



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

¹⁾ *Курский государственный
медицинский университет*

²⁾ *Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: produmen@yandex.ru

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.

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

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 подвергнувшись ишемическому прекодиционированию. Ишемия является одним из наиболее сильных и универсальных стимулов 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 преколонирование) [2, 5, 8, 21, 30]. В связи с этим актуальным представляется исследование влияния дистантного ишемического преколонирования на течение ADMA-подобного экспериментального гестоза.

Методика исследования. Эксперимент выполнен на 40 белых крысах-самках линии Wistar массой 250-300 г. ADMA-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 сутки 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 нитропрусида 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 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.

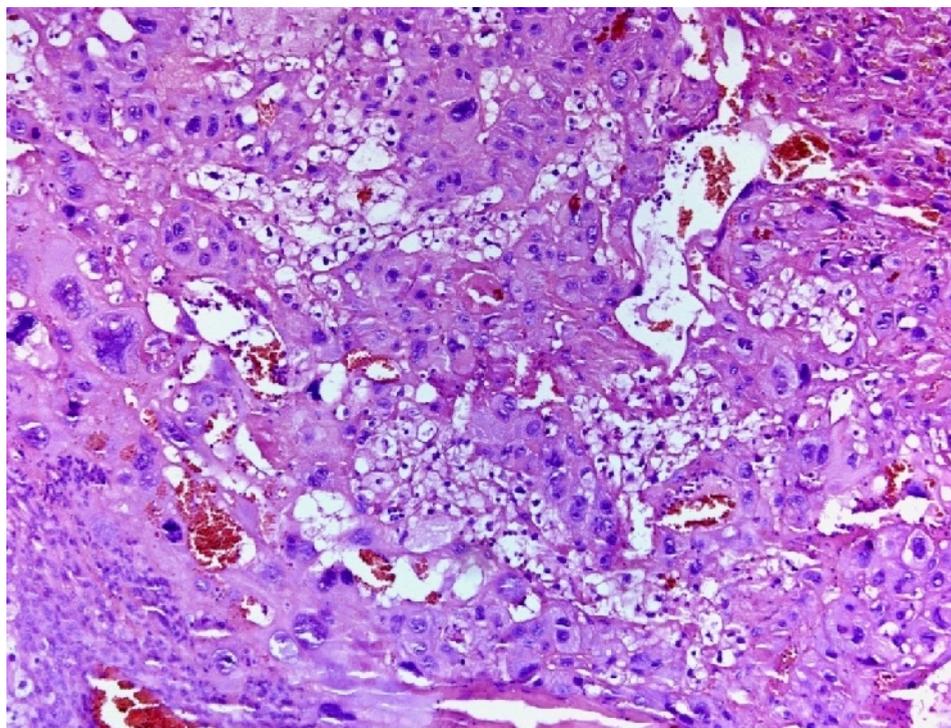


Рис. 1. Патоморфологические изменения плаценты при L-NAME-индуцированном гестозе. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. X 200

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 прекондиционирование	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 прекодиционирования 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 прекодиционированием выявило выраженную положительную динамику гистологической картины, которая заключалась в относительно равномерном кровенаполнении спонгиозного слоя, отсутствии повреждения слоя гигантского трофобласта и децидуальной оболочки (рис. 2).

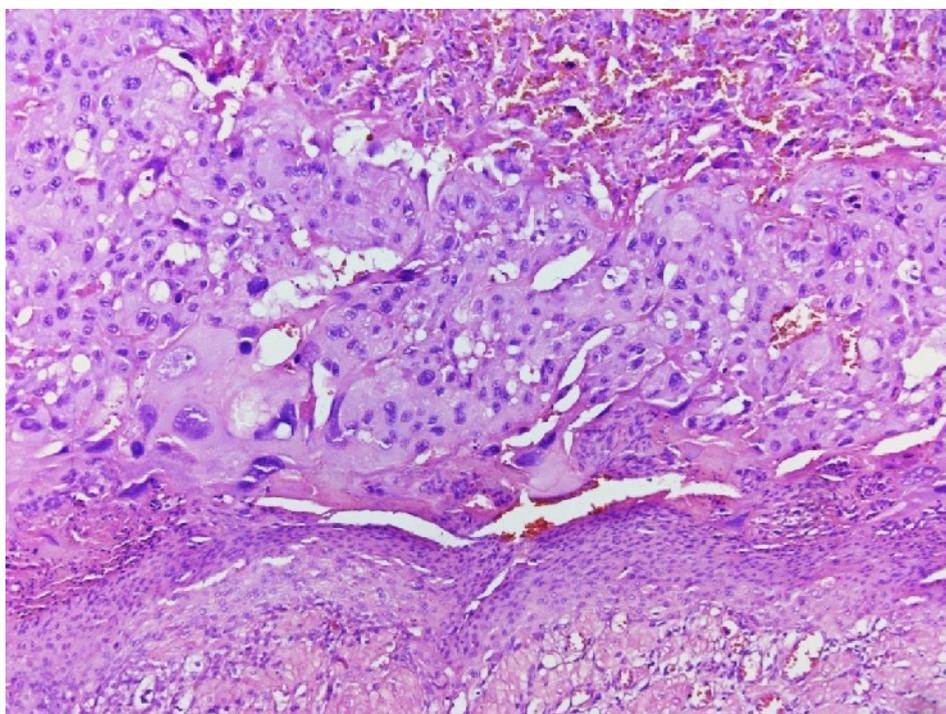


Рис. 2. Структура плаценты при L-NAME-индуцированном гестозе на фоне дистантного ишемического прекодиционирования. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. X 200

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 прекондиционирования 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 прекондиционирование») 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 прекондиционирования, 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 прекондиционирования.

Временной промежуток защитного эффекта «отсроченной» фазы или «позднего прекондиционирования», по данным разных авторов, колеблется от 12 до 96 часов [23, 27]. Несмотря на внешнее сходство в методологии воспроизведения ишемических эпизодов, механизмы их прекондиционирующего 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 прекондиционирования 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 прекондиционирования с целью коррекции гестоза и поиска новых лекарственных препаратов с механизмом действия, лежащим в основе эффекта ишемического прекондиционирования.

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

Литература

1. Возможности фармакологической коррекции хронической ишемии конечности в эксперименте / Е.Б. Артющкова, 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 Clinicoавт 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

¹⁾ *Kursk State Medical University*

²⁾ *Belgorod National Research University*

e-mail: produmen@yandex.ru

Administration of ADMA-like agent lead NO-synthase 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.

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