

УДК 618.2/3:616.61-002.252:577.322:577.152.1

И.А. Блощинская, Е.Б. Манухина,* И.М. Давидович

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕРЕМЕННОСТЬ И ГЕСТОЗ:
РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70***Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск,***НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва***РЕЗЮМЕ**

Изучено содержания метаболитов NO в плазме крови и моче и количества HSP70 в плазме и лейкоцитах у 126 женщин с физиологической беременностью, гестозом и на доклинической стадии развития гестоза. Установлено, что при гестозе, в условиях недостатка NO, более значительное увеличение HSP70 в плазме крови, по сравнению с возрастанием его количества в лейкоцитах, является важным маркером развития эндотелиальной дисфункции и служит свидетельством глубины повреждения клеток при данной патологии. Отражением дисфункции эндотелия на доклинической стадии гестоза является уменьшение выделения метаболитов NO с мочой и возрастание количества HSP70 в лейкоцитах и в плазме.

SUMMARY

L.A. Bloshchinskaya, E.V. Manuhina, L.M. Davidovich
PHYSIOLOGICAL PREGNANCY AND GESTOSES: ROLE OF NITRIC OXIDE AND HEAT STRESS PROTEINS HSP70

We have studied NO metabolite content in blood and urine plasma and HSP70 level in plasma and leukocytes in 126 women with physiological pregnancy, gestosis and pre-gestosis condition. We established that in women with gestosis suffering from NO deficit HSP70 level were higher in plasma than in leukocytes which suggests endothelial dysfunction and allows to determine cell damage extent for this pathology. At pre-gestosis stage endothelial dysfunction manifests in metabolite NO discharge decrease with urine and HSP70 increase in leukocytes and in plasma.

Гестоз является чрезвычайно важной проблемой в практическом и наиболее сложной в теоретическом отношении современного акушерства. Несмотря на постоянное совершенствование методов лечения и профилактики, гестоз продолжает занимать 2-е место в структуре причин материнской и перинатальной смертности (12,1 %), его частота составляет от 2,3 до 16,6% и не имеет тенденции к снижению [5].

Возможности предотвращения позднего гестоза связаны, прежде всего, с выявлением факторов, способствующих формированию этой патологии беременности, изучением механизмов заболевания и доклинической диагностикой его на ранних этапах [9].

Согласно современным представлениям, поздний гестоз рассматривается как «болезнь адаптации» со всеми стадиями, присущими общему адаптационному синдрому. Индикаторами развивающегося неблагополучия при воздействии на организм беременной стрессирующих факторов являются состояние гемостаза, иммунной и нейро-гуморальной систем, ответственных за регуляцию сосудистого тонуса и процессы микроциркуляции. Ведущая роль в патогенезе гестоза беременных принадлежит системному поражению сосудистого эндотелия с формированием эндотелиальной дисфункции, что способствует нарушениям микроциркуляции в жизненно важных органах и системах с развитием синдрома полиорганной недостаточности [9].

Среди многочисленных факторов эндотелиального происхождения безусловным маркером функции эндотелия служит оксид азота (NO). Молекула NO участвует в реализации таких физиологических функций, как регуляция тонуса гладких мышц и вазодилатация, снижение агрегации тромбоцитов, реакции иммунной системы, состояние памяти и другие, а также некоторых патологических процессов [2, 4, 6]. Действие системы оксида азота основано на способности NO ограничивать ключевые связи реакции напряжения и увеличивать потенцию эндогенных систем защиты организма [3, 4, 6].

Связующим звеном между центральными механизмами общего адаптационного синдрома при стрессе и внутриклеточной эндогенной защитой клетки является система белков HSP70 [3]. Белки HSP70 также являются своеобразным маркером эндотелиальной дисфункции, поскольку, с одной стороны, их активация находится под влиянием оксида азота, а с другой стороны, они ограничивают гиперпродукцию NO [6].

Цель работы состояла в изучении содержания стабильных метаболитов NO в плазме крови и моче и количества HSP70 в плазме и лейкоцитах у женщин с физиологической беременностью, гестозом и на доклинической стадии развития гестоза.

