

КОРРЕКЦИЯ АДМА-ПОДОБНОГО ГЕСТОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© Гуреев В.В., Алёхин С.А., Должиков А.А., Мостовой А.С.

Кафедра клинической фармакологии, кафедра фармакологии, кафедра хирургических болезней № 2
Курского государственного медицинского университета, Курск;
Научно-образовательный центр прикладной иммуноморфологии и цитогенетики
НИУ БелГУ, Белгород
E-mail: kaf.farmakolog@kurskmed.com

Введение АДМА-подобного агента – L-NAME крысам, вызывает блокаду NO-синтазы и приводит к патофизиологическим изменениям, подобным гестозу. Ведение фармакологических агентов обладающих эндотелеопротективными свойствами: L-аргинина, L-норвалина и рекомбинантного эритропоэтина, приводит к явной коррекции патологических изменений. При этом происходит не однородные изменения критериев оценки эффективности препаратов, что объясняется различными точками приложения механизмов их действия при АДМА-подобной модели гестоза. Результаты исследования служат предпосылкой для проведения дальнейших исследований с целью включения данных препаратов в клиническую практику или расширения показаний для их применения.

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

CORRECTION OF EXPERIMENTAL ADMA-LIKE PRE-ECLAMPSY

Gureev V.V., Alekhin S.A., Dolzhikov A.A., Mostovoy A.C.

Clinical Pharmacology Department, Pharmacology Department, Department of Surgical Diseases N 2
of the Kursk State Medical University, Kursk

L-NAME administration in pregnant rats leads to the pathological changes similar to pre-eclampsy ones. The administration of a pharmacological agent increasing NO activity (L-arginin, L-norvaline, erithropoietin) declines the pathological changes. According to different mechanisms of action the substances reveal different efficacy in ADMA-like pre-eclampsy model. The recent studies serve as a background to the further investigations and clinical adoption or broadening their indications.

Keywords: rats, pre-eclampsy, L-NAME, treatment.

Благополучное протекание беременности и успешные роды зависят от адаптационных возможностей женского организма и правильной перестройки функционирования различных систем органов и регуляторных механизмов. Основную роль в регуляции развития беременности играют гуморальные факторы, поскольку плацента не обладает нервным аппаратом. Во время беременности происходит динамическое качественное и количественное изменение не только гормонального спектра, но и многих других гуморальных регуляторов: факторов роста, простациклинов, тромбоксанов, эндотелинов, NO, цитокинов, а также рецепторов к ним [8, 10, 16, 19]. Образование гуморальных регуляторов происходит как в материнской части плаценты, так и различных участках плодного яйца. Поэтому плод является не пассивно развивающимися тканями, а объектом, принимающим активное участие в регуляции этого процесса [7, 9, 16].

В последние годы обнаружено, что концентрация асимметричного диметиларгинина (ADMA) в материнской плазме гораздо выше у женщин с преэклампсией [19] и что повышенные концентрации ADMA - один из предикторов гестоза [17, 18, 19]. ADMA является физиологическим ингибитором NO-синтазы, и поэтому его

повышенное содержание в эндотелиальных клетках может служить пусковым моментом к развитию гестоза.

Ранее в нашей лаборатории исследовался целый ряд препаратов, относящихся к различным фармакологическим группам, обладающих эндотелиопротективной активностью при различных NO - дефицитных состояниях [3, 7, 5, 13, 15]. Обнадеживающие результаты при коррекции эндотелиальной дисфункции, в том числе и при АДМА - подобном гестозе, получены с использованием L-аргинина [2, 12, 14]. Данный препарат значительно снижал или полностью предупреждал развитие патофизиологических явлений. Другими перспективными препаратами, обладающими способностью влиять на развитие морфофункциональных нарушений при гестозе, по нашему мнению, являются L-норвалин, относящийся к ингибиторам аргиназ, и рекомбинантный эритропоэтин, усиливающий синтез тетрагидробиоптерина, который, в свою очередь, является кофактором NO-синтазы. В настоящем исследовании проведено сравнительное изучение возможности коррекции экспериментального гестоза с помощью L-норвалина и рекомбинантного эритропоэтина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводились на белых крысах-самках линии Wistar массой 250–300 г. Неселективный блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинин-метилэфир (L-NAME) вводился внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг/сут в течение 7 дней (14-20 сутки беременности). На 21 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) [11]. Беременные самки были разделены на группы (n=10): I – интактные; II – с введением L-NAME ежедневно с 14 по 21 сутки беременности; III – с введением на фоне L-NAME L-аргинина (200 мг/кг внутривенно) ежедневно с 14 суток беременности; IV – с введением на фоне L-NAME L-норвалина (10 мг/кг, внутривенно) ежедневно с 14 суток беременности; V – с подкожным введением на фоне L-NAME рекомбинантного эритропоэтина в дозе 50 МЕ/кг на 7, 10, 13, 16, 19 сутки беременности. 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-продуцирующая функция эндотелия оценивалась на основании данных содержания стабильных метаболитов NO - нитрит-ионов NOx в сыворотке крови. Беременность определяли пальпаторно на 14 сутки. Морфологическое исследование плацент проводилось 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 ИССЛЕДОВАНИЯ
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 $3,06 \pm 0,32$ ($p < 0,05$). 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, 2).

