

УДК 576.32

ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА МАЙЛСА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОСОСУДИСТОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОРАЖЕНИИ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА

© 2019 г. А.Е. Гордеева, И.В. Тихонова, В.П. Ширинский*, В.И. Новоселов

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра
«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

*Институт экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии
Минздрава России, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а*

E-mail: gordeeva1310@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.10.2018 г.

После доработки 21.11.2018 г.

Принята к публикации 14.02.2019 г.

Метод Майлса с использованием красителя Эванса является стандартным способом определения проницаемости сосудов. Цель настоящей работы – определить специфику проникновения красителя Эванса в кишечную ткань при ишемически-реперфузионном поражении тонкого кишечника в течение раннего реперфузионного периода. Было показано, что в раннем реперфузионном периоде происходит значительное разрушение микрососудов ворсинок и увеличение сосудистой проницаемости для белков плазмы крови, что, по данным гистологии и лазерной доплеровской флоуметрии, приводит к нарушению кровотока на уровне микроциркуляторного русла. Максимальное содержание красителя Эванса в кишечной ткани регистрировалось при его введении в кровоток перед 60-минутной ишемией, а минимальное содержание красителя Эванса – через 15 мин реперфузии. Таким образом, изменение уровня содержания красителя Эванса в кишечной ткани зависит от количества неповрежденных сосудов тонкого кишечника в момент введения красителя на разных стадиях ишемии-реперфузии. Присутствие красителя Эванса в ткани при исследовании ишемически-реперфузионного поражения тонкого кишечника в первую очередь количественно определяет степень сохранности сосудов тонкого кишечника, а не степень проницаемости сосудов, как принято считать.

Ключевые слова: ишемия–реперфузия, кишечник, сосудистая проницаемость, краситель Эванса.

DOI: 10.1134/S0006302919030220

Многие патологии связаны с нарушениями проницаемости микрососудистого русла. Одним из методов исследования состояния проницаемости сосудов при патологиях является использование анализа Майлса. Это метод основан на внутривенном введении азокрасителя Эванса, который прочно связывается с альбумином крови, быстро (в течение минут) распространяется по кровеносному руслу и присутствует в крови по крайней мере в течение суток [1]. При физиологических условиях эндотелиальный барьер не проницаем для меченого красителем Эванса альбумина, соответственно после удаления меченого альбумина из крови (например, при перфу-

зии органа физиологическим раствором) содержание красителя Эванса в ткани показывает степень сохранности сосудов, то есть низкий уровень содержания Эванса в ткани указывает на сохранение функционального состояния сосудов [2–5]. При патологических состояниях, которые сопровождаются повреждением сосудов, будет происходить миграция меченого альбумина в окружающие ткани, то есть повышение уровня красителя Эванса в ткани, что позволяет количественно определять степень проницаемости сосудов в органе [1]. Метод Майлса активно используется для определения изменения проницаемости микрососудов при разных патологиях [2, 7–10], в том числе и при ишемически-реперфузионном поражении внутренних органов [3–5, 11].

Сокращения: МЦР – микроциркуляторное русло, ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия.

Метод Майлса применяется также при мониторинге лечения лекарственными препаратами для исследования сосудистой проницаемости при разных патологиях органов [9,11,12]. Однако здесь очень важно отметить существенный момент. При использовании красителя Эванса в крови остается некоторая доля свободного красителя (0,5% от общего количества), который может связываться с препаратами белковой природы, например ферментами или пептидами, при этом может происходить инактивация ферментов [13]. Тогда при одновременном введении красителя Эванса и белкового препарата интерпретация эффектов препаратов будет затруднительна, например, при исследовании протекторных свойств ферментов-антиоксидантов при окислительном стрессе в пораженном органе [14,15]. Соответственно, необходимо определить временные границы введения красителя и лекарственного препарата. В этом случае актуальным является выяснение возможности и специфики проникновения красителя в ткани органа при разной степени поражения сосудов.