Материалы и методы

Во II и III триместрах обследовано 126 женщин, все первобеременные, средний возраст $26,2 \pm 1,7$ года. Зная у них течение беременности и исхода родов, они были разделены на следующие группы: группа ЗИИ - 82 женщины в III триместре физиологической беременности; группа ЗИП - те же 82 женщины во II триместре, зная исход течения беременности и родов, оценку параметров функционального состояния сосудистого эндотелия и микроциркуляции у них проводили ретроспективно. Группа ГИИ - 28 женщин в III триместре беременности осложненной О-гестозом (водянка беременных), группа ГИП - 16 женщин в III триместре беременно-

сти осложненной ОГ-гестозом (нефропатия беременных). Группа ГП-Р – те же 44 женщины во II триместре беременности, зная исход течения беременности и родов, оценку параметров функционального состояния сосудистого эндотелия и микроциркуляции у них также проводили ретроспективно. Контроль – 16 здоровых небеременных женщин (ЗНБ) соответствующего возраста.

Активность NO – системы оценивали по суммарному содержанию основных метаболитов NO – нитратов и нитритов в плазме крови и суточной моче. Восстановление нитратов до нитритов, как в плазме, так и в порции мочи, проводили в реакторе – восстановителе «Nitrate reduktor» («World Precision Instruments, Inc.», США) в присутствии 0,5M NH₄OH, pH 9,0 в качестве буфера. После восстановления порцию мочи или плазмы смешивали с равным объемом реактива Грисса, инкубировали в течение 10 мин. при комнатной температуре для изменения цвета. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм. Затем по калибровочной кривой определяли концентрацию нитритов. Суммарную экскрецию стабильных метаболитов NO рассчитывали на объем суточной мочи [13].

Для определения HSP70 в лейкоцитах 10 мл венозной крови забирали в пластиковую пробирку с гепарином, затем наслаивали на 2 мл 6%-ного раствора ЭДТА и инкубировали в термостате при +37°C 60 мин. После центрифугирования на холодовой центрифуге к осадку, содержащему лейкоциты, добавляли 7 мл холодного 0,9%-ного раствора NaCl, перемешивали и центрифугировали при 2000g 5 мин. К осадку добавляли 1,5 мл 0,9%-ного NaCl, перемешивали на вортексе и вносили весь объем в эппендорф ёмкостью 1,5 мл, снова центрифугировали при 2000g 5 мин и замораживали в среде жидкого азота.

Для определения HSP70 в плазме забирали 5 мл крови в пластиковую пробирку с 0,1 мл 7%-ного ЭДТА, и центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин на холодовой центрифуге при +4°C, затем переносили в

пластиковые эппендорфы и замораживали в среде жидкого азота. Предварительно полученную плазму соединяли с охлажденным лизис-буфером в соотношении 1:1. Предварительно очищенные лейкоциты соединяли с 50 мл охлажденного лизис-буфера. Дальнейший лизис проводили по общей схеме: пробу инкубировали при +4°C в течение 30 мин., нерастворимый осадок отделяли центрифугированием при 12000 об/мин и +4°C в течение 20 минут. Полученный супернатант соединяли с x2 Sampl-буфером и варили 7 мин. при 95°C на водяной бане и далее использовали для электрофореза, иммуноблотинга и детекции HSP70. Для проведения вестерн-блот анализа использовали реактивы и оборудование фирмы «Bio-Rad» (USA). Проявление исследуемых белков проводили на нитроцеллюлозной мембране при помощи иммуноферментной хемилюминесценции. После Вестерн-блоттинга, для блокирования оставшихся мест связывания, мембрану инкубировали в 5%-ного растворе Non-Fat Dry Milk на TPBS в течение 1 часа при комнатной температуре, далее блоты инкубировали с моноклональными антителами против индуцибельной формы HSP70 (SPA-810 фирмы «Stress Gen Biotechnologies Corp»). Для визуализации антигенной мишени использовали кит ECL RPN 2108 Batch 76. Экспонирование осуществляли на пленку Hyperfilm ECL («Amersham Pharmacia Biotech», Великобритания). Пленку проявляли и фиксировали, используя фотографические реактивы. О содержании HSP70 судили по ширине и интенсивности окрашивания полосы связывания антител. Кроме того, о содержании HSP70 в лейкоцитах и плазме крови после компьютерной обработки блотов судили по плотности пятна, выраженному в пикселях [8].

Полученные результаты обрабатывали с использованием пакета прикладных программ «Statistica» и определения критерия t Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Содержание стабильных метаболитов NO в плазме у здоровых беременных в III триместре (группа ЗИП) было таким же, как и у ЗНБ (табл. 1).

