



УДК 618.3-06-08:577.112.385.2

КОРРЕКЦИЯ ДИСТАНТНЫМ ИШЕМИЧЕСКИМ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ АДМА-ПОДОБНОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕСТОЗЕ

В.В. ГУРЕЕВ¹**М.В. ПОКРОВСКИЙ²****А.А. ДОЛЖИКОВ²****С.А. АЛЕХИН¹****И.Н. ДОЛЖИКОВА²****Е.Г. ГУРЕЕВА¹****И.М. КОЛЕСНИК¹****И.О. ГОЛОВЧЕНКО²****М.В. КОРОКИН²**

Введение АДМА-подобного агента – L-NAME беременным крысам вызывает блокаду NO-синтазы и приводит к патофизиологическим изменениям, подобным гестозу. Моделирование дистантного ишемического прекодиционирования приводит к явной коррекции патологических изменений. Результаты исследования служат предпосылкой для проведения дальнейших исследований с целью поиска новых лекарственных средств для лечения гестоза.

¹⁾ Курский государственный медицинский университет

²⁾ Белгородский государственный национальный исследовательский университет

Ключевые слова: крысы, преэклампсия, L-NAME, лечение.

e-mail: produmen@yandex.ru

Гестоз второй половины беременности является самым частым заболеванием беременных и занимает первое место в причинах материнской и перинатальной смертности. Патогенез этого грозного заболевания еще далек от полного понимания. Однако в последнее время многие авторы при морфологическом исследовании плаценты описывают специфическую гистологическую картину, заключающуюся в диспропорциях развития ее пограничного участка между материнской и плодной частями [19, 20, 26, 29]. Происходит неполная инвазия цитотрофобласта в спиральные артерии матери. Уровень перестройки самих спиральных артерий при гестозе не достигает уровня при нормальной беременности [28, 29]. Увеличенное пространство между спиральными артериями и ворсинами хориона, а также незрелость самих спиральных артерий приводит к ишемии трофобласта и повышению проницаемости фетоплацентарного барьера. Образовавшиеся в ответ на ишемию гуморальные факторы, а также возможные антигены плода, прошедшие через фетоплацентарный барьер с повышенной проницаемостью, при попадании в организм матери провоцируют накопление в плазме асимметричного диметиларгинина (ADMA), развитие генерализованной эндотелиальной дисфункции, вторичных ишемических явлений и оксидативного стресса [3, 4, 13, 14, 15, 16]. Поскольку ишемические явления служат пусковым моментом и вместе с эндотелиальной дисфункцией замыкают порочный круг в длинной цепи патофизиологических событий, приводящих к манифестации гестоза [4, 7, 9], поиск противоишемических мероприятий для его профилактики и лечения является актуальным направлением.

История открытия и изучения ишемического прекодиционирования насчитывает более 20 лет [27]. Это явление заключается в увеличении устойчивости к ишемии ткани или органа после кратковременного эпизода ишемии-реперфузии. В первые годы основные исследования проводились в направлении изучения изменений в органе, непосредственно подвергшемся ишемическому прекодиционированию. Ишемия является одним из наиболее сильных и универсальных стимулом в организме. Ишемическое повреждение одного органа не может не отражаться на состоянии соседних органов и вызывает перестройку в функционировании различных систем целого организма. Поэтому ишемическое прекодиционирование нужно

рассматривать не как четко ограниченное топографически явление, а как комплекс защитных реакций, затрагивающих различные системы органов. Именно поэтому в последнее время все больший интерес вызывают исследования не только локальных явлений после эпизода ишемии-реперфузии или его влияния на реологию и тромбообразующие свойства крови [5, 17], но и события, происходящие в соседних органах (дистантное ишемическое прекодиционирование) [2, 5, 8, 21, 30]. В связи с этим актуальным представляется исследование влияния дистантного ишемического прекодиционирования на течение АДМА-подобного экспериментального гестоза.

