

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ ЭРИТРОПОЭТИНОМ НА СОСТОЯНИЕ РЕЗЕЦИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© Колесник И.М.<sup>1</sup>, Лазаренко В.А.<sup>1</sup>, Покровский М.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра хирургических болезней ФПО Курского государственного медицинского университета, Курск; <sup>2</sup> кафедра фармакологии Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород  
E-mail: [kolesnik\\_inga@mail.ru](mailto:kolesnik_inga@mail.ru)

Исследовано влияние фармакологического прекондиционирования рекомбинантным эритропоэтином в субэритропоэтической дозе на состояние резецированной печени белых крыс линии Wistar. Резекцию печени осуществляли на вторые сутки эксперимента в объеме 70%. Рекомбинантный эритропоэтин вводили внутривентриально в суточной дозе 2,5 МЕ/кг первые 7 суток эксперимента каждые 48 часов. Установили, что фармакологическое прекондиционирование рекомбинантным эритропоэтином оказывает выраженный стимулирующий эффект на регенерацию резецированной печени, о чем свидетельствует: снижение летальности от пострезекционной печеночной недостаточности, значительное уменьшение выраженности симптомов пострезекционной печеночной недостаточности в сравнении с контрольной группой; восстановление объема, структуры и функций резецированного органа до 28 суток после резекции, что не наблюдалось в контрольной группе.

**Ключевые слова:** фармакологическое прекондиционирование, рекомбинантный эритропоэтин в субэритропоэтической дозе, резекция печени, регенерация печени, лазерная доплеровская флоуметрия.

### ASSESSMENT OF THE IMPACT OF PHARMACOLOGICAL PRECONDITIONING WITH RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN ON THE STATE OF THE RESECTED LIVER IN EXPERIMENT

*Kolesnik I.M.<sup>1</sup>, Lazarenko V.A.<sup>1</sup>, Pokrovskiy M.V.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Department of Surgical Diseases of FPE of Kursk State Medical University, Kursk;

<sup>2</sup> Department of Pharmacology of Belgorod State National Research University, Belgorod

The effect of pharmacological preconditioning with recombinant erythropoietin in sub-erythrostimulating dose on the state of the resected liver in white Wistar rats is studied. 70% liver resection was performed on the second day of the experiment. Recombinant erythropoietin was administered intraperitoneally at a daily dose of 2.5 IU/kg during the first 7 days of the experiment, every 48 hours. We found that pharmacological preconditioning with recombinant erythropoietin has a pronounced stimulating effect on the regeneration of the resected liver, as evidenced by reducing the mortality of post-resection liver failure, a significant reduction in the severity of symptoms of post-resection liver failure compared with the control group; recovery of volume, structure and functions of the resected organ until 28 days after resection, which was not observed in the control group.

**Keywords:** pharmacological preconditioning, recombinant erythropoietin in sub-erythrostimulating dose, liver resection, liver regeneration, laser doppler flowmetry.

Феномен восстановления печени после ее повреждения впервые был описан Эсхилом в трагедии «Прикованный Прометей». За последний век множество работ было посвящено изучению этого процесса. Возможность восстановления поврежденной печени изучалась на различных моделях. Восстановительные процессы в них имеют свои характерные особенности. Резекционные модели повреждения печени нашли большое распространение при изучении возможности восстановления органа после хирургических вмешательств. Радикальные хирургические вмешательства на печени способствуют уменьшению кровотока, объема органа, что влечет грозное осложнение – пострезекционную печеночную недостаточность. Летальность от данного осложнения колеблется в довольно широких пределах, что обусловлено имеющей место патологией [2].