Таблица 1

Содержание стабильных метаболитов NO в плазме крови и моче и стресс-белков (HSP70) в лейкоцитах и плазме при различном течении беременности во II и III триместрах

Показатели	Контроль ЗНБ	Группы беременных				
		ЗИП-Р	ЗИП	ГП-Р	ГП-О	ГП-ОГ
Нитраты/Нитриты плазмы (мкмоль)	13,8±1,4 n=16	14,2±1,3 n=27	14,6±1,8 n=28	14,8±1,3 n=29	12,2±1,4 n=19	9,7±1,4* n=12 p ₁ <0,05
Нитраты/Нитриты мочи (мкмоль/л)	76,8±12,3 n=16	210,1±13,9* n=27	204,7±19,5* n=28	175,1±18,1* n=29	155,8±11,6* n=16	89,8±10,3 n=12 p ₂ <0,05
HSP70 в лейкоцитах (пиксель)	104,2±6,9 n=16	107,6±4,7 n=30	121,3±7,6 n=26	128,6±6,8* n=26	153,9±5,7** n=13 p ₁ <0,05	155,7±4,9** n=14 p ₂ <0,05
HSP70 в плазме (пиксель)	78,2±6,9 n=16	97,1±8,7 n=26	99,4±10,8 n=26	136,4±7,1** n=28	206,9±13,4** n=20 p ₁ <0,01	208,3±11,9** n=15 p ₂ <0,01

Примечание: условные обозначения: *, ** – достоверно p<0,05 и p<0,01 по сравнению с ЗНБ, p – достоверно между ЗИП-Р и ЗИП, p₁ – достоверно между ГП-ОГ и ГП-Р, p₂ – достоверно между ГП-ОГ и ГП-О.

Аналогичные результаты были получены и при ретроспективном изучении их концентрации у этих же женщин во II триместре (группа ЗП-Р). Вместе с тем, содержание метаболитов NO в моче у здоровых беременных в III триместре почти в три раза превышало аналогичный показатель в контроле, это же соотношение наблюдали у них и во II триместре. По нашему мнению, повышенный уровень метаболитов NO у здоровых беременных можно рассматривать как физиологический адаптационный процесс, приводящий к вазодилатации и направленный на снижение системного сосудистого сопротивления, наблюдаемого у беременных с нормотензией [1]. Это, наряду с уменьшением содержания у них суммарного эндотелина 1, 2 [1] способствует поддержанию адекватного кровоснабжения фетоплацентарного комплекса и, в свою очередь, является одним из механизмов адаптации женского организма к физиологической беременности.

В этом процессе, кроме NO, который является универсальным регулятором физиологических функций организма важное место, занимают эндогенные системы защиты, одна из которых представлена белками теплового шока HSP70 [4, 10, 12, 14].

Как видно из таблицы 1 у здоровых женщин в III триместре наблюдается умеренная тенденция к увеличению содержания HSP70 в лейкоцитах и плазме. По мнению отдельных авторов [3, 6] подобная адекватная реакция системы стресс-белков активизирует механизмы, нацеленные на защиту организма против напряжения, способствуя развитию адаптивного эффекта. Известно, что даже физиологически протекающая беременность является в определенной степени стрессом для женского организма, который включает необходимые механизмы адаптации [9]. При этом, важно отметить, что умеренное возрастание HSP70 в плазме и лейкоцитах у здоровых беременных (группы ЗП-О и ЗП-ОГ) идет параллельно с увеличением у них концентрации стабильных метаболитов NO в моче (рис. 1). Это может свидетельствовать о наличии адекватной стресс-реакции организма женщины на развивающуюся беременность, поскольку доказано, что NO активизирует синтез этих защитных стресс-белков [3, 6].

Вместе с тем, несколько иные данные были получены у женщин с патологией беременности. Количество стабильных метаболитов NO в плазме беременных с отеками (группа ГП-О) имело тенденцию к снижению, а их величина в моче была достоверно меньше, чем у здоровых женщин в этом же триместре ($155,8 \pm 11,6$ и $204,7 \pm 19,5$ мкмоль/л, $p < 0,05$). Однако самое низкое содержание стабильных метаболитов NO, как в плазме, так и в моче, по сравнению со здоровыми беременными, наблюдали у беременных с отеками и артериальной гипертензией (группа ГП-ОГ). Более того, концентрация стабильных метаболитов NO в моче у женщин данной группы была достоверно меньше, чем у беременных с отеками, но нормальным (АД). Установлено, что за счет патологических процессов в сосудах плаценты при гестозе нарушается биосинтез оксида азота и ускоряется его метаболизм, но повышается уровень эндотелина-1 [2, 3, 15].