В настоящей работе в качестве модели острой патологии нами используется ишемически-реперфузионное поражение тонкого кишечника, которое сопровождается в первую очередь дисфункцией микрососудистого русла [12,16]. На данной модели с помощью метода Майлса было проведено исследование специфики проникновения красителя Эванса в кишечную ткань на разных стадиях поражения сосудов микроциркуляторного русла. Параллельно гистологическими методами было выявлено морфологическое состояние микроциркуляторного русла (МЦР) в разные сроки ишемически-реперфузионного поражения тонкого кишечника, а методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) было определено функциональное состояние системы микроциркуляции тонкого кишечника. В совокупности, эти методы позволяют решить задачу объективной оценки характера миграции альбуминсвязанного красителя Эванса из сосудистого русла в окружающие ткани при разной степени поражения сосудов при ишемически-реперфузионном поражении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали краситель Эванса Evans Blue (Sigma, Германия), золетил 100 (Virbac Sante Animale, Франция), рометар (Biovetta, Чехия), гепарин натрия 5000 МЕ/мл (РУП «Белмедпрепараты», Россия), формамид (AppliChem, Германия), фиксатор Myrsky's Fixative (Merck, США), гематоксилин-эозин (VITRO-STAIN Biovitrum, Россия).

Животные. Были использованы крысы-самцы линии Wistar (масса тела 200–220 г, возраст 6–8 недель), которых содержали в условиях вивария ИБК РАН (Пушино Московской области). Общее количество животных – 35 особей. Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей, 1986». Основной документ, регламентирующий проведение настоящего исследования – «Руководство по работе с лабораторными животными ИБК РАН» (Приказ ИБК РАН №57 от 30.12.2011 г.).

Модель ишемически-реперфузионного поражения тонкого кишечника. В качестве экспериментальной модели ишемически-реперфузионного поражения была использована окклюзия верхней мезентеральной артерии по модификации, описанной в работе [17]. Предварительно животным внутривенно вводили смесь золетила 100 (3 мг/кг) и рометара (10 мг/кг) и вскрывали брюшную полость. Ишемию кишечника выполняли путем наложения сосудистого зажима на верхнюю мезентеральную артерию и вену на срок 60 мин. Реперфузия кишечника была опосредована снятием сосудистого зажима. Максимальный период реперфузии составил 120 мин. Оперативное вмешательство проводили под общим наркозом.

Измерение состояния сосудов с помощью красителя Эванса. Краситель Эванса (40 мг/кг) крысам вводили внутривенно на разных сроках ишемически-реперфузионного поражения: за 15 мин до ишемии, сразу после купирования ишемии, через 15 мин после периода 15-минутной реперфузии, здоровому животному на срок 15 мин.

Для удаления из кровотока несорбированного тканью красителя Эванса проводили перфузию целого животного через аорту физиологическим раствором, содержащим гепарин. Качество перфузии оценивали визуально по исчезновению окраски мезентеральных сосудов тонкого кишечника. После окончания перфузии весь подвздошный отдел тонкого кишечника был разделен на пять частей, каждая длиной около 2 см, для отбора образцов слизистой оболочки. Образцы взвешивали, помещали в 0,5 мл 0,9% NaCl и 1,5 мл формамида и инкубировали 20 ч при 40°C. После инкубации суспензию центрифугировали при 14000 g в течение 15 мин и определяли оптическую плотность супернатанта на спектрофотометре Multiskan (Thermo Electron, США) при 600 нм. Относительное содержание красителя Эванса в ткани выражали в единицах оптической плотности при 600 нм на грамм ткани ($D_{600}/г$).

