



УДК 618.3-06-08:577.112.385.2

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К КОРРЕКЦИИ АДМА-ПОДОБНОГО ГЕСТОЗА

В.В. ГУРЕЕВ¹
Е.Г. СТУПАКОВА²
Е.Г. ГУРЕЕВА¹
Д.В. ГОНЧАРОВА¹

¹*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

²*Курский государственный
медицинский университет*

e-mail: produmen@yandex.ru

Настоящее исследование демонстрирует, что воспроизведение коротких эпизодов ишемии-реперфузии и никорандил приводит к выраженной коррекции морфофункциональных нарушений, возникающих при моделировании экспериментального гестоза. Это выразилось в снижении артериального давления, уменьшении протеинурии, увеличении показателя микроциркуляции в плаценте, восстановлении вазодилатирующей функции сосудов и предотвращении деструктивных явлений в плаценте по сравнению с группой не леченных животных.

Ключевые слова: преэклампсия, эндотелиальная дисфункция, ишемия-реперфузия, никорандил.

Несмотря на значительные достижения в диагностике и лечении преэклампсии, она по-прежнему остается грозным заболеванием второй половины беременности. По данным различных авторов, частота его встречаемости колеблется от 6 до 20%. В структуре материнской смертности преэклампсия (прежнее название - гестоз) занимает 2-3 место. Патогенез этого грозного заболевания еще далек от полного понимания. Однако, в последние время многие авторы при морфологическом исследовании плаценты описывают специфическую гистологическую картину, заключающуюся в диспропорциях развития ее пограничного участка между материнской и плодовой частями. Происходит неполная инвазия цитотрофобласта в спиральные артерии матери. Образовавшиеся в ответ на ишемию гуморальные факторы при попадании в организм матери провоцируют развитие генерализованной эндотелиальной дисфункции, вторичных ишемических явлений и оксидативного стресса.

Поскольку ишемические явления служат пусковым моментом и вместе с эндотелиальной дисфункцией замыкают порочный круг в длинной цепи патофизиологических событий, приводящих к манифестации гестоза [4, 6, 7], снижение ишемических явлений в плаценте также является обоснованным направлением [2, 3].

На протяжении более 20 лет внимание исследователей в различных областях медицины уделяется феномену ишемического прекодиционирования. В классическом представлении он заключается в увеличении устойчивости к ишемии ткани или органа после кратковременного эпизода ишемии-реперфузии. В настоящий же момент большой интерес вызывают явления, вызываемые короткими эпизодами ишемии-реперфузии, носящие системный или отдаленный в топографическом плане характер.

Полученные положительные экспериментальные данные о возможности коррекции морфофункциональных изменений короткими эпизодами ишемии-реперфузии при экспериментальном гестозе свидетельствуют о перспективности выбранного направления [2, 3]. Однако, проведенные исследования не дают возможности с уверенностью говорить о возможности реализации положительных эффектов коротких эпизодов ишемии-реперфузии за счет биологических процессов, протекающих при феномене ишемического прекодиционирования, как это предполагалось изначально. Данный факт затрудняет поиск фармакологических агентов с подобным механизмом действия. Ключевым моментом механизма реализации противоишемического эффекта феномена ишемического прекодиционирования является активация АТФ-зависимых K^+ каналов, поэтому выяснение их роли в коррекции морфофункциональных нарушений короткими эпизодами ишемии-реперфузии и никорандилом при АДМА-подобном гестозе позволило бы получить сведения в пользу правильности начальной гипотезы.

Цель: исследовать влияние блокатора АТФ-зависимых K^+ каналов - глибенкламида на коррекцию морфофункциональных нарушений короткими эпизодами ишемии-реперфузии и никорандилом при АДМА-подобном гестозе в эксперименте.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 70 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 внутривентриально в дозе 25 мг/кг/сут в течение семи дней (14–20 сутки беременности) [5, 9]. На 21-е сутки беременности под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в правую сонную артерию для регистрации показа-