Регенерация печени как органа в целом с восстановлением его функций является одним из важнейших показателей в хирургической гепатологии, определяя во многом исход оперативных вмешательств. В то же время во всех живых организмах заложены сложные механизмы самосохранения и восстановления. Задача ученых изучить и найти способы их активации. В этой связи феномен ишемического прекондиционирования заслуживает самого детального исследования. Известно, что в процессе прекондиционирования не только снижается объем некротической зоны, но и стимулируется фундаментальное геномное перепрограммирование клеток, способствующее активизации репаративных и регенеративных процессов, которые так важны в хирургии [1, 4]. Внедрение в практику фармакологических средств, способствующих активации и продле-

нию этого естественного защитного механизма позволит значительно улучшить результаты лечения [4, 12]. Многочисленные исследователи склонны рассматривать гуморальным агентом прекондиционирования эритропоэтин [4, 5, 6]. Это гликопротеиновый гормон, синтез которого стимулирует гипоксия. Открытие рецепторов эритропоэтина на мезангиальных клетках и в миокарде, фибробластах мышечной и нервной ткани позволило изучать неэритропоэтические функции гормона [3, 7, 11]. Однако для их изучения необходимо «выключить» стимуляцию эритропоэза. Экспериментальные исследования показали, что малые дозы препарата таким эффектом не обладают [4]. Доказанная способность стимулировать неоангиогенез позволяет предположить эффективность применения рекомбинантного эритропоэтина для стимуляции регенераторных процессов [4, 6].

Цель настоящего исследования – установить влияние фармакологического прекондиционирования рекомбинантным эритропоэтином в субэритропоэтической дозе на состояние резецированной печени крыс.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент выполнен на 170 белых крысах линии Wistar массой 210-220 г. Экспериментальные животные были разделены на следующие группы:

1. Интактные (n=20)
2. Ложнооперированные (n=50);
3. Резекция печени (n=50);
4. Резекция печени + эритропоэтин (n=50);

Резекцию печени производили лабораторным животным на вторые сутки эксперимента в объеме 70%. Выбор такого объема обусловлен литературными данными. Модель резекции печени у крыс была впервые описана в 1931 г. G. Higgins и R. Anderson [9]. Позже было показано, что у взрослых крыс при объеме резекции от 40 до 70% отмечается прямо пропорциональная связь между объемом резекции и синтезом ДНК: в случае резекций объемом менее 30% регенерация протекает медленно, а в случае резекций объемом более 85% регенерация является неэффективной и сопровождается высокой летальностью [10]. Однако модели с небольшим объемом резекции (<45%) печени нельзя считать адекватными, так как степень повреждения печени в таких случаях является незначительной. Модели с большим объемом резекции ( $\geq 70\%$ ), напротив, являются наиболее удачными, так как позволяют смоделировать проблемную ситуацию, наиболее близкую к таковой в клинической практике [10].

Крыс наркотизировали внутривенным введением золептила. После наркотизации крысу фиксировали в положении на спине. Шерсть на брюшке тщательно выстригали, кожу обрабатывали 70% раствором этилового спирта. Среднюю лапаротомию выполняли от мечевидного отростка длиной 4 см. Печень мобилизовывали посредством пересечения связок. Удаляли левую и медиальную доли после предварительного лигирования сосудов. Лапаротомное отверстие ушивали после санации брюшной полости и контроля гемостаза послойно узловым швом.

Стимуляцию регенерации печени проводили у животных 4-й группы внутривенным введением рекомбинантного эритропоэтина в суточной дозе 2,5 МЕ/кг первые семь суток эксперимента каждые 48 часов. Режим введения препарата обусловлен следующим. В нашем исследовании мы рассматривали эритропоэтин как препарат для фармакологического прекондиционирования. Учитывая, что в восстановительных процессах важную роль играет генетический репрограмминг клетки, происходящий во «второе окно» прекондиционирования, первое введение препарата осуществляли за сутки до проведения гепатэктомии. Известно, что частое – ежедневное прекондиционирование приводит к отмене эффекта [1, 8]. Мы вводили препарат каждые 48 часов, так как к этому времени эффект прекондиционирования ослабевает [1, 4, 8], в течение первых 7 суток эксперимента, в связи с тем, что на данном этапе наиболее эффективна активация регенераторных процессов [4].