Оценка состояния ткани тонкого кишечника. Для проведения гистологического анализа состо-

Содержание красителя Эванса в ткани эпителия тонкого кишечника при ишемически-реперфузионном поражении при разных способах введения красителя

Экспериментальная группа	$D_{600}/\text{г ткани}$
Введение красителя на 15 мин здоровому животному	$0,24 \pm 0,04$
Введение красителя за 15 мин до ишемии. Ишемия 60 мин, реперфузия 15 мин	$2,42 \pm 0,4$
Введение красителя сразу после 60-минутной ишемии. Реперфузия 15 мин	$1,72 \pm 0,18$
Введение красителя через 15 мин реперфузии	$0,8 \pm 0,05$

яния слизистой оболочки образцы тонкого кишечника экспериментальных животных помещали в фиксатор Myersky's Fixative для гистологического материала с последующим заключением в парафин по стандартной методике. Парафиновые срезы (2 мкм) получали на микротоме (Thermo Electron, США) и окрашивали гематоксилин-эозином. Для определения распределения красителя Эванса по сосудистым структурам выполняли серии криосрезов толщиной 20 мкм с помощью криотома (Thermo Electron, США) при $t = -20^\circ\text{C}$. Микроскопический анализ срезов проводили на микроскопе DM 6000 (Leica, Германия) с цифровой камерой Leica DFC 490. Визуализацию красителя Эванса в ткани проводили при возбуждении на 515–560 нм.

Лазерная доплеровская флоуметрия. Исследование выполняли на аппарате «Анализатор лазерный микроциркуляции крови ЛАКК-01» (НПП «ЛАЗМА», Россия). В качестве основного параметра уровня перфузии кишечной ткани использовали показатель микроциркуляции, который отражает величину среднего потока крови (эритроцитов) в интервалах времени регистрации в единице объема ткани и выражается в относительных перфузионных единицах (arbitrary perfusion units) [18]. Для регистрации показателя микроциркуляции весь тонкий кишечник визуально разделяли на три участка, согласно работе [19], в пределах каждого участка производили регистрацию показателя микроциркуляции. Регистрацию ЛДФ-сигнала проводили непрерывно в течение всего ишемически-реперфузионного периода.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице представлены данные по содержанию красителя Эванса в слизистой оболочке тонкого кишечника крысы при его введении на разных этапах ишемически-реперфузионного поражения.

Из таблицы видно, что минимальное содержание красителя Эванса ($0,24 \pm 0,04 D_{600}/\text{г}$) отмечено

но для здорового органа. Проницаемость микрососудов для белков крови соответствует норме и, согласно гистологическому анализу ткани здорового кишечника, слизистая оболочка и МЦР функционально целостные (рис. 1а).

Максимальное содержание красителя Эванса в слизистой ткани тонкого кишечника отмечено в случае введения красителя в кровяное русло перед ишемически-реперфузионным поражением тонкого кишечника ($2,42 \pm 0,4 D_{600}/\text{г ткани}$). Макроскопический анализ тонкого кишечника через 15 мин реперфузии показал неоднородность в картине поражения органа и способах выхода красителя Эванса из МЦР. Доминируют участки со значительным кровоизлиянием и с обильным слизистым экссудатом. Анализ криосрезов соответствующих участков тонкого кишечника с помощью флуоресцентной микроскопии показал, что в кишечной ткани в конце реперфузионного периода (15 мин) наблюдается значительное разрушение микрососудов в апикальной части пораженных ворсинок с выходом из микрососудов в строму ворсинок и в полость кишечника красителя Эванса (рис. 2).

Гистологический анализ динамики поражения тонкого кишечника при ишемии-реперфузии представлен на рис. 1б–г. После периода ишемии (60 мин) в тонком кишечнике отмечено частичное повреждение ворсинок: отек стромы, повреждение апикального эпителия и появление субэпителиальных пространств (рис. 1б). Реперфузионный период в течение 15 мин после периода ишемии приводит к развитию видимых поврежденных слизистой оболочки тонкого кишечника, в частности, структур ворсинок (рис. 1в). Патологическое состояние ворсинок тонкого кишечника характеризуется повреждением МЦР, что приводит к появлению крупных очагов кровоизлияний в строму ворсинок, особенно в апикальной части, развитием интерстициального отека и слущивание пораженного эпителия по оси ворсинка-крипта в полость кишечника.