телей 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 20-е сутки беременности; III – с введением L-NAME и ежедневным воспроизведением 10-минутного ишемического эпизода задних конечностей попеременно с 10-х по 20-е сутки беременности; IV - с введением блокатора АТФ зависимых K⁺ каналов глибенкламида («Манинил», «Берлин-Хеми АГ/ Менарини Групп») в дозе 50 мг/кг внутрь с 14 по 20 сутки беременности; V - с введением L-NAME, ежедневным воспроизведением 10-минутного ишемического эпизода задних конечностей попеременно с 10-х по 20-е сутки беременности и введением глибенкламида указанным выше способом. VI – с введением никорандила («Коронель», «ПИК-ФАРМА») внутривенно в дозе 10 мг/кг 2 раза в сутки в течение 7 дней (с 14 по 20 день беременности). VII - с введением никорандила внутривенно в дозе 10 мг/кг 2 раза в сутки в течение 7 дней (с 14 по 20 день беременности) и глибенкламида внутривенно в дозе 50 мг/кг 2 раза в сутки в течение 7 дней (с 14 по 20 день беременности) за 45 минут перед введением никорандила. 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. Регистрации 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 их 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 $3,06 \pm 0,32$ ($p < 0,05$) (табл. 1). 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 наблюдались неравномерное кровенаполнение спонгиозного слоя, вакуольная дистрофия гигантского трофобласта, очаги некроза на границе гигантского трофобласта и децидуальной ткани, дистрофические изменения и малокровие децидуального слоя. Таким образом, моделирование ADMA-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.

В группе животных с 10-кратным воспроизведением ишемии-реперфузии и никорандилом наблюдалась нормализация взаимоотношений вазодилатирующих и вазоконстрикторных реакций, о чем свидетельствует снижение КЭД до $1,56 \pm 0,13$ и $1,95 \pm 0,13$ соответственно. Кроме этого, в группе животных с короткими эпизодами ишемии-реперфузии происходило статистически значимое снижение 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 улучшение в обеих леченых группах по сравнению с группой не леченых животных ($p < 0,05$), однако целевого уровня в группе с короткими эпизодами ишемии-реперфузии она не достигала (табл.). При биохимическом исследовании сыворотки крови обнаружено статистически значимое предотвращение снижения содержания стабильных метаболитов NO, уровень которых составил $1,92 \pm 0,18$ и $2,41 \pm 0,17$ мкмоль/дл. Микроскопическое исследование плаценты при моделировании ADMA-подобного гестоза с 10-кратным воспроизведением эпизодов ишемии-реперфузии и использованием никорандила выявило выраженную положительную дина-



мику гистологической картины, которая заключалась в отсутствии деструктивных изменений в плаценте ишемического генеза.

Таблица

Влияние коротких эпизодов ишемии-реперфузии задних конечностей и никорандила на фоне введения глибенкламида на коррекцию ADMA-подобного гестоза (M±m; n=10)

Группа	Показатель	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	КЭД, усл. ед.	Микроциркуляция, ПЕд	Концентрация нитрит-ионов (NOx), 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 ^y
L-NAME		183,1±9,4 [*]	136,7±7,4 [*]	3,06±0,32 [*]	210,0±21,1 [*]	1,33±0,09 [*]
L-NAME +ишемия-реперфузия		141,6±5,5 ^y	104,2±5,7 ^y	1,56±0,13 ^y	339,6±20,4 ^y	1,92±0,18 ^y
L-NAME +ишемия-реперфузия+глибенкламид		198,5±13,1 [*]	139,2±8,3 [*]	2,24±0,17 ^y	233,2±21,6 [*]	1,29±0,07 [*]
L-NAME + никорандил		173,6±5,6 [*]	127,4±5,7 [*]	1,95±0,13 ^y	394,2±19,0 ^y	2,41±0,17 ^y
L-NAME + никорандил + глибенкламид		182,3±6,5 [*]	129,2±8,1 [*]	2,8±0,2 [*]	279,1±10,5 [*]	1,28±0,09 [*]

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

Блокада глибенкламидом АТФ-зависимых K⁺ каналов практически полностью снимала положительные эффекты коротких эпизодов ишемии-реперфузии и никорандила при коррекции морфофункциональных нарушений при ADMA подобном гестозе. Только уровень КЭД при коррекции ADMA-подобного гестоза короткими эпизодами ишемии-реперфузии оставался статистически ниже группы не леченных животных.

Выводы. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что длительное (в течение семи суток) внутривенное введение блокатора NO-синтазы L-NAME вызывает у беременных самок крыс комплекс изменений, ассоциированных с NO-дефицитной эндотелиальной дисфункцией. На 8-е сутки развивалась выраженная гипертензия, в 3 раза увеличивался коэффициент эндотелиальной дисфункции, происходило снижение показателей плацентарной микроциркуляции, снижение конечных метаболитов NO в плазме крови и наблюдались четко выраженные морфологические изменения в плаценте. Описанный симптомокомплекс можно соотнести с развитием гестоза в клинических условиях.