Уровень микроциркуляции в печени определяли при помощи оборудования производства компании Biopac systems: полиграфа MP100 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии LDF100C и поверхностного датчика TSD 140 на 2-е, 7-е, 14-е, 21-е и 28 сутки после операции. Регистрацию и обработку результатов лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) производили с помощью программы AcqKnowledge версии 4.2, значения микроциркуляции выражали в перфузионных единицах (ПЕ). Запись кривой уровня микроциркуляции осуществляли по всей поверхности печени в течение 30 секунд в каждой точке. Из полученных значений выводили среднее, которое вносили в протокол и принимали за уровень микроциркуляции в печени у данного животного. Далее рассчитывали среднее значение уровня микроциркуляции в данной группе животных на данном сроке исследования.

Выраженность цитолиза оценивали по уровню показателей АлАТ, АсАТ и ЛДГ в крови экспериментальных животных на 2-е, 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки после операции. Показатели определяли УФ кинетическим методом.

О синтетической функции печени судили по показателям коагулограммы (АЧТВ, МНО, фибриноген) на 7-е, 14-е, 21-е и 28 сутки после операции.

Морфологическое исследование выполняли на материале стандартных участков печени, взятых после выведения животных из эксперимента. Обработку материала производили по стандартной методике с фиксацией в формалине, заливкой в парафин, окраской гематоксилином и эозином. Общеморфологическое и морфометрическое исследование выполняли с применением системы для сканирования и архивирования изображений MiraxDesk.

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Microsoft Excel версии 10.0 при помощи средств пакета анализа. «Описательная статистика» применялась для нахождения среднего значения (М) показателей и ошибки среднего (m). «Двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями» использовался для сравнения соответствующих показателей в различных группах животных и определения достоверности различий между ними. Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показатель летальности оценивали в экспериментальных группах животных в первые 10 суток после операции. В группе животных с резекцией печени он равен 40%, в группе животных с резекцией печени и введением рекомбинантного эритропоэтина летальных исходов не было.

В группе интактных животных уровень микроциркуляции в печени составил  $877 \pm 17$  ПЕ. Показатели уровня микроциркуляции у животных опытных групп представлены в таблице 1.

Среднее значение уровня микроциркуляции в печени ложнооперированных животных на всех

сроках не имеет достоверных отличий от такового у интактных крыс ( $p > 0,1$ ).

После резекции печени показатель снижается на 50% и остается на прежнем уровне первые 14 суток. К 21 суткам показатель начинает расти, однако на 28-е сутки среднее значение уровня микроциркуляции в резецированной печени крыс достоверно ниже такового у интактных животных ( $p < 0,05$ ).

Введение рекомбинантного эритропоэтина способствовало сохранению кровотока в резецированной печени на довольно высоком уровне (показатель снижается на 15%) и восстановлению его на сроке до 21-х суток после резекции.

АлАТ в контрольной группе на 2-е сутки  $108 \pm 4$  МЕ/л – снижается до нормальных показателей к 21 суткам –  $38 \pm 2$  МЕ/л, в группе с эритропоэтином на 2-е сутки –  $60 \pm 2$  МЕ/л – нормализуется на 7-е сутки и остается в пределах нормальных значений на всех остальных сроках эксперимента.

АсАТ в контрольной группе на 2-е сутки  $184 \pm 7$  МЕ/л – снижается до нормальных показателей к 21 суткам, в группе с эритропоэтином на 2-е сутки –  $82 \pm 3$  МЕ/л – нормализуется на 14-е сутки и остается в пределах нормальных значений на всех остальных сроках эксперимента.

ЛДГ в контрольной группе на 2-е сутки  $564 \pm 3$  МЕ/л – снижается до нормальных показателей к 28 суткам –  $250 \pm 6$  ЕД/л, в группе с эритропоэтином на 2-е сутки –  $300 \pm 8$  МЕ/л – нормализуется на 7-е сутки и остается в пределах нормальных значений на всех остальных сроках эксперимента.