Методика исследования. Эксперимент выполнен на 40 белых крысах-самках линии Wistar массой 250-300 г. АДМА-подобный агент – неселективный блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинин-метиловый эфир (L-NAME) вводили внутривенно в дозе 25 мг/кг/сут в течение семи дней (14-20 суток беременности) [6, 11, 12]. На 21-е сутки беременности под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в правую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД), болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в правую бедренную вену. Проводили сосудистые пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВ) – внутривенное введение ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг, и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНЗВ) – внутривенное введение нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг с расчетом коэффициента эндотелиальной дисфункции (КЭД) [10]. Беременные самки были разделены на группы (n=10): I – интактные; II – с введением L-NAME ежедневно с 14-х по 21-е сутки беременности; III – с введением L-NAME и воспроизведением 10-минутного ишемического эпизода задней правой конечности на 21-е сутки беременности за 90 минут до снятия функциональных проб; IV – с введением L-NAME и ежедневным воспроизведением 10-минутного ишемического эпизода задних конечностей попеременно с 10-х по 20-е сутки беременности. Ишемический эпизод воспроизводили 10-минутным пережатием бедренной артерии путем наложения манжеты на проксимальную треть бедра. Контролем правильности наложения манжеты служило отсутствие пульса на артериях голени. Исследование микроциркуляции в плаценте проводили с помощью оборудования компании «Biopac systems»: полиграф MP100 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDf100C и датчиком TSD144. Регистрация результатов ЛДФ производилась программой Acqknowledge версии 3.8.1, значения микроциркуляции выражались в перфузионных единицах (ПЕ) [1]. NO-продуцирующую функцию эндотелия оценивали на основании данных содержания стабильных метаболитов NO-нитрит-ионов NOx в сыворотке крови.

Проведено морфологическое исследование плацент вместе с имплантационным участком рога матки. Гистологические срезы после стандартной заливки материала в парафин изготавливали в строго вертикальном направлении через середину плацентарного диска с захватом всех слоев плаценты и стенки рога матки. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение микропрепаратов, фотопротоколирование и морфометрию проводили на микроскопе Leica DM4000B с системой видеорегистрации и обработки изображений.

Результаты и обсуждение. Блокада NO-синтазы, вызванная семидневным введением L-NAME, приводила к нарушению взаимоотношений вазодилатирующих и вазоконстрикторных механизмов регуляции сосудистого тонуса, о чем свидетельствовало увеличение КЭД с $1,28 \pm 0,23$ у интактных беременных животных до $3,06 \pm 0,32$ ($p < 0,05$). Кроме этого, наблюдался значительный подъем систолического и диастолического артериального давления с $125 \pm 6,3$ и $82,0 \pm 5,8$ до $183,1 \pm 9,4$ и $136,7 \pm 7,4$ мм рт. ст. соответственно. Введение блокатора NO-синтазы приводило к значительному снижению показателя микроциркуляции в плаценте с $425,90 \pm 39,55$ до $210,00 \pm 21,08$ ($p < 0,05$), а также к снижению содержания стабильных метаболитов NOx в сыворотке крови с $2,35 \pm 0,21$ мкмоль/дл до $1,33 \pm 0,09$ мкмоль/дл ($p < 0,05$). При микроскопическом исследовании плаценты наблюдаются неравномерное кровенаполнение спонгиозного слоя, вакуольная дистрофия гигантского трофобласта, очаги некроза на границе гигантского трофобласта и децидуальной ткани, дистрофические изменения и малокровие децидуального слоя (рис. 1). Таким образом, моделирование АДМА-подобной L-NAME-индуцированной преэклампсии в эксперименте у крыс характеризовалось выраженным повышением АД, явлениями



эндотелиальной дисфункции, снижением плацентарной микроциркуляции и NO-продуцирующей функции эндотелия, деструктивными изменениями в плаценте.