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.

Длительное, в течение 7 суток, ежедневное внутривенное введение L-аргинина и L-норвалина на фоне L-NAME-индуцированной преэклампсии приводило к достоверному снижению КЭД до $1,50 \pm 0,25$, и $1,51 \pm 0,15$ соответственно, что в два раза меньше, чем у нелеченых животных ($p < 0,05$). Отмечалось нормализация взаимоотношения вазодилатирующих и вазоконстрикторных реакции и при коррекции экспериментальной преэклампсии эритропоэтином, о чем свидетельствует снижение КЭД в этой группе до $1,67 \pm 0,15$.

Достоверно значимое снижение артериального давления примерно в равной степени отмечалось в группах животных, леченных L-аргинином и эритропоэтином. Исследование микроциркуляции плаценты выявило ее существенное улучшение во всех группах леченых животных (табл.).

При биохимическом исследовании сыворотки крови обнаружено предотвращение снижения содержания стабильных метаболитов NO у групп животных, леченных L-аргинином и L-норвали-

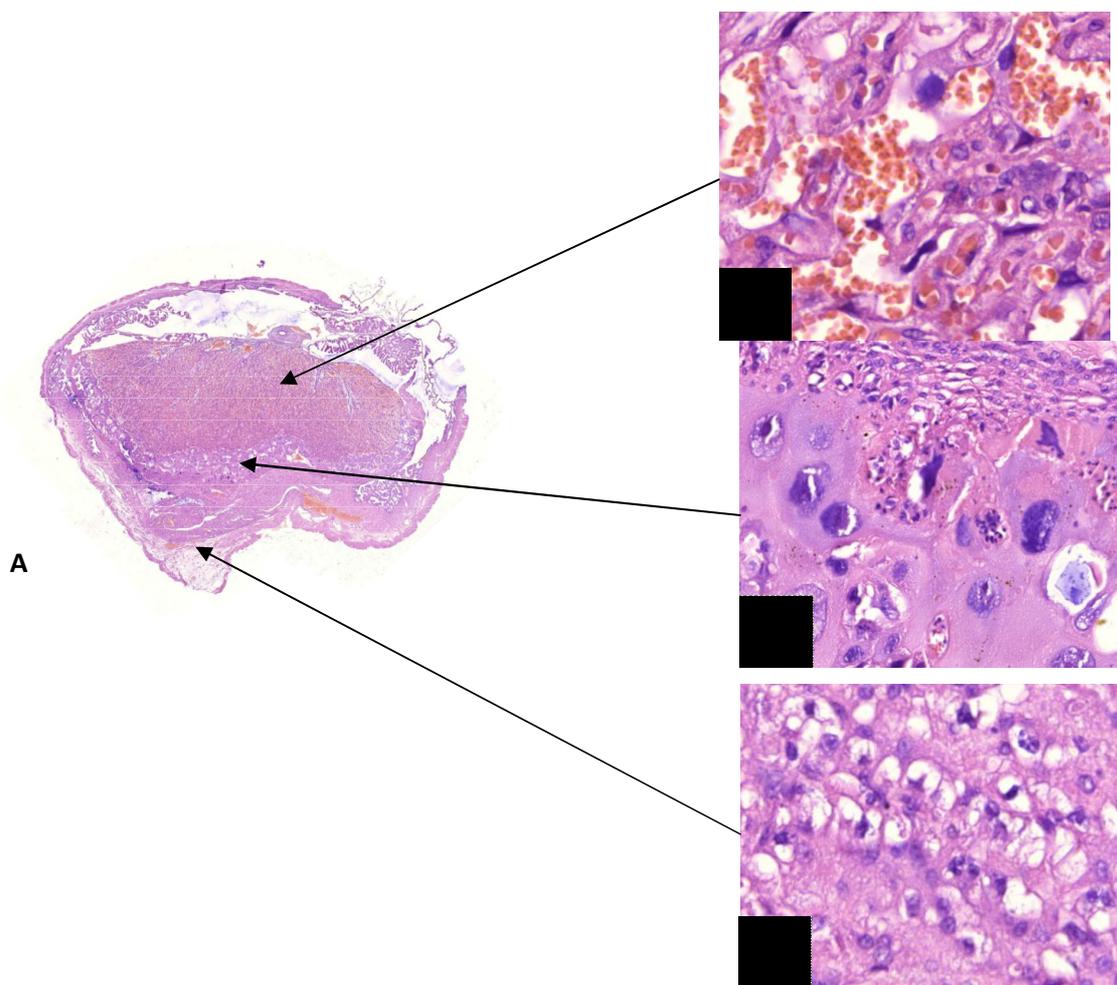


Рис. 1. Строение intactной плаценты.

Примечание: А – плацента на поперечном срезе; Б - спонгиозный слой; В - слой гигантского трофобласта; Г - децидуальная ткань. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото; X 200.

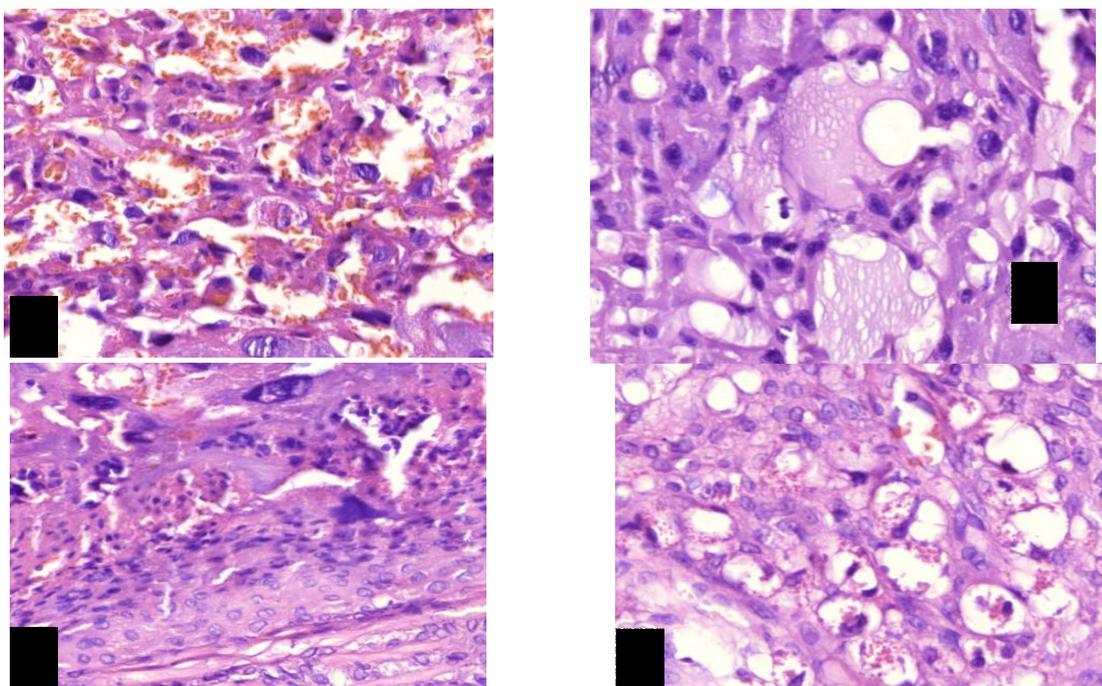


Рис. 2. Патологические изменения при моделировании экспериментального гестоза.

Примечание: А – Неравномерное кровенаполнение спонгиозного слоя; Б - Вакуольная дистрофия гигантского трофобласта; В - Очаги некроза на границе гигантского трофобласта и децидуальной ткани; Г - Дистрофические изменения, малокровие децидуального слоя. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото; X 200.