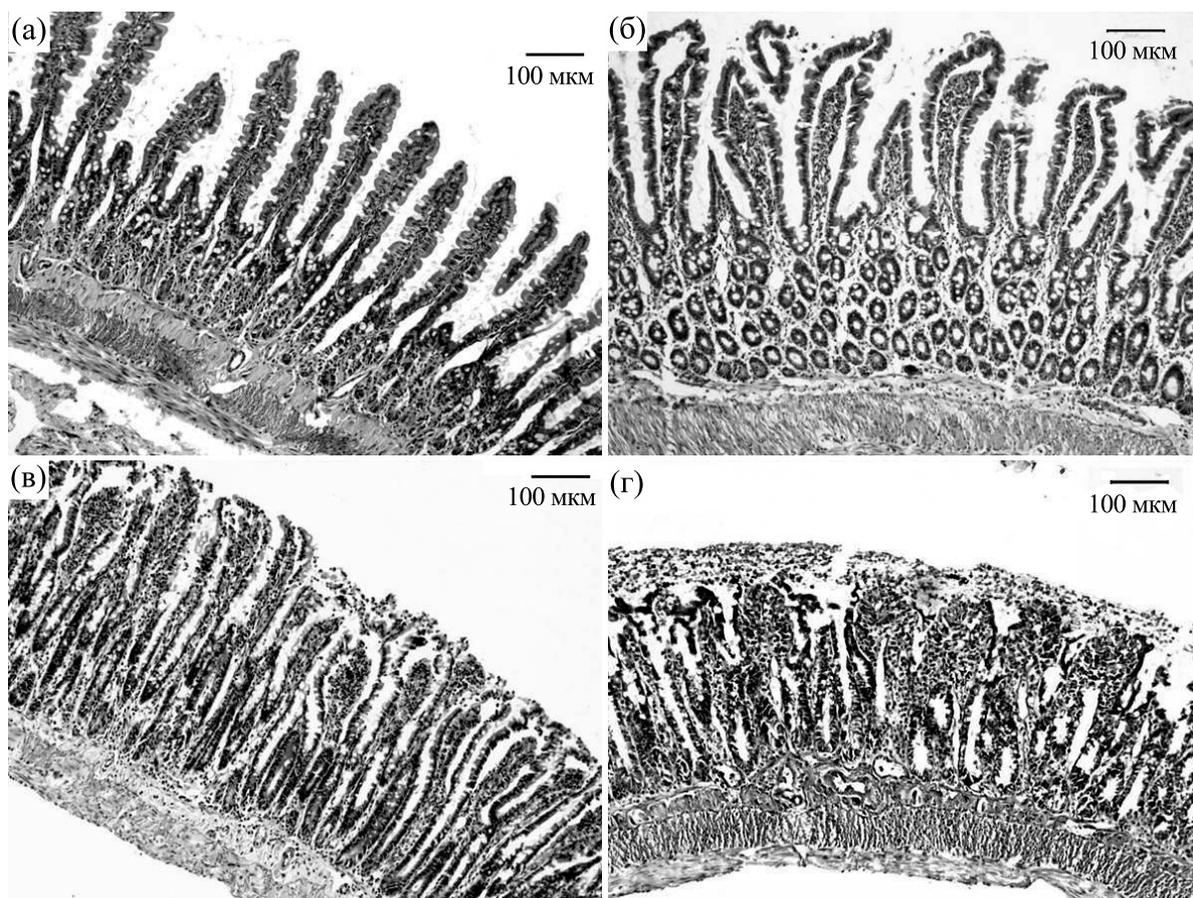


Рис. 1. Гистология тонкого кишечника крысы при ишемически-реперфузионном поражении: (а) – контроль, интактная структура слизистой оболочки; (б) – ишемия 60 мин/реперфузия 0 мин; (в) – ишемия 60 мин/реперфузия 15 мин; (г) – ишемия 60 мин/реперфузия 120 мин. Окраска эозин-гематоксилином.