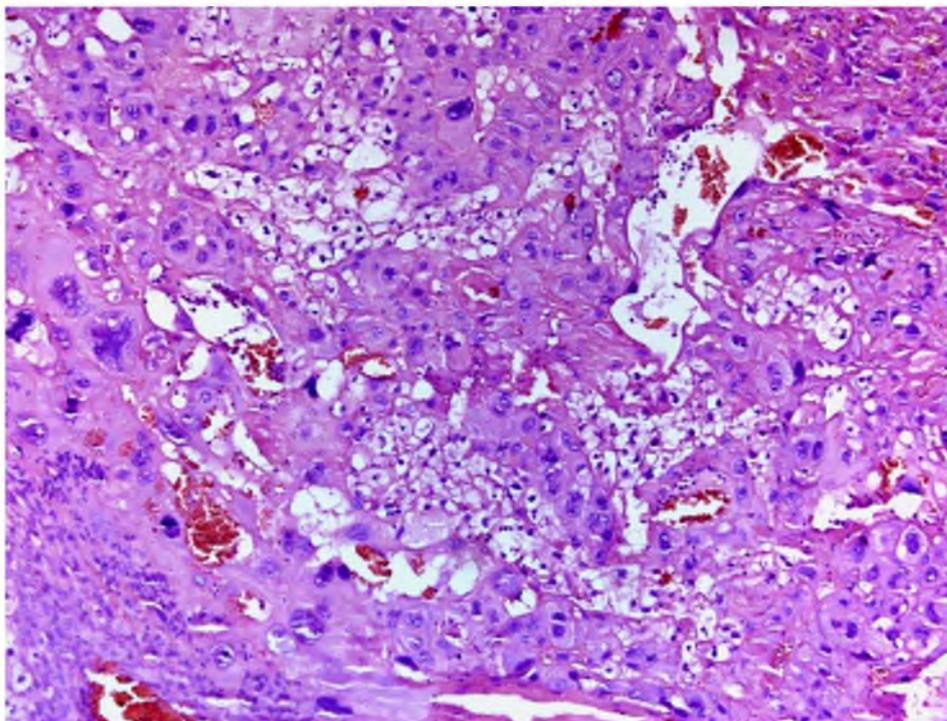


Рис. 1. Патоморфологические изменения плаценты при L-NAME-индуцированном гестозе. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. X 200

Воспроизведение однократного ишемического эпизода за 90 минут до снятия проб приводило к нормализации взаимоотношения вазодилатирующих и вазоконстрикторных реакции при экспериментальной преэклампсии, о чем свидетельствует снижение КЭД до $1,52 \pm 0,09$ и подъем показателей микроциркуляции до $327,3 \pm 17,2$ (табл.). При биохимическом исследовании сыворотки крови обнаружено статистически значимое снижение уровня стабильных метаболитов NO, который находился несколько ниже в сравнении даже с животными без прекондиционирования. Гистологическое исследование плаценты при воспроизведении ишемического эпизода за 90 минут до снятия функциональных проб не проводилось.

Таблица

Результаты коррекции L-NAME-индуцированной преэклампсии у крыс (M±m)

Показатель Группа	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	КЭД	Микроцир- куляция, ПЕ	Концентрация нитрит-ионов, мкмоль/дл
Интактные	125,0±6,3 ^y	82,0±5,8 ^y	1,28±0,23 ^y	425,9±39,6 ^y	2,35±0,21
L-NAME	183,1±9,4*	136,7±7,4*	3,06±0,32*	210,0±21,1*	1,33±0,09*
L-NAME + однократное прекондициони- рование	177,1±9,8*	124,9±8,4*	1,52±0,09 ^y	327,3±17,2 ^y	1,11±0,09*
L-NAME + 10-кратное прекондиционирование	141,6±5,5 ^y	104,2±5,7 ^y	1,56±0,13 ^y	339,6±20,4 ^y	1,92±0,18*

Примечание: САД, ДАД – систолическое и диастолическое артериальное давление; КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции; * – $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных; ^y – $p < 0,05$ в сравнении с группой L-NAME.