На 7-е сутки после резекции печени отмечено снижение синтетической функции печени, проявляющееся удлинением АЧТВ до  $60 \pm 1$  сек, увеличением МНО до  $4 \pm 0,2$ , снижением уровня фибриногена до  $1,7 \pm 0,002$  г/л. Наибольшие изменения показателей выявлены на 21-е сутки (АЧТВ –  $75 \pm 1$  сек, МНО –  $6 \pm 0,1$ , фибриноген  $0,9 \pm 0,003$  г/л). На 28-е сутки отмечается их некоторое восстановление (АЧТВ –  $55 \pm 1$  сек, МНО –  $4 \pm 0,1$ , фибриноген  $1,2 \pm 0,002$  г/л).

Таблица 1

Показатели уровня микроциркуляции в печени животных опытных групп (М±m) в перфузионных единицах (ПЕ) на 2-е, 7-е, 14-е, 21-е и 28 сутки после операции

Группа	Уровень микроциркуляции в печени в ПЕ				
	2-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
Ложнооперированные	$881 \pm 14$	$860 \pm 19$	$872 \pm 21$	$875 \pm 9$	$880 \pm 12$
Резекция печени	$421 \pm 14^*$	$429 \pm 9^*$	$501 \pm 11^*$	$591 \pm 17^*$	$637 \pm 19^*$
Резекция печени + эритропоэтин	$740 \pm 19^{**}$	$738 \pm 18^{**}$	$783 \pm 14^{**}$	$933 \pm 21^{**}$	$1110 \pm 31^{**}$

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных ( $877 \pm 17$  ПЕ); \*\* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой животных с резекцией печени на соответствующем сроке; ложная операция – лапаротомия с последующим ушиванием передней брюшной стенки на вторые сутки эксперимента; резекция печени в объеме 70% на вторые сутки эксперимента; эритропоэтин – рекомбинантный эритропоэтин внутривенно в суточной дозе 2,5 МЕ/кг первые семь суток эксперимента каждые 48 часов.

Средняя масса печени животных опытных групп (M±m)  
в граммах на 2-е, 7-е, 14-е, 21-е и 28 сутки после операции

Группа	Средняя масса печени в граммах				
	2-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
Резекция печени	5,1±0,01*	4,2±0,01*	5±0,01*	5,9±0,01*	6,3±0,02*
Резекция печени + эритропозтин	5,4±0,01**	7,3±0,01**	8,3±0,01**	9,3±0,021**	10,2±0,02**

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных (9,2±0,002 грамм); \*\* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой животных с резекцией печени на соответствующем сроке; резекция печени в объеме 70% на вторые сутки эксперимента; эритропозтин – рекомбинантный эритропозтин внутривенно в суточной дозе 2,5 МЕ/кг первые семь суток эксперимента каждые 48 часов.

Коррекция рекомбинантным эритропозтином способствовала менее выраженному снижению синтетической функции печени после ее резекции. Наиболее выраженные изменения показателей были зарегистрированы на 7-е сутки (АЧТВ – 39±1 сек, МНО – 2,5±0,02, фибриноген 1,9±0,01 г/л). К 14-м суткам показатели восстановились и сохранялись в пределах нормы на всех остальных сроках эксперимента.

Масса печени у интактных животных составила 9,2±0,002 гр. В группе ложнооперированных животных показатель не имеет достоверных отличий от такового у интактных животных. Масса печени непосредственно после резекции 2,8±0,003 гр. Средняя масса печени животных опытных групп на различных сроках эксперимента представлена в таблице 2.

В группе животных с резекцией печени масса печени на 2-е сутки увеличивается в сравнении с массой непосредственно после резекции почти в 2 раза, к 7-м суткам несколько уменьшается, затем начинает увеличиваться, однако на 28-е сутки после резекции достоверно меньше массы печени у интактных крыс. В группе животных с резекцией печени и введением рекомбинантного эритропозтина масса печени на 2-е сутки увеличивается ровно в 2 раза, продолжая расти и достигая массы у интактных животных к 21 суткам ( $p < 0,001$ ).