Результаты коррекции L-NAME-индуцированной преэклампсии у крыс (M±m; n=10)

Показатель Группа	САД мм рт. ст.	ДАД мм рт. ст.	КЭД усл. ед.	Микроциркуляция пер. ед.	Концентрация нитрит-ионов (NOx) мкмоль/дл
Интактные	125±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 + L-аргинин	151,2±5,3 ^y	112,8±6,8 ^y	1,50±0,25 ^y	342,5±29,3 ^y	2,33±0,15 ^y
L-NAME + L-норвалин	194,5±8,3*	146,4±8,2*	1,51±0,15 ^y	455,7±41,5 ^y	2,10±0,14 ^y
L-NAME + рекомбинантный эритропоэтин	143,5±4,3 ^y	98,1±5,9 ^y	1,67±0,15 ^y	301,1±19,4 ^y	1,39±0,12*

Примечание: САД, ДАД – систолическое и диастолическое артериальное давление (мм рт.ст.); КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции (у.е.); микроциркуляция в плаценте (Пер/ед); концентрация нитрит-ионов (NOx);

*- p < 0,05 в сравнении с группой интактных животных;

^y- p < 0,05 в сравнении с группой L-NAME.

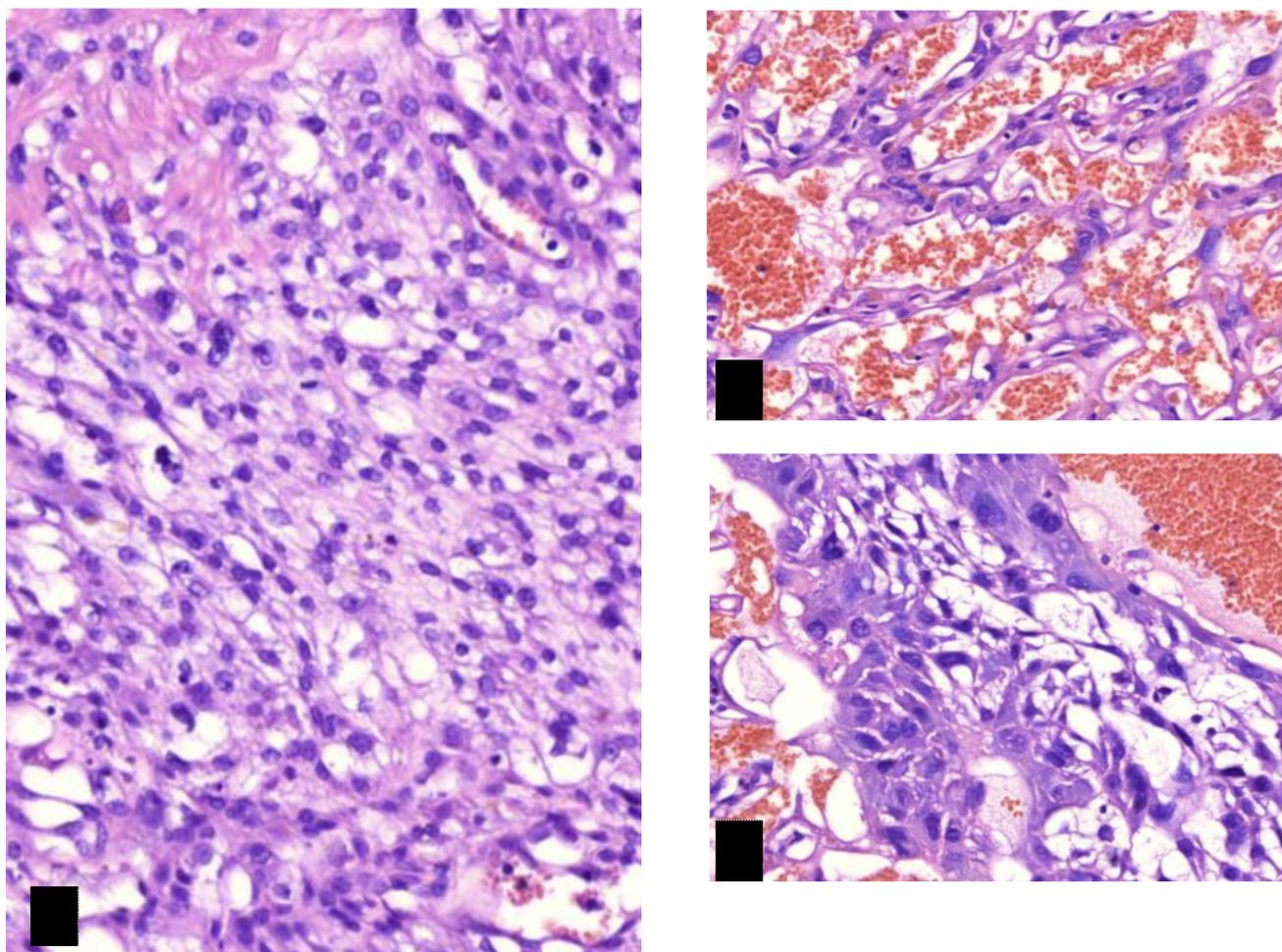


Рис. 3. Морфологическая картина плаценты при лечении экспериментального гестоза L-норвалином.

Примечание: А – Децидуальный слой: мономорфная структура, отсутствие дистрофических изменений; Б - Равномерное кровенаполнение спонгиозного слоя; В - Отсутствие дистрофических изменений трофобласта. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото; X 200.

ном, уровень которых составил $2,33 \pm 0,15$ и $2,10 \pm 0,14$ мкмоль/дл соответственно.

Микроскопическое исследование патологических изменений плаценты при моделировании АДМА-подобного гестоза выявило эффективность используемых фармакологических агентов, но в различной степени. Наиболее близкая к группе интактных животных морфологическая картина в плаценте наблюдалась у животных, получавших L-аргинин и L-норвалин (рис. 3).

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