В группе животных с 10-кратным воспроизведением ишемического прекондиционирования также наблюдалась нормализация взаимоотношения вазодилатирующих и вазоконстрикторных реакций, о чем свидетельствует снижение КЭД до $1,56 \pm 0,13$. Кроме этого, 10-кратное воспроизведение ишемического эпизода приводило к статистически значимому снижению артериального давления: систолического до $141,6 \pm 5,5$ мм рт. ст., диастолического до $104,2 \pm 5,7$ мм рт. ст. ($p < 0,05$). Исследование микроциркуляции в плаценте выявило ее сопоставимое улучшение по сравнению с предыдущей группой леченых животных, однако целевого уровня оно не достигало (табл.). При биохимическом исследовании сыворотки крови обнаружено статистически значимое предотвращение снижения содержания стабильных метаболитов NO, уровень которых составил $1,92 \pm 0,18$ мкмоль/дл. Микроскопическое исследование плаценты при моделировании ADMA-подобного гестоза с 10-кратным прекондиционированием выявило выраженную положительную динамику гистологической картины, которая заключалась в относительно равномерном кровенаполнении спонгиозного слоя, отсутствии повреждения слоя гигантского трофобласта и децидуальной оболочки (рис. 2).

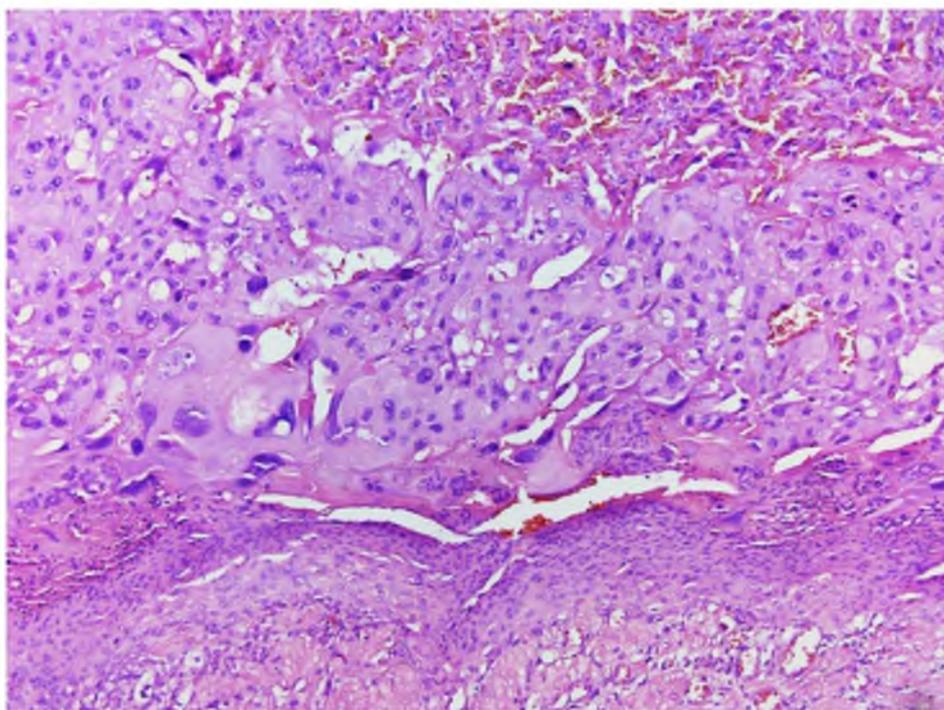


Рис. 2. Структура плаценты при L-NAME-индуцированном гестозе на фоне дистантного ишемического прекондиционирования. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. X 200

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что длительное (в течение семи суток) внутрибрюшинное введение блокатора NO-синтазы L-NAME вызывает у беременных самок крыс комплекс изменений, ассоциированных с NO-дефицитной эндотелиальной дисфункцией. На 7-е сутки развивалась выраженная гипертензия, в 3 раза увеличивался коэффициент эндотелиальной дисфункции, происходило снижение показателей плацентарной микроциркуляции, снижение конечных метаболитов NO в плазме и наблюдались четко выраженные морфологические изменения в плаценте. Описанный симптомокомплекс можно соотнести с развитием гестоза в клинических условиях.

