

УДК 618.3:616.13-018.74-092.4

РОЛЬ INOS В КОРРЕКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ АДМА-ПОДОБНОМ ГЕСТОЗЕ КОРОТКИМИ ЭПИЗОДАМИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Гуреев В.В.

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск, e-mail: kurskmed@mail.ru

Моделирование экспериментального АДМА-подобного гестоза осуществляли путем введения крысам L-NAME с 14 по 20 сутки беременности. У животных наблюдались повышение артериального давления, протеинурия, нарушение микроциркуляции в плаценте, нарушение регуляции сосудистого тонуса и деструктивные изменения в плаценте ишемического генеза. Воспроизведение коротких эпизодов ишемии-реперфузии приводило 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 предотвращение деструктивных явлений в плаценте по сравнению с группой нелеченных животных. Введение селективного блокатора iNOS – аминогуанидина практически полностью устраняло протективное влияние коротких эпизодов ишемии-реперфузии. Об этом свидетельствует возвращение исследуемых нами показателей, кроме коэффициента эндотелиальной дисфункции, к уровню статистически не отличающегося от группы нелеченных животных. Приведенные данные позволяют говорить о значительной роли iNOS в реализации положительных эффектов коротких эпизодов ишемии-реперфузии в коррекции морфофункциональных нарушений, возникающих при моделировании АДМА-подобного гестоза.

Ключевые слова: крысы, преэклампсия, L-NAME, лечение, ишемическое прекондиционирование, аминогуанидин

INOS ROLE IN IN CORRECTION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AT EXPERIMENTAL ADMA-LIKE PREECLAMPSY BY SHORT ISCHEMIA-REPERFUSION EPISODES

Gureev V.V.

Kursk state medical university of the Ministry of Health of Russian Federation, Kursk, e-mail: kurskmed@mail.ru

Modeling of experimental ADMA-like preeclampsy in rats was achieved by L-NAME administration from 14-th up to 20-th days of gestation. Arising of blood pressure, proteinuria, impairment of placenta microcirculation, blood vessels tonus disregulation, placenta destructive changes of ischemical genesis were observed in animals. Short ischemia-reperfusion episodes lead to prominent correction of morpho-functional changes due to experimental preeclampsy modeling. 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. Administration of selective iNOS blocker – aminoguanidine practically abolishes protective influence of short ischemia-reperfusion episodes. That is confirmed by restitution of studied parameters, except of the endothelial dysfunction factor to a statistically not different level of intact group of animals. Obtained data suggest the significant role of iNOS in the implementation of positive effects of short ischemia-reperfusion episodes in a correction of morpho-functional changes at ADMA-like preeclampsy in rats.

Keywords: rats, preeclampsy, L-NAME, treatment, ischemical preconditioning, aminoguanidine

Гестоз второй половины беременности является самым частым заболеванием беременных и занимает первое место в причинах материнской и перинатальной смертности. В основе его патогенеза, по мнению многих авторов, лежит острый эндотелиоз, поэтому для коррекции этого грозного осложнения одним из перспективных направлений, которое получило экспериментальное обоснование [4, 5, 7, 11], является поиск новых лекарственных препаратов среди группы препаратов, улучшающих функцию эндотелия. Поскольку ишемические явления служат пусковым моментом и вместе с эндотелиальной дисфункцией замыкают порочный круг в длинной цепи патофизиологических событий, приводящих к манифестации гестоза [6, 8, 9], снижение ишеми-

ческих явлений в плаценте также является обоснованным направлением [2, 3].