Использование ряда фармакологических агентов приводило к явной коррекции моделируемого патологического состояния с индивидуальными особенностями в каждом случае. Это связано, с одной стороны, с вовлечением на 7 суток в патогенетический процесс не только нитроэргической системы, но и других элементов гуморального и нейрогенного контуров регуляции системы кровообращения, и различными механизмами реализации улучшения функции эндотелия.

В обычных условиях физиологическая регуляция происходит таким образом, что любое повышение АДМА, или введение АДМА-подобного агента, приводит к вытеснению ими L-аргинина из активного центра фермента. Происходит конкурентное, обратимое субстратное ингибирование эндотелиальной NO-синтазы, что приводит к снижению синтеза NO. Повышение концентрации L-аргинина приводит к развитию событий в обратном направлении. Происходит субстратное вытеснение АДМА, активация NO-синтазы, увеличение синтеза NO [2, 12, 14]. Повышения содержания L-аргинина можно добиться путем введения его извне.

Другим способом увеличения количества L-аргинина, связывающегося с NO-синтазой, является блокирование активности аргиназы, которая образует из L-аргинина орнитин и мочевины. Этим объясняется выраженная эффективность применения L-норвалина, являющегося блокатором аргиназы. Введение этого фармакологическо-

го агента по большинству основных критериев оказывает терапевтический эффект, равный L-аргинину.

Увеличение синтеза NO из L-аргинина можно добиться не только повышением активности NO-синтазы, но и увеличением ее количества. Введение рекомбинантного эритропоэтина приводит к усилению синтеза тетрагидробиоптерина. Тот, в свою очередь, являясь ко-фактором NO-синтазы, способствует ускорению ее синтеза, что приводит к увеличению образования NO из L-аргинина [5].