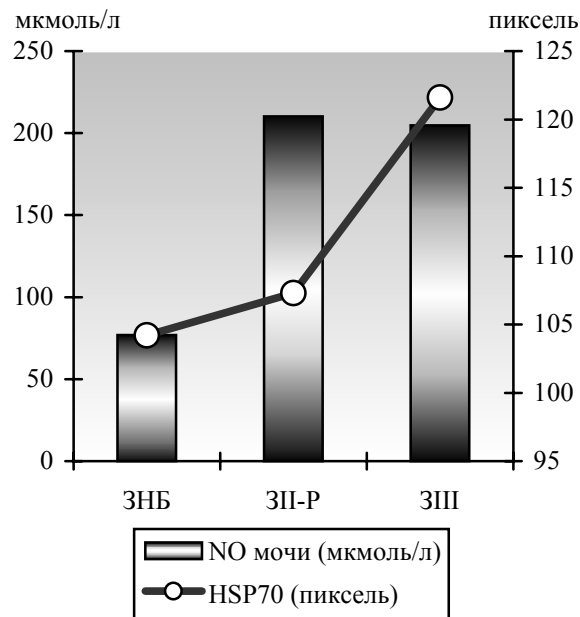


Рис. 1. Соотношение между NO моче и HSP70 в лейкоцитах у здоровых беременных.

Ретроспективное изучение содержания стабильных метаболитов NO в плазме и моче у этих же беременных во II триместре гестации (группа ГП-Р) выявило лишь отчетливую тенденцию к снижению у них концентрации метаболитов NO в моче, по сравнению со здоровыми беременными в этом же триместре, в остальном отклонений установлено не было.

Анализ содержания HSP70 в лейкоцитах и плазме женщин с патологией беременности показал, что в группах ГП-О и ГП-ОГ количество указанных стресс-белков было значительно повышено и достоверно ($p < 0,01$) отличалось от аналогичных показателей группы ЗП. При этом возрастание содержания белков теплового шока у данной категории беременных происходило на фоне сниженного содержания NO (рис. 2). По всей видимости, интенсивная и длительная стресс-реакция, которой, безусловно, является гестоз, оказывает повреждающее действие на органы и ткани и превращается из защитной, адаптационной реакции в патологическую. Установлено, что белки HSP70 могут уменьшать синтез NO за счет подавления экспрессии индуцибельной NO-синтетазы [3, 6], что возможно, и имело место в данном случае.

Более того, ретроспективный анализ показал, что у этих же женщин уже во II триместре наблюдалось повышенное содержание HSP70 в лейкоцитах по сравнению со ЗНБ. Кроме того, отмечали достоверное возрастание этих белков в плазме и отчетливую тенденцию к повышению их в лейкоцитах по сравнению с группой здоровых беременных ЗП-Р ($136,4 \pm 7,1$ и $97,1 \pm 8,7$ пиксель, $p < 0,01$).

Таким образом, установлено, что и при физиологической беременности происходит только умеренное плавное увеличение HSP70 как в лейкоцитах, так и в плазме крови. В то же время у беременных

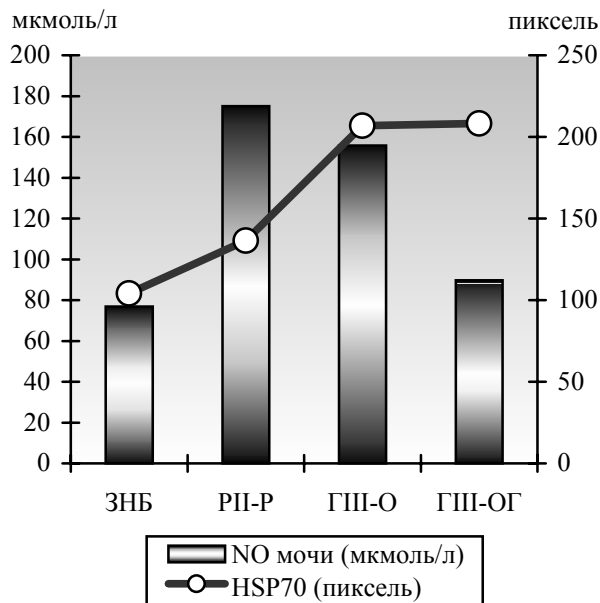


Рис. 2. Соотношение между NO мочи и HSP70 в лейкоцитах при патологии беременных.

