Е. Murry был впервые описан защитный эффект ишемического воздействия [5], однако до настоящего времени данный феномен остается во многом неизученным.

Целью нашего исследования стало изучение влияния ишемического прямого и дистантного preconditioning на объемный кровоток в микроциркуляторном русле печени и характер патоморфологических изменений в печени при ее глубокой ишемии и реперфузии.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на самках белых крыс линии Wistar одного возраста массой 250-280 г. Для исследования взяты крысы без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим и содержавшиеся в стандартных условиях вивария Курского государственного медицинского университета. С целью исключения влияния различного кровенаполнения внутренних органов в зависимости от фаз пищеварения на результаты исследования кормление прекращалось за 24 часа.

Животные были распределены по группам следующим образом:

- исходные показатели (10 животных);
- контрольная группа (20 животных) – группа, в которой моделировалась глубокая 30-минутная ишемия печени с последующей 30-минутной реперфузией;
- группа прямого ишемического preconditioning (20 животных) – в данной группе проводилось исследование влияния прямого ишемического preconditioning на течение 30-минутной ишемии печени и последующей 30-минутной реперфузией;



- группа прямого ишемического preconditionирования на фоне введения глибенкламида (20 животных) – в данной группе проводилось исследование влияния прямого ишемического preconditionирования на течение 30-минутной ишемии печени с последующей 30-минутной реперфузией на фоне введения глибенкламида в дозировке 5 мг/кг;

- группа дистантного ишемического preconditionирования (20 животных) – в данной группе проводилось исследование влияния дистантного ишемического preconditionирования на течение 30-минутной ишемии печени с последующей 30-минутной реперфузией;

- группа дистантного ишемического preconditionирования на фоне введения глибенкламида (20 животных) – в данной группе проводилось исследование влияния дистантного ишемического preconditionирования на течение 30-минутной ишемии печени с последующей 30-минутной реперфузией на фоне введения глибенкламида в дозировке 5 мг/кг.

Уровень микроциркуляции определяли при помощи оборудования BiopacsystemsMP100 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDF100C и инвазивным игольчатым датчиком TSD144 в перфузионных единицах (ПЕ).

Запись и обработку данных производили при помощи программы AcqKnowledge 3.9.0.

Для определения характера нарушений при ишемических и реперфузионных поражениях выполняли стандартное патоморфологическое исследование.

Статистический анализ полученных данных осуществляли при помощи программы MicrosoftExcel версии 2007, рассчитывая средние значения (М) показателей и ошибку средних (m), критерий достоверности (p); статистически достоверными считали различия при значениях $p \leq 0,05$.

Все манипуляции производили под общим обезболиванием путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозировке 300 мг/кг.

Глубокую ишемию ткани печени воспроизводили путем пережатия гепатодуоденальной связки на 30 минут. Эффективность пережатия контролировали при помощи ЛДФ, считая эффективным такое пережатие, при котором отмечалось снижение микроциркуляции до недетектируемых величин.

Прямое ишемическое preconditionирование осуществляли путем пережатия гепатодуоденальной связки. Время пережатия рассчитывали исходя из уровня перфузии ткани, контролируя эффективность прекращения кровотока при помощи ЛДФ. В среднем время прекращения кровотока составило 10 мин.

Дистантное ишемическое preconditionирование осуществляли путем наложения жгута на верхнюю треть бедра на 10 минут с последующей 30-минутной реперфузией до воспроизведения эпизода глубокой ишемии [1].

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования было установлено, что исходное значение уровня микроциркуляции в печени составляет $850,48 \pm 19,75$ ПЕ. При воспроизведении эпизода глубокой ишемии перфузия ткани в течение 3 минут уменьшается до недетектируемых величин. В течение первой минуты реперфузии отмечается незначительный рост микроциркуляции тканей до $56,79 \pm 5,55$ ПЕ, отчетливо видно восстановление микроциркуляции тканей к 15-й минуте до $340,07 \pm 39,92$ ПЕ, которое сменялось выраженным падением до $137,14 \pm 5,62$ ПЕ к 30-й минуте реперфузии.