Воспроизведение однократной и 10-кратной ишемии конечности как лечебного мероприятия приводило к явной коррекции моделируемого патологического состояния с индивидуальными особенностями в каждом случае. Это связано не только с кратностью воспроизведения ишемических стимулов, но и с различными механизмами реализации улучшения функции эндотелия.



Механизм эндотелиопротективного эффекта ишемического preconditionирования до конца еще не изучен. Вероятнее всего, ишемический стимул вызывает перестройку системного характера, а изменение функции эндотелия является лишь частным моментом в общей цепи предупреждения ишемических повреждений и запускается одновременно.

Во время ранней фазы («классическое» или «раннее preconditionирование») происходит выделение целого ряда гуморальных факторов (триггеров): аденозин, брадикинин, опиоиды, свободные радикалы и др. Обращает на себя внимание тот факт, что все они, выделяясь в различных по строению, происхождению и функциональным задачам тканях, подвергнутых ишемии, обладают выраженной сосудодилатирующей активностью. Даже если их конечной задачей является открытие коллатералей в очаге ишемии, то реализуется она посредством эндотелия.

Временной промежуток защитного эффекта ранней фазы ишемического preconditionирования, по данным разных авторов, колеблется от 5 минут до 12 часов [25]. Поэтому, проводя исследование через 90 минут после однократного ишемического эпизода, мы заведомо попадаем в период ее активности. Можно предположить, что в условиях дефицита NO триггеры, попадая в эндотелий, компенсируют повреждения сосудорасширяющих механизмов. Это способствует уравниванию механизмов регуляции тонуса сосудов и улучшает микроциркуляцию. Однако однократного ишемического стимула недостаточно для восстановления артериального давления в условиях хронической патологии. Это связано с вовлечением на 7-е сутки не только нитроэргической системы, но и других элементов гуморального и нейрогенного контуров регуляции системы кровообращения. Снижение содержания конечных метаболитов NO в плазме, скорее всего, объясняется подавлением его синтеза триггерами ишемического preconditionирования.

Временной промежуток защитного эффекта «отсроченной» фазы или «позднего preconditionирования», по данным разных авторов, колеблется от 12 до 96 часов [23, 27]. Несмотря на внешнее сходство в методологии воспроизведения ишемических эпизодов, механизмы их preconditionирующего эффекта и положительного действия на эндотелиальные клетки в обоих случаях имеют существенные различия [18]. Это связано с различными решаемыми задачами. Задача ранней фазы адаптация в острый период. Недостатком ее является непродолжительность компенсаторных эффектов. Задачей отсроченной фазы является более длительная адаптация к ишемии. В связи с тем, что механизмы реализации защитного эффекта затрагивают более фундаментальные процессы, время его наступления значительно позже.

Во время отсроченной фазы ишемического preconditionирования происходит активация генома. Включается индукция синтеза оксида азота, супероксиддисмутазы и других антиоксидантных ферментов, а также белков теплового шока, которые вовлечены в стабилизацию цитоскелета [22]. Улучшение функции эндотелия в эту фазу можно объяснить индукцией синтеза мощного вазодилатора –NO (экспрессия NO-синтазы) и синтеза антиоксидантных ферментов, что уменьшает оксидативный стресс.

Таким образом, результаты проведенного эксперимента дают основания для продолжения исследований ишемического preconditionирования с целью коррекции гестоза и поиска новых лекарственных препаратов с механизмом действия, лежащим в основе эффекта ишемического preconditionирования.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МК-905.2012.4.