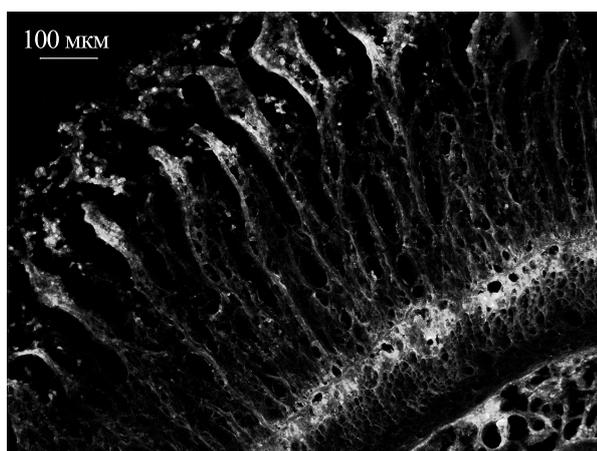


Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия тонкого кишечника при ишемически-реперфузионном поражении. Ишемия – 60 мин, реперфузия – 15 мин. Участок с кровоизлиянием. Светлые места – флуоресценция красителя Эванса. Фильтр: Cube name N 2.1 для флуорохрома Evans Blue. Криосрезы.

В случае введения красителя Эванса на срок 15 мин сразу после окончания 60-минутной ишемии отмечается снижение содержания красителя в слизистой оболочке тонкого кишечника до $1,72 \pm 0,18 D_{600}/г$ ткани по сравнению с вариантом введения красителя перед поражением. В случае введения красителя на срок 15 мин через 15 мин реперфузии его содержание уменьшается до $0,8 \pm 0,05 D_{600}/г$ ткани (таблица).

Архитектура тонкого кишечника через 120 мин реперфузии представлена на рис. 1д. Через 120 мин реперфузии происходит сильное поражение слизистой оболочки. Соединительная ткань стромы ворсинок уплотнена и инфильтрована полиморфноклеточными элементами, отмечены кровоизлияния. Ворсинки теряют физиологическую форму и увеличиваются в ширину из-за наличия значительного интерстициального отека. Наблюдается разрушение и масштабное сращивание эпителиальных клеток.

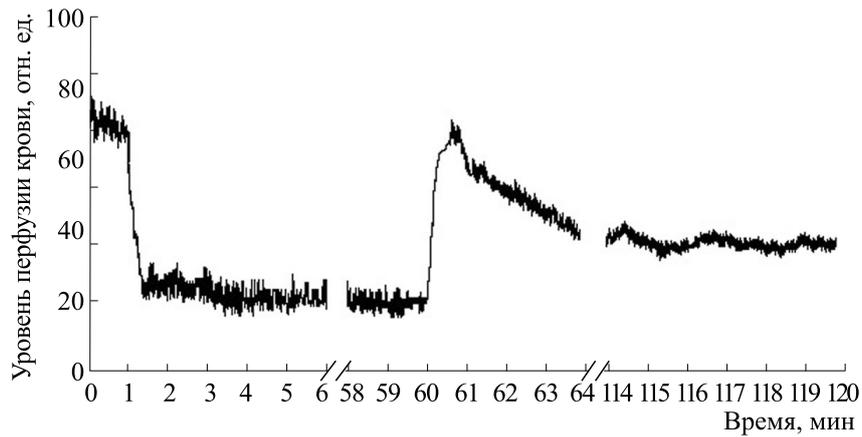


Рис. 3. ЛДФ-сигнал локального кровотока тонкого кишечника при ишемически-реперфузионном поражении (центральный участок тонкого кишечника). ЛДФ-сигнал отражает период покоя (0–1 мин), период ишемии (отсутствие кровотока) (1–60 мин), начальный период возобновления кровотока (реперфузия) (61–64 мин) и конец реперфузионного периода (114–120 мин). Непрерывная съемка.