При патоморфологическом исследовании 30-минутная ишемия характеризовалась глубокими дистрофическими и некробиотическими изменениями с их максимальной выраженностью в центрах долек (рис. 1А). При восстановлении кровотока наиболее показательным сроком была 30-я минута реперфузии. При патоморфологическом исследовании было отмечено увеличение глубины некробиотических изменений, к которым присоединялись геморрагические явления (рис. 1Б).

Подобная динамика показателей объемной микроциркуляции и морфологических изменений в печени вписываются в общую концепцию, объясняющую характер реперфузионных поражений, и согласуется с данными большинства авторов.

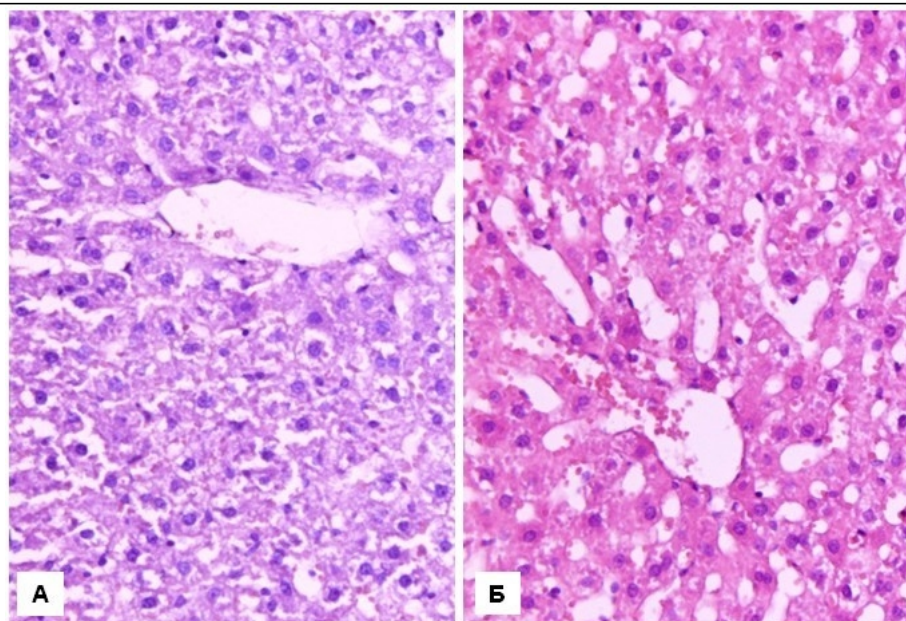


Рис. 1. Патоморфологическая картина изменений в печени при ишемии (а) и реперфузии (б). Микрофото. Окраска Г+Э, увеличение X 200

При прямом ишемическом прекондиционировании реперфузия после эпизода 30-минутной ишемии была на уровне $118,09 \pm 17,43$ ПЕ, нарастая на 15-й минуте до $350,71 \pm 33,47$, а на 30-й минуте до $451,48 \pm 25,80$ ПЕ.

С целью определения механизма реализации протекторного влияния прямого ишемического прекондиционирования в качестве фармакоанализатора был использован глибенкламид, который вводили в дозе 5 мг/кг за 30 минут до проведения прекондиционирования внутрибрюшинно. Глибенкламид практически полностью отменял эффект воздействия прямого ишемического прекондиционирования на микроциркуляцию, которая составила $64,83 \pm 8,68$, $324,57 \pm 23,58$ и $160,29 \pm 18,70$ ПЕ на 1-й, 15-й и 30-й минуте реперфузии соответственно.

При патоморфологическом исследовании в группе прямого ишемического прекондиционирования отмечается как уменьшение выраженности дистрофических явлений, так и уменьшение зон некроза. Также обращает на себя внимание меньшая выраженность расстройств микроциркуляции, проявляющаяся в уменьшении стазов и геморрагий как при ишемии, так и при реперфузии (рис. 2). При введении глибенкламида в дозе 5 мг/кг действие прямого ишемического прекондиционирования на ишемию и реперфузию практически полностью нивелируется.

