



УДК 615.225:617.735-007.23

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СЕТЧАТКЕ КРЫС ПРИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОМ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИИ ЭРИТРОПОЭТИНОМ, НИКОРАНДИЛОМ НА МОДЕЛИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГЛАЗА

А.А. ПЕРЕСЫПКИНА¹
М.В. ПОКРОВСКИЙ¹
А.С. ШАБЕЛЬНИКОВА¹
А.С. КАШУБА¹
А.А. ДОЛЖИКОВ¹
А.В. ПИРОГОВ²

¹*Белгородский государственный национальный исследовательский университет*

²*Курский государственный медицинский университет*

e-mail: annu_87_@mail.ru

На модели ишемии-реперфузии сетчатки лабораторных крыс показано, что рекомбинантный эритропоэтин (50 МЕ/кг), никорандил (0,6 мг/кг) предотвращают развитие дегенеративных изменений слоев сетчатки, вызванного ишемическим повреждением. Выявление и применение фармакологических средств, обладающих эффектом preconditionирования, может явиться новым подходом в коррекции и профилактике ишемии сетчатки, являющейся ведущим звеном в патогенезе ряда зрительных патологий. Обнаруженный нами протективный эффект эритропоэтина и никорандила при развитии ишемии подтвержден методами электроретинографии и гистоморфометрии и имеет важное значение для разработки антиишемических средств для лечения и профилактики глазных патологий.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия сетчатки, фармакологическое preconditionирование, никорандил, рекомбинантный эритропоэтин, АТФ-зависимые калиевые каналы.

Сетчатка глаза находится в тесном контакте с ретинальными сосудами, которые проходят через все внутренние слои сетчатки и снабжают их кислородом и необходимыми метаболитами. В условиях гипоксии недостаток кислорода приводит к развитию ишемии сетчатки – причины многочисленных офтальмологических заболеваний [4].

Нестабильность и кратковременность эффекта при применении сосудорасширяющих препаратов в комплексе с другими лекарственными средствами и физиотерапевтическими методами лечения ишемии сетчатки привели к необходимости поиска более эффективных способов улучшения кровообращения в глазу [2]. В связи с этим, профилактика и коррекция ишемических заболеваний сетчатки является актуальной проблемой современной офтальмологии и фармакологии, которую можно решить с помощью фармакологического preconditionирования.

Preconditionирование может рассматриваться как универсальный инструмент предупреждения ишемического повреждения тканей, что подтверждается многочисленными мировыми исследованиями. Суммированы доказательства того, что открытие митохондриальных К⁺АТФ каналов действует как ведущий механизм в феномене preconditionирования.

В разных работах показано протективное действие эритропоэтина на ишемию-реперфузию в различных органах и тканях, таких как головной мозг [11], мышечную ткань сосудов [10], сердце [9, 10], заднюю конечность [7], почки [8], плаценту [6], печень [1].

Никорандил оказывает выраженный цитопротекторный эффект на модели изолированного кожного лоскута на питающей ножке у крыс, причем никорандил эффективен в минимальной дозе, не имеющей побочных эффектов, характерных для препарата в обычной дозе. Эффект preconditionирования никорандилом на модели изолированного кожного лоскута на питающей ножке снижается при блокаде АТФ-зависимых калиевых каналов глибенкламидом [3].

Учитывая данные литературы и экспериментальных исследований по фармакологическому preconditionированию, можно предположить, что введение никорандила или рекомбинантного эритропоэтина лабораторным крысам будет оказывать протективный эффект на сетчатку при ишемическом повреждении. Предполагаемый эффект можно подтвердить электроретинографическим и морфологическими методами.

Целью работы явилось изучение влияния дистантного ишемического preconditionирования (ДИП), фармакологического preconditionирования рекомбинантным эритропоэтином, фармакологического preconditionирования никорандилом на электрофизиологические и гистоморфометрические изменения в сетчатке при моделировании ишемии-реперфузии глаза.