Как видно из гистологических исследований, уже с началом реперфузии происходит поражение сосудов МЦР, что приводит к появлению крупных очагов кровоизлияний в строму ворсинок (рис. 16). Динамика разрушения МЦР при ишемически-реперфузионном поражении была выявлена методом ЛДФ. На рис. 3 представлен ЛДФ-сигнал, отражающий изменение показателя микроциркуляции в слизистой тонкого кишечника на медиальном участке в течение всего ишемически-реперфузионного периода. В контроле (период покоя) значения показателя микроциркуляции составляют около 70 отн. ед. (относительных единиц кровотока). С началом ишемии происходит снижение уровня показателя микроциркуляции до 20 отн. ед. (отсутствие кровотока). С началом реперфузии вначале наблюдается повышение его уровня в сторону контрольных значений с последующей фазой спада в течение 4–5 мин, т.е. снижение уровня показателя микроциркуляции впервые минуты реперфузии развивается параллельно с поражением ворсинок и микрососудов. К концу реперфузионного периода (через 120 мин) показатель микроциркуляции не достигает контрольных значений и составляет в среднем 50% от контроля, что соответствует значительному поражению структуры МЦР.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микрососудистое русло тонкого кишечника выстлано изнутри монослоем эндотелиальных клеток, которые выполняют многочисленные функции в организме, участвуя в регуляции свертывания крови, в контроле сосудистого тонуса и гемодинамики, в иммунных реакциях, в барьерной функции. Барьерная функция эндотелия со-

судов опосредована контактными взаимодействиями эндотелиальных клеток, которые ограничивают межклеточную миграцию веществ. При ряде патологических состояний барьерная функция эндотелия нарушается, и в ткань поступает богатая белком плазма, что опосредует развитие отека [20].

В настоящей работе на модели ишемически-реперфузионного поражения тонкого кишечника была показана специфика использования красителя Эванса для исследования состояния МЦР тонкого кишечника на разных сроках ишемически-реперфузионного поражения: краситель вводили в норме, до ишемии, с началом реперфузии и по окончании реперфузии.

В случае здорового кишечника целостность МЦР позволяет красителю беспрепятственно циркулировать по микрососудам в составе крови и не проникать через сосудистую стенку. При реперфузии краситель в составе крови полностью удаляется из неповрежденных сосудистых структур слизистой оболочки тонкого кишечника (таблица).

Противоположная ситуация наблюдается при введении красителя Эванса за 15 мин до ишемически-реперфузионного поражения. Соединяясь с альбумином крови, краситель беспрепятственно циркулирует по здоровым сосудам МЦР тонкого кишечника в течение 15 мин. В последующие 60 мин ишемии краситель в составе крови блокируется в сосудах тонкого кишечника. Гистологический анализ показал, что в период ишемии не наблюдается патологического разрушения структур слизистой оболочки, что согласуется с данными работы [2], где было показано, что ишемия сама по себе не приводит к значительно-

му микрососудистому повреждению кишечника. Однако последующий 15-минутный реперфузионный период запускает развитие значительного поражения кишечной ткани [21]. При макроскопическом анализе тонкого кишечника было обнаружено, что через 15 мин реперфузии преобладают участки со значительным кровоизлиянием и участки с обильным слизистым экссудатом. Микроскопический анализ этих участков показал крупные очаги кровоизлияний в ткани кишечника, что напрямую указывает на поражение МЦР. Разрушение МЦР было подтверждено ЛДФ-анализом. ЛДФ-грамма показала изменение локальной гемодинамики в начальный реперфузионный период. Таким образом, снижение уровня показателя микроциркуляции в первые минуты реперфузии развивается параллельно с поражением микрососудов. Быстрое развитие поражения в начальный реперфузионный период объясняет высокий уровень содержания красителя Эванса в слизистой оболочке (таблица). Невозможность удаления красителя при последующей перфузии из кишечной ткани связано с двумя причинами: во-первых, это масштабное разрушение МЦР, во-вторых, миграция красителя в строму из-за увеличения проницаемости микрососудов для белков плазмы крови. Вопрос о доминирующем процессе на данных сроках реперфузионного периода остается открытым, однако по предварительным данным основной вклад вносит разрушение МЦР. Тем не менее в совокупности оба процесса приводят к выходу плазмы в кишечную строму, что опосредует образование интерстициального отека и нарушение кровотока на уровне МЦР.