Дистантное ишемическое прекондиционирование, проведенное по описанной выше методике за 30 минут до воспроизведения эпизода глубокой ишемии, приводило к росту перфузии ткани на первой минуте восстановления кровотока в печени до $98,02 \pm 8,44$ ПЕ. К 15-й минуте продолжался рост перфузии, который составил $312,16 \pm 12,60$ ПЕ. В отличие от контрольной группы 30-я минута реперфузии характеризовалась увеличением объемного кровотока до $419,84 \pm 19,33$ ПЕ, что достоверно отличается ($p \leq 0,05$) от группы без прекондиционирования, не достигая однако уровня перфузии в группе прямого ишемического прекондиционирования. Также как и в случае с прямым ишемическим прекондиционированием, протекторный эффект дистантного прекондиционирования практически полностью блокировался введением глибенкламида в дозе 5 мг/кг. Перфузия составила $58,31 \pm 5,09$; $331,72 \pm 18,32$ и $149,50 \pm 11,7$ на сроках 1-й, 15-й и 30-й минуты реперфузии соответственно, что сопоставимо с контрольной группой.

Протекторный эффект дистантного ишемического прекондиционирования отмечался также и при морфологическом исследовании. Также как и в случае прямого прекондиционирования протекторный эффект заключался в уменьшении дистрофических явлений, уменьшении зон некроза, однако не достигая такового по величине зон и выраженности явлений (рис. 3). Эффект от дистантного ишемического прекондиционирования нивелировался при введении глибенкламида (рис. 4).

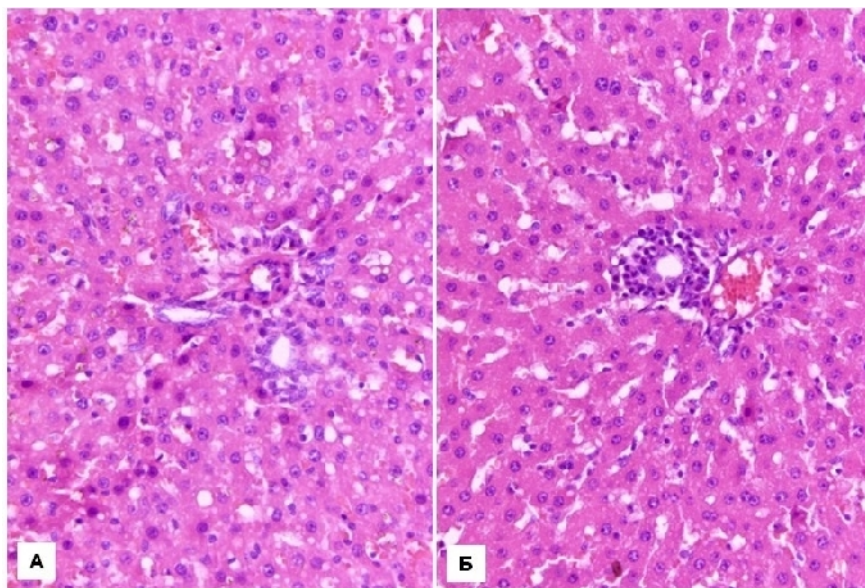


Рис. 2. Патоморфологические изменения в печени при влиянии ишемического прекондиционирования на глубокую ишемию (а) и последующую реперфузию (б). Микрофото. Окраска Г+Э, увеличение X 200.