Материалы и методы. Опыты проведены на 90 белых лабораторных обоеполюх крысах массой 225-275 г. Моделирование ишемии-реперфузии сетчатки глаза проводили под наркозом (хлоралгидрат, 300 мг/кг массы тела животного, внутривентриально) 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 ДИП, фармакологического прекондиционирования рекомбинантным эритропоэтином, фармакологического прекондиционирования никорандилом выполнено 9 серий эксперимента. Первая группа (n=10) – группа интактных животных, вторая (n=10) – с ишемией-реперфузией сетчатки (контроль), третья (n=10) – с коррекцией патологии ДИП; четвертая (n=10) – с коррекцией эритропоэтином; пятая (n=10) – с коррекцией никорандилом; шестая (n=10) – контроль + глибенкламид (блокатор АТФ-зависимых калиевых каналов); седьмая (n=10) – ДИП + глибенкламид; восьмая (n=10) – эритропоэтин + глибенкламид; девятая (n=10) – никорандил + 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 внутривентриально в субэпистимулирующей дозе 50МЕ/кг однократно за 30 мин до моделирования ишемии.

Для изучения прекондиционирующего эффекта никорандила в дозе 0,6 мг/кг использовали таблетки «Коронель» (ПИК-ФАРМА), содержащие 10 мг никорандила, которые измельчали в ступке, растворяли в крахмальном киселе и вводили животным через зонд внутривентриально 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 судили по электрофизиологическим изменениям в сетчатке крыс через 72 часа реперфузии. Для этого под наркозом (хлоралгидрат, 300 мг/кг массы тела животного, внутривентриально) животное фиксировали. Принцип электроретинографии заключается в регистрации потенциалов клеток сетчатки в ответ на освещение. Оценка электрической активности сетчатки проводили по амплитуде а- и b-волн электроретинограммы (ЭРГ). а-волна – негативная волна, отражающая функциональную активность фоторецепторов, b-волна – позитивная волна, отражающая электрическую активность биполяров и мюллеровских клеток с возможным вкладом горизонтальных и амакриновых клеток. Вызванные биопотенциалы пропускались на частоте 1-1000 Гц, усиливались, усреднялись и представлялись графически на экране при помощи Biopac-systems MP-150 с компьютерной программой AcqKnowledge 4.2 (США). Запись ЭРГ проводили в течение 0,5 секунд у каждой крысы в группах. Для оценки степени развития ишемии сетчатки широко используется соотношение амплитуд b- и а-волн - ЭРГ-индекс b/a (Нероев В.В. и др., 2004). Из полученных десяти значений в каждой серии выводили среднее, которое вносили в протокол.

Затем глазное яблоко подлежало энуклеации. 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 изготвлении 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). Для морфометрии слоев сетчатки использовали программу ImageJ 1.47.

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. Гемодинамические нарушения в системе ретинального кровотока через 72 ч реперфузии после моделирования патологии приводили к электрофизиологическим изменениям в сетчатке, характерным для ишемии, что подтверждает адекватность выбранной модели патологии.

ЭРГ сетчатки интактной крысы и в группе контроля представлены на рисунке 1. Через 72 ч после моделирования ишемии - реперфузии сетчатки амплитуда b-волны ЭРГ снижалась на 32% от исходных значений. Угнетение а-волны ЭРГ отмечалось на данный срок не у всех животных. В тех случаях, когда амплитуда а-волны снижалась, угнетение b-волны было более значительным. Изменения b-волны развиваются, как правило, раньше угнетения а-волны и являются более выраженными из-за ухудшения трофики нейронов внутреннего ядерного слоя сетчатки при нарушениях ретинальной циркуляции [5]. В нашем исследовании при развитии

ишемии сетчатки через 72 ч после моделирования патологии коэффициент b/a снижался до $1,2 \pm 0,04$ при его нормальных значениях у белых лабораторных крыс $2,5 \pm 0,1$ ($p < 0,05$).