Неоднородное изменение критериев оценки эффективности используемых фармакологических агентов для коррекции экспериментального гестоза объясняется различными точками приложения. Результаты проведенного исследования сопоставимы с данными исследований, проводимых другими авторами [2, 5, 12, 14]. Это, с одной стороны, подтверждает правильность выбранной концепции, с другой - дает основание для проведения более углубленных исследований в этом направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Артюшкова Е.Б., Пашиков 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. *Залозных Я.И., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. и др.* Применение L-аргинина в комплексе с амлодипином и индапамидом при экспериментальном моделировании L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции // Кубанский науч. мед. вестн. – 2007. – № 1-2. – С. 52–55.
3. *Корокина Л.В., Граник В.Г., Макаров В.А. и др.* Изучение эффектов синтетических доноров оксида азота при L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции // Кубанский науч. мед. вестн. – 2006. – № 9. – С. 141–145.
4. *Корокин М.В., Пашин Е.Н., Бобраков К.Е. и др.* Изучение эндотелиопротективного и коронарного действия производных 3-оксипиридина // Кубанский науч. мед. вестн. – 2009. – № 4. – С. 104–108.
5. *Корокина Л.В., Колесник И.М., Покровский М.В. и др.* Фармакологическая коррекция L-NAME индуцированного дефицита оксида азота рекомбинантным эритропоэтином // Кубанский науч. мед. вестн. – 2009. – № 9. – С. 66–69.
6. *Крукиер И.И., Орлов А.В., Ермолова Н.В.* Продукция вазоактивных компонентов в плаценте при ее функциональной недостаточности // Пренатальная диагностика и беременности высокого риска: матер. пленумов Росс. ассоц. акуш.-гинекол., проблемн. комис. РАМН МЗ РФ. – Ростов н/Д: Изд-во МП «Книга», 2003. – С. 74–76.
7. *Крукиер И.И., Погорелова Т.Н., Орлов В.И., Друккер Н.А.* Состояние простагландинсинтезирующей системы и продукция интерлейкинов в плодных

- оболочках при преждевременных родах // Пренатальная диагностика и беременности высокого риска: матер. пленумов Российской ассоц. акуш.-гинекол., проблемн. комис. РАМН МЗ РФ. – Ростов н/Д: Изд-во МП «Книга», 2003. – С. 61 - 65.
8. Крукиер И.И., Погорелова Т.Н. Содержание оксида азота и эндотелина в пуповине и плодных оболочках при преждевременных родах // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 10. – С. 164.
 9. Орлов В.И., Погорелова Т.Н., Длужевская Т.С., Мелконова К.Ю., Крукиер И.И. Околоплодные воды. Химический состав и биологические функции. – Ростов н/Д: Изд-во МП «Книга», 1998. – 216 с.
 10. Орлов А.В., Погорелова Т.Н., Крукиер И.И., Друккер Н.А. Содержание факторов роста и вазоактивных соединений в сыворотке крови женщин в 1 триместре беременности // Пренатальная диагностика и беременности высокого риска: матер. пленумов Росс. ассоц. акуш.-гинекол., проблемн. комис. РАМН МЗ РФ. – Ростов н/Д: Изд-во МП «Книга», 2003. – С. 302 - 305.
 11. 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, Т. 91. – С. 72 – 77.
 12. Покровский М.В., Покровская Е.Г., Кочкаров В.И., Артюшкова Е.Б. Эндотелиопротективные эффекты L-аргинина при экспериментальном моделировании дефицита оксида азота // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – Т. 71. № 2. – С. 29 – 31.
 13. Покровский М.В., Кочкаров В.И., Покровская Т.Г. и др. Сравнительное изучение потенциальных эндотелиопротекторов и препарата «Импаз» при моделировании дефицита оксида азота // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 8, приложение. – С. 154 – 158.
 14. Покровский М.В., Покровская Т.Г., Гуреев В.В. и др. Фармакологическая коррекция L-аргинином «ADMA-ENOS-ассоциированных мишеней» при экспериментальной преэклампсии // Кубанский науч. мед. вестн. – 2010. – № 1. – С. 85 - 92.
 15. Черноморцева Е.С., Покровский М.В., Покровская Т.Г. и др. Экспериментальное изучение кардиопротекторного и эндотелиопротекторного действия макролидов и азалидов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 2. – С. 29 - 31.
 16. Pogorelova T.N., Drukker N.A., Krukiier I.I., Orlov V.I. Physical and chemical modification of placental plasmatic membranes under hypoxia // J. Hypoxia medical. – 1998. – Vol. 6, N2. – P. 56.
 17. Savvidou M.D. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop preeclampsia // Lancet. – 2003. – Vol. 361. – P. 1511 – 1517.
 18. Smith C.L. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulates ADMA levels, VEGf expression, and cell phenotype // Biochemical & Biophysical Research Communications. – 2003. – Vol. 308. – P. 984 – 989.
 19. Speer P.D. Elevated asymmetric dimethyl-arginine concentrations precede clinical preeclampsia, but not pregnancies with small-for-gestational-age infants // Am J Obstet Gynecol. – 2008. – Vol. 198, N1. – P. 112 – 117.