группы риска развития гестоза, т.е. на его доклинической стадии, на фоне начинающегося процесса дефицита NO наблюдается достоверно значимый прирост HSP70 как в лейкоцитах, так и в плазме крови. Однако еще более значительные изменения со стороны содержания HSP70 происходят с появлением клинических признаков гестоза. При этом наблюдается достоверная разница в показателях HSP70 в лейкоцитах и в плазме крови между группой риска и беременными с отеками 1-2 степени.

Необходимо отметить, что при сопоставлении яркости пятна в блотах в сравнении с маркером молекулярной массы HSP70, у всех женщин с физиологической беременностью цветность пятна в плазме крови была значительно ниже уровня цветности маркера молекулярной массы HSP70. В то же время, у беременных группы риска (доклиническая стадия гестоза) она приближалась к цветности маркера HSP70, а при гестозе была сравнима с маркером и даже превышала его по цветности. Как известно, что HSP70 является внутриклеточным белком [3, 11]. Можно предполагать, что при физиологической беременности происходит только отщепление фрагментов HSP70 под влиянием какой либо ферментативной реакции и их переход в плазму крови, что является свидетельством целостности клеточной мембраны и нормального метаболизма клетки. При развитии гестоза появление HSP70 в плазме в неизменном виде служит с одной стороны свидетельством их гиперпродукции в клетке, а с другой стороны маркером апоптоза. Подтверждением этому может быть большой процент развития фетоплацентарной недостаточности в группе беременных с гестозом, поскольку одной из причин которого является повреждение эндотелиальных клеток на уровне плацентарного ложа, что доказано многочисленными гистологическими исследованиями плаценты при гестозе [7].

Выводы

1. Для физиологической беременности характерна высокая концентрация стабильных метаболитов NO в суточной моче и нормальное содержание белков HSP70 в лейкоцитах и плазме крови.

2. У беременных с гестозом происходит значительное уменьшение содержания стабильных метаболитов NO в плазме крови и суточной моче, что сопровождается изменением уровня активности HSP70.

3. При гестозе в условиях недостатка NO, высокое содержание HSP70 является важным маркером развития эндотелиальной дисфункции. Значительное увеличение HSP70 в плазме крови, по сравнению с возрастанием его количества в лейкоцитах, служит свидетельством глубины повреждения клеток при данной патологии.

4. Отражением дисфункции эндотелия на доклинической стадии гестоза является уменьшение выделения стабильных метаболитов NO с мочой наряду с возрастанием количества HSP70, как в лейкоцитах, так и в плазме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блощинская И.А., Давидович И.М., Петричко Т.А. Гестационная гипертензия: роль дисфункции эндотелия в механизме формирования // Дальневосточный мед. журнал.-2002.-№1.-С.5-7.
2. Габелова К.А., Арутюнян А.В., Зубжицкая Л.Б. Фиксированные иммунные комплексы и NO синтетазная активность плаценты при гестозе // Вестник Рос.ассоц. акуш.-гинеколов.-2000.-№1.-С. 22-24.
3. Зозуля О.В., Рогов В.А., Пятакова Н.В. Оксид азота: роль в развитии осложнений беременности и в их профилактике у женщин с гипертонической болезнью и хроническим гломерулонефритом // Тер. архив.-1997.-№6.-С.17-20.
4. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока.- М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001.-88 с.
5. Кулаков В.И., Мурашко Л.Е. Новые подходы к терминологии, профилактике и лечению гестоза // Акуш. и гинекология.-1998.-№5.-С. 3-9.
6. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия.-1998.-Т.63, №7.-С.992-1006.
7. Милованов А.П., Кирющенков П.А., Шмаков Р.Г. Плацента - регулятор гемостаза матери // Акуш. и гинекология.-2001.-№3.-С.3-5.
8. Пшенникова М.Г., Белкина Л.М., Бахтина Л.Ю. и др. Стресс-белки HSP70, оксид азота и устойчивость к инфаркту миокарда у крыс линии Август и крыс Вистар // Бюл. эксперим. биол. мед.-2001.-Т.132, №8.-С.153-155.
9. Современные проблемы гестозов / Г.М.Савельева Р.И.Шалина О.Б.Панина, М.А.Курцер // Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики гестоза: Тез.докл. международ. симпозиум.-М., 1998.-С.8-10.
10. Christians E.S., Yan L.J., Benjamin I.J. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners

in protection against acute cell injury//Crit. Care Med. - 2002.-Vol.30, №1.-P. S43-S50.