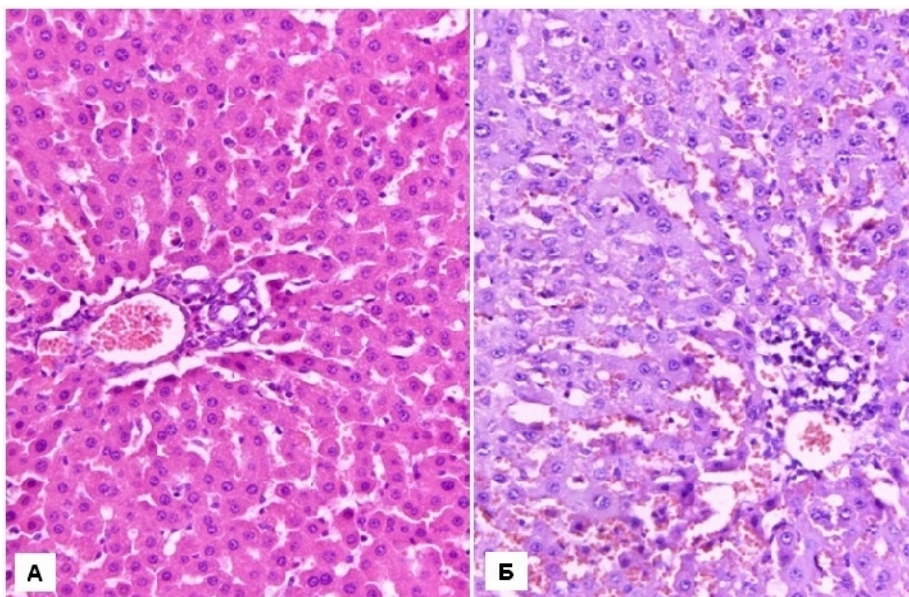


Рис. 3. Патоморфологические изменения в печени при влиянии дистантного ишемического прекондиционирования на глубокую ишемию (а) и реперфузию (б). Микрофото. Окраска Г+Э, увеличение X 200

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что прямое ишемическое прекондиционирование обладает выраженным протекторным эффектом, который проявляется в увеличении объемной перфузии ткани печени, причем наиболее выраженная разница с контрольной группой отчетливо заметна на сроке 30 минут реперфузии. На 30-й минуте реперфузии объемный кровоток в контрольной группе падает на 83,88% по сравнению с интактной группой. В то же время при действии прямого ишемического прекондиционирования объемный кровоток падает всего на 46,92% по сравнению с интактной группой. При сравнении эффективности протекторного влияния прямого и дистантного ишемического прекондиционирования было установлено, что при действии последнего объемный кровоток на 30-й минуте реперфузии падает до 50,64% по сравнению с интактной группой, что позволяет сделать вывод о том, что прямое прекондиционирование оказывает хоть и незначительно, но более выраженное протекторное действие в отношении восстановления объемного кровотока в печени.

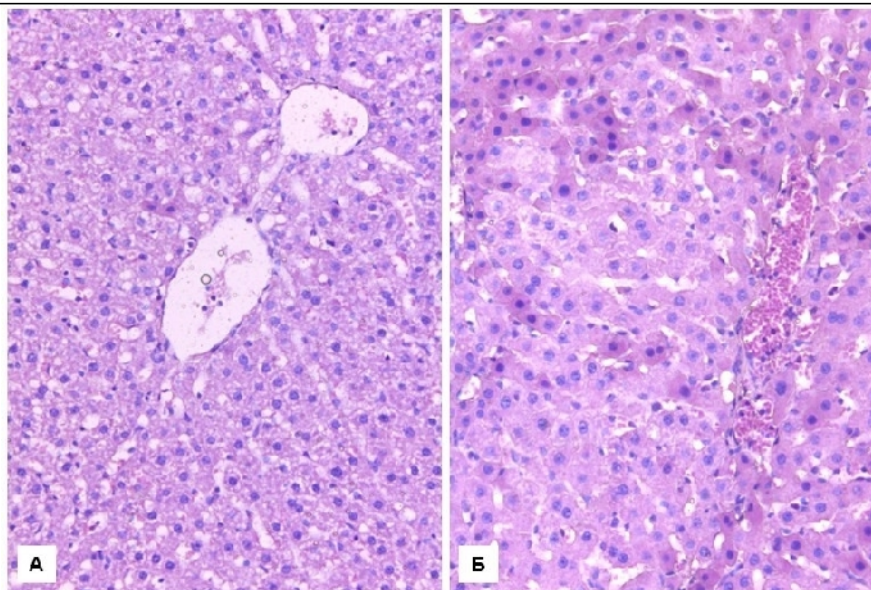


Рис. 4. Патоморфологические изменения в печени при отмене действия дистантного ишемического preconditionирования глибенкламидом 5 мг/кг при глубокой ишемии (а) и последующей реперфузии (б). Микрофото. Окраска Г+Э, увеличение X 200