При введении красителя Эванса синего на срок 15 мин сразу после купирования ишемии его содержание в слизистой оболочке снижается почти в полтора раза, по сравнению с вариантом введения красителя перед ишемически-реперфузионным поражением (таблица). Снижение содержания красителя в слизистой ткани кишечника не указывает на уменьшение поражения МЦР и снижение проницаемости сосудов для белков плазмы крови, как принято считать [2–5], а, напротив, указывает на развитие поражения. Так, в период ишемии структура слизистой оболочки и МЦР остается в целом неповрежденной, что позволяет красителю в начальный момент после купирования ишемии достигнуть с током крови сосудистых структур кишечной ткани. Однако последующий после ишемии 15-минутный реперфузионный период приводит к повреждению МЦР, росту микрососудистой проницаемости и нарушению общей архитектуры слизистой оболочки, как показал макро- и микроскопический анализ кишечной ткани. Это обуславливает вы-

сокий уровень содержания красителя в слизистой оболочке тонкого кишечника относительно аналогичных показателей в здоровом органе. Стоит отметить, что содержание красителя ниже, чем во втором варианте введения, что, по-видимому, связано с нарушением структур МЦР в течение ишемического периода.

При введении красителя Эванса через 15 мин после реперфузии отмечено еще большее снижение его содержания в слизистой оболочке кишечной ткани (таблица). В этом случае уменьшение содержания красителя в слизистой оболочке кишечной ткани указывает на развитие поражения МЦР, а не на снижение его поражения. Полученные результаты не совпадают с мнением ряда авторов о том, что низкий уровень содержания красителя Эванса в кишечной ткани указывает на сохранение функционального состояния сосудов [2–5]. Так, макро- и микроскопический мониторинг и ЛДФ-анализ показали, что через 15 минут реперфузии происходит нарушение кровотока на уровне МЦР, разрушение микрососудов и образование интерстициального отека, что, по-видимому, опосредует невозможность попадания красителя в составе крови в соответствующие микрососудистые структуры.

Таким образом, использование красителя Эванса для определения состояния микрососудов и сосудистой проницаемости при ишемически-реперфузионном поражении тонкого кишечника имеет свою специфику. Она выражается в изменчивости картины проникновения красителя в ткани органа на разных стадиях поражения сосудов. Так, при введении красителя в здоровые сосуды перед ишемически-реперфузионным поражением миграция красителя Эванса из микрососудов в ткани будет зависеть от совокупности двух процессов: от уровня разрушения микрососудов и увеличения сосудистой проницаемости для альбумин-связанного красителя. Степень развития этих процессов, в свою очередь, связана с продолжительностью периода, как ишемии, так и реперфузии. Данный вариант введения красителя наиболее часто используется в исследованиях изменения проницаемости сосудов при ишемически-реперфузионном поражении кишечника [2,3,5].

Напротив, варианты введения красителя Эванса сразу после ишемии или во время реперфузии не могут быть использованы для адекватной оценки проницаемости сосудов. В этой ситуации МЦР повреждено, что ограничивает проникновение красителя в эту область. Поэтому снижение содержания красителя в слизистой ткани кишечника в этих условиях не может быть критерием, указывающим на уменьшение сосудистой проницаемости для белков плазмы крови. В этом случае уровень красителя в ткани тонкого

кишечника количественно определяет в первую очередь степень сохранности сосудов тонкого кишечника на разных стадиях ишемически-реперфузионного поражения, а не степень проницаемости сосудов.