При микроскопии – восстановление печеночной ткани происходило за счет гипертрофии одноядерных гепатоцитов, полиплоидии и amitotического деления двуядерных гепатоцитов. На отдаленных сроках в контрольной группе сохранялось неравномерное кровенаполнение сосудов всех типов, наблюдались очаги зернистой дистрофии гепатоцитов, очаги склерозирования и воспалительной инфильтрации портальных трактов. В группе с введением эритропозтина на ранних сроках определяется равномерно выраженная гипертрофия цитоплазмы и ядер гепатоцитов. Восстановление печеночной ткани происходило за счет полиплоидии, amitotического деления двуядерных гепатоцитов и митотического деления одноядерных гепатоцитов, то есть были за-

действованы все виды регенерации печени. Основная нагрузка приходилась на одноядерные гепатоциты с размером ядра 9 мкм на 2-е и 7-е сутки, что свидетельствовало о стимуляции генетического аппарата клетки. На отдаленных сроках нарушений микроциркуляции и признаков повреждения гепатоцитов не выявлено.

Введение рекомбинантного эритропозтина животным с резекцией 70% печени способствовало: снижению летальности от пострезекционной печеночной недостаточности, значительному уменьшению выраженности симптомов пострезекционной печеночной недостаточности в сравнении с контрольной группой, восстановлению объема, структуры и функций резецированного органа до 28 суток после резекции, что не наблюдалось в контрольной группе.

Результаты проведенного исследования позволяют констатировать, что фармакологическое прекодиционирование рекомбинантным эритропозтином в субэритропозтической дозе оказывает выраженный стимулирующий эффект на регенерацию резецированной печени крыс.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бокерия Л.А., Чичерин И.Н. Природа и клиническое значение «новых ишемических синдромов». – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2007. – 302 с.
2. Вишневский В.А., Коваленко Ю.А., Андрейцева О.И., Икрамов Р.З., Ефанов М.Г., Назаренко Н.А., Тупикин К.А. Пострезекционная печеночная недостаточность: современные проблемы определения, эпидемиологии, патогенеза, оценки факторов риска, профилактики и лечения // Украинский журнал хирургии. – 2013. – № 3. – С. 172-183.
3. Захаров Ю.М. Неэритропозтические функции эритропозтина // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 6. – С. 592-608.
4. Колесник И.М. Дистантное и фармакологическое прекодиционирование. Новые возможности применения в хирургии. – Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. – 123 с.

5. Колесник И.М., Покровский М.В., Лазаренко В.А. Фармакологическое прекондиционирование эритропоэтином – новые возможности оптимизации выживаемости ишемизированных тканей // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2010. – № 3. – С. 32-36.
6. Колесник И.М., Покровский М.В., Покровская Т.Г., Гудырев О.С., Даниленко Л.М., Корокин М.В., АLEXIN С.А., Григоренко А.П., Старосельцева О.А., Должикова И.Н., Братчиков О.И., Молчанова О.В., Ефременкова Д.А., Полянская О.С., Филимонов В.А. Фармакологическое прекондиционирование эритропоэтином при ишемии конечности // Биомедицина. – 2011. – № 4. – С. 90-93.
7. Bahlmann F.H., De Groot K., Spandau J.M., Landry A.L., Hertel B., Duckert T., Boehm S.M., Menne J., Haller H., Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cell // Blood. – 2004. – Vol. 103, N 3. – P. 921-926.
8. Dirnagl U., Becker K., Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia from experimental strategies to clinical use // Lancet. – 2009. – Vol. 8, N 4. – P. 398-412.
9. Higgins G.M., Anderson R.M. Experimental pathology of the liver.I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal // A.M.A. Arch. Path. – 1931. – N 12. – C 186-202.
10. Kountouas J., Boura P., Lygidakis N.J. Liver regeneration after hepatectomy. // Hepatogastroenterology. – 2001. – Vol. 48, N 38. – P. 556-562.
11. Moon C., Krawczyk M., Paik D., Coleman T., Brines M., Juhaszova M., Sollott S.J., Lakatta E.G., Talan M.I. Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2005. – Vol. 316, N 3. – P. 999-1005.
12. Sommer C. Ischemic preconditioning: postischemic structural changes in the brain // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2008. – Vol. 67, N 2. – P. 85-92.