На фоне коррекции патологии ДИП коэффициент b/a достоверно возрастал до $2,0 \pm 0,08$ ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля (табл. 1). При коррекции ишемии эритропоетином коэффициент b/a в группе составил $2,3 \pm 0,06$ ($p < 0,05$), что достоверно отличается от значений в группе контроля. При введении никорандила b/a в группе составил $2,2 \pm 0,06$ ($p < 0,05$), что также достоверно отличается от значений в группе контроля. Введение глибенкламида в группах с коррекцией ишемических повреждений предотвращало увеличение показателя b/a за счет блокады АТФ-зависимых калиевых каналов, что подтверждает наличие прекодиционирующих свойств эритропоетина (50 МЕ/кг) и никорандила (0,6 мг/кг) на модели ишемии-реперфузии сетчатки.



Рис. 1. Запись электроретинограммы крысы. А – ЭРГ интактного животного; Б – ЭРГ через 72 часа после моделирования ишемии - реперфузии сетчатки (контроль).

Таблица 1

Значения коэффициента b/a после 72 ч реперфузии при моделировании ишемии сетчатки и при коррекции патологии ($M \pm m$; $n=10$)

№ п/п	Экспериментальные группы	b/a
1.	Интактные	$2,5 \pm 0,1^y$
2.	ИС (ишемия сетчатки)	$1,2 \pm 0,04^*$
3.	ИС + ДИП	$2,0 \pm 0,08^{*y}$
4.	ИС + эритропоегин, 50МЕ/кг	$2,3 \pm 0,06^y$
5.	ИС + никорандил, 0,6 мг/кг	$2,2 \pm 0,06^{*y}$
6.	ИС + глибенкламид, 5 мг/кг	$1,2 \pm 0,05^*$
7.	ИС + ДИП + глибенкламид, 5 мг/кг	$1,2 \pm 0,04^*$
8.	ИС + эритропоегин, 50МЕ/кг + глибенкламид, 5 мг/кг	$1,2 \pm 0,06^*$
9.	ИС + никорандил, 0,6 мг/кг + глибенкламид, 5 мг/кг	$1,2 \pm 0,05^*$

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных; y – $p < 0,05$ в сравнении с группой контроля (ИС).

Результаты морфологического исследования сетчатки подтвердили формирование ишемии через 72 ч реперфузии в группе контроля, что также подтверждает адекватность выбранной модели патологии (рис. 2). Результаты морфологических исследований подтвердили наличие протективных свойств ДИП, фармакологического прекодиционирования эритропоетином в дозе 50 МЕ/кг и фармакологического прекодиционирования никорандилом в дозе 0,6 мг/кг при коррекции ишемии-реперфузии сетчатки после 72 ч реперфузии, что выразилось в

меньшем повреждении клеток слоев сетчатки и сохранении минимальных структурных изменений.

Морфометрическим исследованиям подлежали внутренний ядерный слой, включающий биполярные, мюллеровские, горизонтальные, амакриновые клетки и слой фоторецепторов (красные стрелки, рис. 2А). Результаты морфометрии представлены в таблице 2.

Толщина внутреннего ядерного слоя сетчатки интактных крыс составила $23,8 \pm 1,0$ мкм. Данный показатель после моделирования ишемии-реперфузии в группе контроля составил после 72 ч реперфузии $20,3 \pm 0,8$ мкм, что достоверно отличается от значений в группе интактных животных ($p < 0,05$) и свидетельствует о развитии дегенеративных изменений на данном сроке. На фоне коррекции патологии ДИП толщина внутреннего ядерного слоя увеличивалась до $21,7 \pm 0,4$ мкм ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля. При коррекции эритропозитином данный показатель возрастал до $23,3 \pm 0,7$ мкм ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля и соотносим со значениями в группе интактных крыс. При коррекции никорандилом также обнаружен протективный эффект слоев сетчатки (табл. 2). Введение глибенкламида в группах с коррекцией предотвращало увеличение толщины внутреннего ядерного слоя за счет устранения эффекта преко кондиционирования.