Данные о специфике миграции красителя Эванса в кишечную ткань при разной степени поражения сосудов необходимо учитывать при исследовании протекторных свойств различных препаратов, которые могут взаимодействовать с этим красителем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 17-44-500371р_а и № 17-04-00356а), Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Фонда содействия развития малых форм предприятия в научно-технологической сфере «УМНИК» в рамках договора № 11430ГУ/2017 от 10.05.2017 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Yao, X. Xue, P. Ju, et al., *Contrast Media Mol. Imaging* **2018**, 7628037 (2018).
2. J. Schumacher, K. Binkowski, A. Dendorfer, et al., *Shock* **20**, 565 (2003).
3. Z. Zang, F. F. Li, M. D. Lu, et al., *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **93**, 2913 (2013).
4. A. T. Mészáros, T. Büki, B. Fazekas, et al., *Surgery* **161**, 1696 (2017).
5. Z. Teke, B. Kabay, A. Ozden, et al., *J. Surg. Res.* **149**, 259 (2007).
6. M. Radu and J. Chernoff, *J. Vis. Exp.* **73**, 50062 (2013).
7. G. E. Plante, M. Chakir, S. Lehoux, et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**, 824 (1996).
8. Y. Suyama, O. Handa, Y. Naito, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **498**, 228 (2018).
9. L. Y. Pan, Y. F. Chen, H. C. Li, et al., *Cell Physiol. Biochem.* **44**, 2395 (2017).
10. J. Moitra, S. Sammani, and J. G. Garcia, *Transl. Res.* **150**, 253 (2007).
11. Y. Suzuki, A. C. Yeung, and F. Ikeno, *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 195483 (2011).
12. D. N. Granger, *Microcirculation* **6**, 167 (1999).
13. C. Tsopelas and R. Sutton, *J. Nucl. Med.* **43**, 1377 (2002).
14. A. Gordeeva, A. Temnov, A. Charnagalov, et al., *Dig. Dis. Sci.* **60**, 3610 (2015).
15. М. Г. Шарапов, А. Е. Гордеева, Р. Г. Гончаров и др., *Биофизика* **62**, 6 (2017).
16. B. Vollmar and M. D. Menger, *Langenbecks Arch. Surg.* **396**, 13 (2011).
17. S. I. Kim, Y. B. Kim, K. M. Koh, et al., *J. Surg. Res.* **179**, 99 (2013).
18. В. И. Козлов, *Лазерная доплеровская флоуметрия в оценке состояния и расстройств микроциркуляции крови. Методическое пособие для врачей* (М., РУДН, 2012).
19. D. E. Rosow, D. Sahani, O. Strobel, et al., *J. Gastrointest. Surg.* **9**, 1262 (2005).
20. В. П. Ширинский, *Успехи физиол. наук* **42**, 1 (2011).
21. A. Gordeeva, M. Sharapov, I. Tikhonova, et al., *Cells Tissues Organs* **203** (6), 353 (2013).

Particularities of the Use of the Miles Assay for the Study of Microvascular Permeability in Ischemic-Reperfusion Injury of the Small Intestine

A.E. Gordeeva*, I.V. Tikhonova*, V.P. Shirinsky**, and V.I. Novoselov*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research and Production Complex of the Ministry of Health of Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia*

The Miles assay combined with the use of the Evans blue dye is a traditional method for assessing vascular permeability. Our objective was to determine a specificity of Evans dye penetration into the intestinal tissue during ischemic-reperfusion injury of the small intestine in the early reperfusion phase. It was shown that in the early reperfusion phase there is a significant destruction of villus microvessels and an increase in vascular permeability for plasma proteins, that, according to histology and laser Doppler flowmetry, leads to impaired blood flow at the level of the microvasculature. The highest concentration of Evans blue in the intestinal tissue was recorded when it was injected into the bloodstream before 60-min ischemia, and the lowest level of Evans blue dye was detected after 15 minutes of reperfusion. Thus, the change in the level of dye content in the intestinal tissue depends on the number of intact vessels of the small intestine at the time of dye injection at different stages of ischemia-reperfusion. The presence of Evans blue dye in the tissue in the study of ischemic-reperfusion injury of the small intestine first of all quantitatively determines the degree of preservation of the vessels of the small intestine, but not the degree of vascular permeability, as is commonly believed.

Keywords: ischemia–reperfusion, intestine, vascular permeability, Evans blue dye