11. Hohfeld J., Cyr D.M., Patferson C. From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation//EMBO Rep.-2001.-Vol.2.-P.885-890.

12. Lepore D.A., Knight K.R., Anderson R.L. Role of priming stresses and HSP70 in protection from ischemia-reperfusion injury in cardiac and skeletal muscle//Cell. Stress. Chaperones.-2001.-Vol.6.-P.93-96.

13. Moshage H., Kok B., Huizenga R. Nitrite and nitrate determination in plasma: A critical evaluation//Clin. Chem.-1995.-Vol.41.-P. 892-896.

14. Pockley A.G. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease//Circulation.-2002.-Vol.105.-P. 1012-1017.

15. Shaamash A.H., Elsnosy E.D., Makhlof A.M. Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, preeclampsia and eclampsia//Int. J. Gynecol. Obstet.-2000.-Vol.68, №3.-P.207-214.



УДК 612.172.2:612.2- 053.4/6

Е.Г.Потягайло

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СЕРДЕЧНО-ДЫХАТЕЛЬНОГО СИНХРОНИЗМА У ДЕТЕЙ

Кубанская государственная медицинская академия, г. Краснодар

РЕЗЮМЕ

При произвольном воспроизведении человеком ритма дыхания, превышающего исходный сердечный ритм, развивается синхронизация дыхательного и сердечного ритмов. Определены параметры сердечно-дыхательного синхронизма и выявлены их возрастные особенности у детей обоего пола 5 - 15 лет. Возрастная динамика параметров сердечно-дыхательного синхронизма у детей, по-видимому, предопределяется развитием и становлением у них нервной системы.

SUMMARY

E.G.Potyagailo

AGE PECULIARITIES OF CARDIO-RESPIRATORY SYNCHRONISM IN CHILDREN

Human respiratory rate exceeding baseline heart rate results in synchronization of respiratory rate and heart rate. Cardio-respiratory parameters and their age peculiarities have been determined in children aged 5-15. The age dynamics of cardio-respiratory synchronism parameters in children is predetermined by nervous system development.

Сердечно-дыхательный синхронизм – явление, проявляющееся в том, что при частоте дыхания, превышающей исходный сердечный ритм, сердце усваивает дыхательную ритмику и сокращается с частотой дыхания [1, 2, 3].

В формировании сердечно-дыхательного синхронизма принимают участие различные структурно-функциональные уровни центральной нервной системы и эффекторные образования в следующей последовательности:

1) восприятие и анализ зрительным анализатором частоты всплеск фотостимулятора, задающего ритм дыхания;

2) построение и выполнение задачи произвольного дыхания в этом ритме;

3) передача управляющего сигнала к дыхательному центру продолговатого мозга;

4) воспроизведение заданной частоты дыхательным центром, иррадиация возбуждения на сердечный центр и вовлечение его в эту ритмику;

5) передача сигналов в форме залпов импульсов, синхронных с частотой дыхания, по эфферентным волокнам блуждающего нерва к сердцу;

6) воспроизведение сердцем заданной частоты в результате взаимодействия поступившего сигнала с ритмогенными структурами сердца.

Принимая во внимание в формировании сердечно-дыхательного синхронизма участие различных структурно-функциональных уровней нервной системы, развитие и становление которой происходит у детей, возникло предположение о возрастной динамике его параметров.

Целью данной работы было определить параметры сердечно-дыхательного синхронизма у здоровых детей и выявить их возрастные особенности.

Материал и методы

Обследован 371 здоровый ребенок. Из них 175 девочек и 196 мальчиков. При постановке исследований были учтены требования Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации.

Всем детям проводилась проба сердечно-дыхательного синхронизма [4]. Проведение пробы сердечно-дыхательного синхронизма позволило определить его параметры: минимальную и максимальную границы сердечно-дыхательного синхронизма, ширину диапазона синхронизации, разницу между минимальной границей и исходной частотой сердечных сокраще-