Временной промежуток защитного эффекта «отсроченной» фазы или «позднего ишемического прекондиционирования», по данным разных авторов, колеблется от 12 до 96 часов [11, 12]. Во время отсроченной фазы ишемического прекондиционирования происходит активация генома, что приводит, в том числе и к индукции синтеза оксида азота [10], посредством ряда внутриклеточных мессенджеров и активации протеинкиназы С приводит к открытию АТФ-зависимых K⁺ каналов. Предположительно, при уменьшении ишемических явлений в плацентарной ткани за счет феномена ишемического прекондиционирования, происходит уменьшение выброса плацентой в кровоток гуморальных факторов, приводящих к развитию эндотелиальной дисфункции. Этим объясняется улучшение функции эндотелия в эту фазу. Данный механизм справедлив и для никорандила, так как он обладает прекондиционирующими свойствами.

Таким образом, результаты проведенного эксперимента дают основания для предположения о важной роли АТФ-зависимых K⁺ каналов в реализации положительных эффектов коротких эпизодов ишемии-реперфузии и никорандила в коррекции морфофункциональных нарушений при ADMA-подобном гестозе. Реализация эндотелепротективного эффекта коротких эпизодов ишемии-реперфузии и никорандила происходит опосредовано – активация АТФ-зависимых K⁺ каналов и позволяет уменьшить выделение плацентой гуморальных факторов вызывающих системную эндотелиальную дисфункцию.

Литература

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



2. Гуреев В.В. Эндотелиальная дисфункция – центральное звено в патогенезе гестоза // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2011. – № 4 (123). – С. 5–12.
3. Гуреев В.В., Покровский М.В., Должиков А.А. и др. Коррекция дистантным ишемическим пре-кондиционированием эндотелиальной дисфункции при АДМА-подобном экспериментальном гестозе // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2011. – № 4 (123). – С. 128–134.
4. Зайнулина М.С., Петрищев Н.Н. Эндотелиальная дисфункция и ее маркеры при гестозе // Журнал акушерства и женских болезней – 1997. – № 3. – С. 18 – 22.
5. Корокин М.В., Покровский М.В., Новиков О.О. и др. Влияние L-аргинина, витамина В₆ и фолиевой кислоты на показатели эндотелиальной дисфункции и микроциркуляции в плаценте при моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152. – № 7. – С. 77 – 80.
6. Кулаков В.И., Мурашко Л.Е., Бурлёв В.А. Клинико-биохимические аспекты патогенеза гестозов // Акуш. и гинекол. – 1995. – № 6. – С. 3 – 5.
7. Мозговая Е.В., Мальшева О.В., Иващенко Т.Э. и др. Эндотелиальная дисфункция при гестозе. Патогенез, генетическая предрасположенность, диагностика и профилактика: Метод. рекомендации. – СПб., 2003. – 156 с.
8. Покровский М.В., Кочкаров В.И., Покровская Т.Г. и др. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте // Кубанский науч. мед. вестн. – 2006. – № 10 (91). – С. 72 – 77.
9. Покровский М.В., Покровская Т.Г., Гуреев В.В. и др. Фармакологическая коррекция АДМА-eNOS-ассоциированных мишеней при преэклампсии // Акушерство и гинекология. – 2011. – № 2. – С. 16 – 20.
10. Kloner R.A., Jennings R.B. Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning, and Their Clinicopath Implications. Part 2 // Circulation. – 2001. – № 104. P. 3158 – 3167.
11. Kuzuya T., Hoshida S., Yamashita N., et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. // Circ Res. – 1993. – № 72. P. 1293 – 1299.
12. Rezkalla S.H., Kloner R.A. Preconditioning in humans // Heart Fail Rev. – 2007. – № 12. P. 201 – 206.

NEW APPROACHES OF CORRECTION OF ADMA-LIKE PREECLAMPSY

V.V. GUREEV¹
E.G. STUPAKOVA²
E.G. GUREEVA¹
D.V. GONCHAROVA¹

¹*Belgorod National
Research University*

²*Kursk State Medical University*

e-mail: produmen@yandex.ru

This study represents that reproduction of short ischemia-reperfusion episodes and nicorandil led to prominent correction of morphological and functional of violations occurring in modeling experimental preeclampsy. Those were reflected by reduction of hypertension level, proteinuria deterioration, placenta microcirculation improving, vasodilation function recovery and prevention of destructive changes in placenta in a comparison with intact group of animals.

Key words: preeclampsy, endothelial dysfunction, ischemia-reperfusion, nicorandil.