Подобный феномен не может быть до конца объяснен противоишемическим действием как прямого, так и дистантного ишемического preconditionирования, который опосредован выбросом аденозина, что косвенно свидетельствует о вовлечении других триггеров. Это подтверждается и другими исследованиями в области preconditionирования на других моделях и целевых органах. Однако отмена эффекта на фоне действия глибенкламида говорит о реализации протекторного влияния ишемического preconditionирования на микроциркуляцию в печени через K^+ зависимую АТФазу, что подтверждается и данными других авторов. Подобный эффект может объясняться многоуровневостью действия ишемического preconditionирования (клеточный, тканевой, организменный) и приоритетностью действия определенного триггера на своем уровне. Однако при этом на всех уровнях и во всех клетках конечное действие реализуется через K^+ зависимую АТФазу.

Выводы:

1. 30-минутная ишемия и последующая 30-минутная реперфузия печени ведет к значительному падению объемного кровотока в микроциркуляторном русле, что сопровождается выраженными дистрофическими и некробиотическими изменениями паренхимы.
2. Прямое ишемическое preconditionирование оказывает выраженное действие на уровень объемного кровотока в печеночной паренхиме к концу 30-минутного периода реперфузии, повышая его в 3,3 раза по сравнению с контрольной группой на том же сроке, что ведет к значительному уменьшению зон некроза и дистрофических изменений.
3. Дистантное ишемическое preconditionирование обладает менее выраженным действием на восстановление объемного кровотока в 1,1 раза.
4. Действие как прямого, так и дистантного preconditionирования на восстановление микроциркуляции в печени после эпизода 30-минутной ишемии и 30-минутной реперфузии реализуется через K^+ зависимую АТФазу.

Исследование выполнено в рамках государственного задания на НИОКР (госконтракт №4.913.2011).

Литература

1. Влияние дистантного preconditionирования 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.



2. Fondevila, C. Hepatic ischemia/reperfusion injury; a fresh look / C. Fondevila, R.W. Busuttil, J.W. Kupiec-Weglinski // *Exp. Mol. Pathol.* – 2003. – Vol. 74. – P. 86-93.
3. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog / R.B. Jennings, H.M. Sommers, G.A. Smyth et al. // *Arch Pathol.* – 1960. – Vol. 70. – P. 68-78.
4. Preconditioning Protects against Liver Ischemia-Reperfusion Injury / I. Kunihiro, A. Tsung, G. Jeyabalan, et al. // *J. Immunol.* – Jun 2006. – Vol. 176. – P. 7154-7158.
5. Murry, C.E. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium / C.E. Murry, R.B. Jennings, K.A. Reimer // *Circulation.* – 1986. – Vol. 74. – P. 1124-1136.
6. Protective strategies against ischemic injury of the liver / N. Selzner, H. Rudiger, R. Graf et al. // *Gastroenterology.* – 2003. – Vol. 125. – P. 917-936.
7. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion / A. Tsung, R. Sahai, H. Tanaka et al. // *J. Exp. Med.* – 2010. – P. 1135-1143.

PRECONDITIONING IN LIVER ISCHEMIA REPERFUSION INJURY

N.I. GERNAKOVA¹, S.A. ALEHIN²
D.I. KOLMIKOV², A.A. DOLGIKOV¹
I.M. KOLESNIK², L.V. IVANOVA²
T.G. POKROVSKAYA¹
D.V. LOPATIN²
L.V. KOTELNIKOVA²

¹⁾ *Belgorod National Research University*

²⁾ *Kursk State Medical University e-mail: mpokrovsky@yandex.ru*

Sustained ischemia and subsequent reperfusion leads to significant reduction of volumetric blood flow in microcirculatory vessels and follow to dystrophic and necrobiotic changes in liver parenchyma. Both direct and remote ischemic preconditioning increase volumetric blood flow in liver microcirculatory vessels, especially at reperfusion period and result in diminishing of necrotic and dystrophic areas.

Key words: ischemic preconditioning, remote preconditioning, microcirculation.