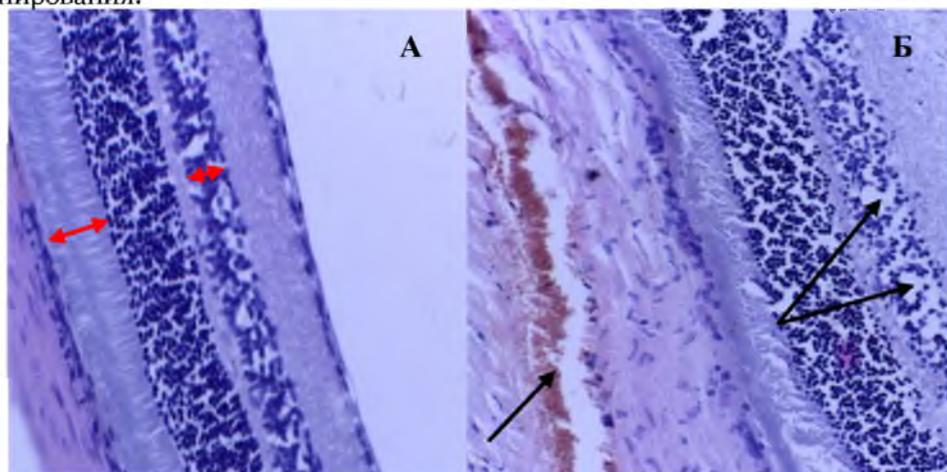


Рис. 2. Морфология сетчатки интактных и контрольных крыс: А – гистологическая картина сетчатки интактных крыс. Б – выраженные дегенеративные изменения по сравнению с сетчаткой интактных животных через 72 часа после ишемии-реперфузии. Дилатация и неравномерное кровенаполнение венозных сосудов на уровне хориоидеи (стрелка) в группе контрольных животных. Структурные изменения сетчатки в виде отечных изменений и разрыхления внутреннего ядерного слоя (двойная стрелка).

Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото $\times 400$

Таблица 2

Толщина внутреннего ядерного слоя и слоя фоторецепторов сетчатки крыс в экспериментальных группах ($M \pm m$; $n=10$)

№ п/п	Экспериментальные группы	Толщина внутреннего ядерного слоя, мкм	Толщина слоя фоторецепторов, мкм
1.	Интактные	$23,8 \pm 1,0^y$	$38,1 \pm 1,2$
2.	ИС (ишемия сетчатки)	$20,3 \pm 0,8^*$	$36,9 \pm 0,9$
3.	ИС + ДИП	$21,7 \pm 0,4^{*y}$	$37,8 \pm 0,8$
4.	ИС + эритропозитин, 50МЕ/кг	$23,3 \pm 0,7^y$	$38,0 \pm 1,0$
5.	ИС + никорандил, 0,6 мг/кг	$22,9 \pm 0,5^y$	$37,8 \pm 0,9$
6.	ИС + глибенкламид, 5 мг/кг	$20,5 \pm 0,4^*$	$37,1 \pm 0,8$
7.	ИС + ДИП + глибенкламид, 5 мг/кг	$20,6 \pm 0,6^*$	$36,9 \pm 0,8$
8.	ИС + эритропозитин, 50МЕ/кг + глибенкламид, 5 мг/кг	$20,3 \pm 0,5^*$	$37,0 \pm 0,9$
9.	ИС + никорандил, 0,6 мг/кг + глибенкламид, 5 мг/кг	$20,5 \pm 0,4^*$	$37,2 \pm 0,7$

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных; y – $p < 0,05$ в сравнении с группой контроля (ИС).