Литература

1. Возможности фармакологической коррекции хронической ишемии конечности в эксперименте / Е.Б. Аргюшкова, Д.В. Пашков, М.В. Покровский и др. // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – Т. 71, № 3. – С. 23-25.

2. Влияние дистантной ишемии-реперфузии на состояние сосудов миокарда / Т.Д. Власов, В.Г. Сиповский, Д.Э. Коржевский, М.М. Галагудза // Ученые записки СПбГМУ. – 1999. – № 6(2). – С. 68-70.
3. Зайнулина, М.С. Диагностическое значение эндотелиограммы у беременных с поздним гестозом и сахарным диабетом / М.С. Зайнулина, Е.В. Мозговая, Д.А. Нианури // Журнал акушерства и женских болезней. – 1999. – № 2. – С. 22-24.
4. Зайнулина, М.С. Эндотелиальная дисфункция и ее маркеры при гестозе / М.С. Зайнулина, Н.Н. Петрищев // Журнал акушерства и женских болезней. – 1997. – № 3. – С. 18-22.
5. Галлямов, Н.В. Ишемическое прекондиционирование и дистанционное ишемическое прекондиционирование у здоровых лиц и больных стабильной стенокардией и их влияние на агрегацию тромбоцитов :дис. ... канд. мед. наук. – Казань, 2009. – С. 130.
6. Влияние L-аргинина, витамина В6 и фолиевой кислоты на показатели эндотелиальной дисфункции и микроциркуляции в плаценте при моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота / М.В. Корокин, М.В. Покровский, О.О. Новиков и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 7. – С. 77-80.
7. Кулаков, В.И. Клинико-биохимические аспекты патогенеза гестозов / В.И. Кулаков, Л.Е. Мурашко, В.А. Бурлёв // Акуш. и гинекол. – 1995. – № 6. – С. 3-5.
8. Маслов, Л.Н. Дистантное ишемическое прекондиционирование / Л.Н. Маслов, Ф. Колар, Т. Криг // Успехи физиологических наук. – 2009. – № 4. – С. 64-78.
9. Эндотелиальная дисфункция при гестозе. Патогенез, генетическая предрасположенность, диагностика и профилактика: метод. рекомендации / Е.В. Мозговая, О.В. Мальшева, Т.Э. Иващенко и др. – СПб., 2003.
10. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская и др. // Кубанский науч. мед. вестн. – 2006. – № 10(91). – С. 72-77.
11. Реалии и перспективы фармакологической коррекции ADMA-eNOS – ассоциированных путей при преэклампсии / М.В. Покровский, Н.Г. Филиппенко, М.В. Корокин и др. // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2010. – № 6(6). – С. 882-887.
12. Фармакологическая коррекция ADMA-eNOS-ассоциированных мишеней при преэклампсии / М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, В.В. Гуреев и др. // Акушерство и гинекология. – 2011. – № 2. – С. 16-20.
13. Хецуриани, Т. Роль окислительного стресса в плаценте в патогенезе преэклампсии / Т. Хецуриани // GeorgianMedicalNews, Tbilisi-NewYork. – 2004. – № 10(115). – С. 21-24.
14. Хецуриани, Т. Роль нарушений окислительного метаболизма в развитии эндотелиальной дисфункции преэклампсии / Т. Хецуриани // GeorgianMedicalNews, Tbilisi-NewYork. – 2004. – № 7-11(115). – С. 21-24.
15. Супряга, О.М. Роль эндотелиальной дисфункции в генезе гипертензивных состояний у беременных / О.М. Супряга // Акуш. и гинекол. – 1995. – № 6. – С. 5-9.
16. Шалаев, С.В. Тромбоциты при: физической нагрузке и индуцированной ишемии миокарда / С.В. Шалаев // Кардиология. – 1988. – № 5. – С. 114.
17. Хецуриани, Т. Факторы, участвующие в нарушении метаболизма оксида азота и развитии эндотелиальной дисфункции при преэклампсии / Т. Хецуриани // Аллергология и иммунология. – 2004. – Т. 5, № 3. – С. 393-395.
18. Bolli, R. The late phase of preconditioning / R. Bolli // Circ. Res. – 2000. – Vol. 87. – P. 972-983.
19. Crocker, I. Gabor Than Award Lecture 2006: pre-eclampsia and villous trophoblast turnover: perspectives and possibilities / I. Crocker // Placenta. – 2007. – Vol. 28, Suppl. A. – P. S4-13.
20. Ducray, J.F. Pilot study of comparative placental morphometry in pre-eclamptic and normotensive pregnancies suggests possible maladaptations of the fetal component of the placenta / J.F. Ducray, T. Naicker, J. Moodley // European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology. – 2011. – Vol. 156(1). – P. 29-34.
21. Ischemic preconditioning reduces the severity of ischemia/reperfusion-induced pancreatitis / A. Dembinski, Z. Warzecha, P. Ceranowicz et al. // Eur. J. Pharmacol. – 2003. – Vol. 473(2-3). – P. 207-216.
22. Kloner, R.A. Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning, and Their Clinicоавт Implications. Part 2 / R.A. Kloner, R.B. Jennings // Circulation. – 2001. – Vol. 104. – P. 3158-3167.
23. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia / T. Kuzuya, S. Hoshida, N. Yamashita et al. // Circ. Res. – 1993. – Vol. 72. – P. 1293-1299.



24. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction / M.S. Marber, D.S. Latchman, J.M. Walker et al. // *Circulation*. – 1993. – Vol. 88. – P. 1264-1272.

25. Przyklenk, K. Ischemic preconditioning: exploring the paradox / K. Przyklenk, R.A. Kloner // *Prog. Cardiovasc. Dis.* – 1998. – Vol. 40. – P. 517-547.

26. Purkerson, M.L. A history of eclampsia, toxemia and kidney in pregnancy / M.L. Purkerson, L. Vekerdy // *Am. J. Nephrol.* – 1999. – Vol. 19. – P. 313-319.

27. Rezkalla, S.H. Preconditioning in humans / S.H. Rezkalla, R.A. Kloner // *Heart Fail Rev.* – 2007. – Vol. 12. – P. 201-206.

28. Hypertension in pregnancy // W.B. Robertson, T.Y. Khong, Eds F. Sharp, E.M. Symonds. – New York. – 1987. – P. 101-193.

29. Placental vascularization in early onset small for gestational age and preeclampsia / R.H. van Oppenraaij, N.E. Bergen, J.J. Duvekot et al. // *Reproductive Science*. – 2011. – Vol. 18(6). – P. 586-593.

30. Cardioprotection by remote ischaemic preconditioning / S.R. Walsh, T. Tang, U. Sadat et al. // *British Journal of Anaesthesia*. – 2007. – Vol. 99(5). – P. 611-616.

31. International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy: Book of Abstract of the 10-th World Congress / T. Yamamoto, Y. Takahashi, S. Kuno et al. // Washington. – 1996. – P. 238.

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION CORRECTION IN ADMA-LIKE PREECLAMPSY BY REMOTE ISCHEMIC PRECONDITIONING

V.V. GUREEV¹, M.V. POKROVSKIY²

A.A. DOLZHIKOV², S.A. ALEHIN¹

I.N. DOLZHIKOVA², E.G. GUREEVA¹,

I.M. KOLESNIK¹

I.O. GOLOVCHENKO²

M.V. KOROKIN²

Administration of ADMA-like agent lead NO-sintase blockage and pathomorphological changes similar to preeclampsia. Remote ischemic preconditioning significantly reduce pathomorphological changes. Recent studies are background for future investigations and clinical adoption or broaden their indications.

¹⁾ *Kursk State Medical University*

²⁾ *Belgorod National Research University*

e-mail: produmen@yandex.ru

Key words: rats, pre-eclampsy, L-NAME, treatment.