Результаты морфометрии слоя фоторецепторов во всех экспериментальных группах не выявили статистически значимых отличий, что подтверждает сохранение функциональной активности фоторецепторов в отличие от выраженной дисфункции клеток внутреннего ядерного слоя сетчатки из-за ухудшения трофики нейронов при нарушениях ретинальной циркуляции в результате формирования ишемии.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии антиишемических свойств ДИП, фармакологического преко кондиционирования рекомбинантным эритропозитином



в субэритростимулирующей дозе 50МЕ/кг массы тела животного, никорандилом в дозе 0,6 мг/кг массы животного в условиях модели ишемии-реперфузии сетчатки крыс, заключающихся в достоверном увеличении коэффициента b/a электроретинограммы опытных животных после 72 ч реперфузии по сравнению с группой контроля, улучшения гистологической картины слоев сетчатки, а также в сохранении морфометрических показателей, достоверно не отличающихся от значений в группе интактных животных. Введение глибенкламида предотвращало коррекцию ишемических повреждений сетчатки за счет блокады АТФ-зависимых калиевых каналов, что подтверждает наличие прекодиционирующих свойств эритропоэтина в дозе 50МЕ/кг и никорандила в дозе 0,6 мг/кг на модели ишемии-реперфузии сетчатки.

Литература

- 1.Алехин, С.А. Фармакологический анализ влияния прямого и дистантного прекодиционирования 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. Елисеева, Т.О. Методы лечения ишемических состояний зрительного нерва и сетчатки / Т.О. Елисеева, А.В. Свириной // РМЖ «Клиническая Офтальмология». - 2002. - № 3. - С. 106 -111.
3. Колесник, И.М. Фармакологическое прекодиционирование никорандилом и миноксидилом – возможность применения в хирургии/И.М. Колесник, Д.А. Ефременкова, М.В. Покровский// Вестник ВолГМУ: приложение (Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств»). – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2012. – С.148.
4. Константинова, Т.С. Протекторное и нейротоксическое действие оксида азота в моделях зрительных патологий [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.02 / Т.С. Константинова. – Москва, 2009. – С. 3.
5. Константинова, Т.С. Протекторное и нейротоксическое действие оксида азота в моделях зрительных патологий [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.02 / Т.С. Константинова. – Москва, 2009. – С. 12.
6. Пат. 2466462 Российская Федерация. Способ коррекции нарушения микроциркуляции в плаценте рекомбинантным эритропоэтином при АДМА-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.
- 7.Фармакологическое прекодиционирование эритропоэтином при ишемии конечности / И.М. Колесник, М.В. Покровский, И.Н. Должикова и др. // Биомедицина. – 2011. - № 4. - 90-92.
8. Экспрессия эндоглина и эндотелиальной NO-синтазы в почках при дистантном и фармакологическом прекодиционировании / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, И.Н. Должикова и др. //Буковинский медицинский вестник. – 2012. – Т. 16. - №3 (63), ч. 2. – С. 185 – 188.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

ELECTROPHYSIOLOGICAL AND HISTOMORPHOMETRIC CHANGES IN THE RAT RETINA IN PHARMACOLOGICAL PRECONDITIONING WITH ERYTHROPOIETIN, NICORANDIL IN MODEL OF OCULAR ISCHEMIA-REPERFUSION

A.A. PERESYPKINA¹
M.V. POKROVSKIY¹
A.S. SHABELNIKOVA¹
A.S. KASHUBA¹
A.A. DOLZHYKOV¹
A.V. PIROGOV²

¹Belgorod National
Research University

²Kursk State
Medical University

e-mail: anny_87_@mail.ru

In model of ischemia-reperfusion injury of retina of rats showed that recombinant erythropoietin (50 U/kg) and nicorandil (0.6 mg/kg) prevented the development of degenerative changes in the retinal layers caused by ischemic injury. Identification and use of pharmacological agents that have the effect of preconditioning may be a new approach in the correction and prevention of retinal ischemia, which is the leading player in the pathogenesis of a number of visual pathologies. Found by us a protective effect of erythropoietin and nicorandil in the development of ischemia was confirmed by electroretinography and histomorphometry and is essential for the development of anti-ischemic agents for the treatment and prevention of eye pathologies.

Key words: retinal ischemia-reperfusion, pharmacological preconditioning, nicorandil, recombinant erythropoietin, the ATP-dependent potassium channels.