В исходной гипотезе, послужившей предпосылкой для проведения эксперимента, было предположение о том, что в основе механизма положительных эффектов на функцию эндотелия коротких эпизодов ишемии-реперфузии лежат биологические процессы феномена ишемического прекондиционирования [2, 3]. Одним из основных его моментов является увеличение синтеза NO, которое может в какой-то мере компенсировать его недостаток и уменьшить явления эндотелиальной дисфункции. Одной из причин манифестации эндотелиальной дисфункции является достижение концентрации асимметричного диметиларгинина (ADMA) и его аналогов уровня, вызываю-

щего конкурентное ингибирование эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в 1000 больше eNOS, поэтому можно предположить, что влияние ADMA на активацию iNOS в отсроченную фазу ишемического preconditionирования [12] не носит принципиального характера. Для подтверждения правильности гипотезы необходимо было исследовать влияния блокады iNOS на коррекцию эндотелиальной дисфункции короткими эпизодами ишемии-реперфузии в условии ADMA-подобного гестоза.

Цель – исследовать влияние селективного блокатора iNOS – аминогуанидина на коррекцию морфофункциональных нарушений короткими эпизодами ишемии-реперфузии при ADMA-подобном гестозе в эксперименте.

Материалы и методы 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-метилэфир (L-NAME) вводили внутривенно в дозе 25 мг/кг/сут в течение семи дней (14–20 сутки беременности) [7, 11]. 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 эндотелий-зависимую вазодилатацию (ЭЗВ) – внутривенное введение ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мг/кг, и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНЗВ) – внутривенное введение нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мг/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 L-NAME, ежедневным воспроизведением 10-минутного ишемического эпизода задних конечностей попеременно с 10-х по 20-е сутки беременности и введением селективного блокатора iNOS аминогуанидина в дозе 300 мг/кг (внутрибрюшинно). 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 «Biorac 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, фотопроколирование и морфометрию проводили на микроскопе Leica DM4000B с системой видеорегистрации и обработки изображений.

Результаты исследования и их обсуждение

Блокада NO-синтазы, вызванная седмидневым 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 $3,06 \pm 0,32$ ($p < 0,05$) (таблица). 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 $2,35 \pm 0,21$ 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. 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 наблюдалась нормализация взаимоотношения вазодилатирующих и вазоконстрикторных реакций, о чем свидетельствует снижение КЭД до $1,56 \pm 0,13$. Кроме этого 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 по сравнению с группой нелеченых животных ($p < 0,05$), однако целе-

вого уровня она не достигала (табл. 1). 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 воспроизведением эпизодов ишемии-реперфузии выявило выраженную положительную динамику гистологической картины, которая заключалась в относительно равномерном кровенаполнении спонгиозного слоя, отсутствии повреждения слоя гигантского трофобласта и децидуальной оболочки.

Влияние коротких эпизодов ишемии-реперфузии задних конечностей и блокады iNOS аминоксидом на показатели L-NAME-индуцированного гестоза ($M \pm m$; $n = 10$)

Показатель	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	КЭД, усл. ед.	Микроцирку- ляция ПЕ	Концентрация нитритионов (NOx), мкмоль/дл
Группа					
Интактные	$125,0 \pm 6,3^y$	$82,0 \pm 5,8^y$	$1,28 \pm 0,23^y$	$425,9 \pm 39,6^y$	$2,35 \pm 0,21^y$
L-NAME	$183,1 \pm 9,4^*$	$136,7 \pm 7,4^*$	$3,06 \pm 0,32^*$	$210,0 \pm 21,1^*$	$1,33 \pm 0,09^*$
L-NAME + ишемия-реперфузия	$141,6 \pm 5,5^y$	$104,2 \pm 5,7^y$	$1,56 \pm 0,13^y$	$339,6 \pm 20,4^y$	$1,92 \pm 0,18^y$
L-NAME + ишемия-реперфузия + аминоксид	$181,3 \pm 4,6^*$	$133,5 \pm 3,3^*$	$2,34 \pm 0,09^y$	$256,8 \pm 24,6^*$	$1,31 \pm 0,06^*$

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.

Блокада аминоксидом iNOS практически полностью снимала положительные эффекты коротких эпизодов ишемии-реперфузии при коррекции морфофункциональных нарушений при ADMA-подобном гестозе. Только уровень КЭД оставался статистически ниже группы нелеченных животных.

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 8-е сутки развивалась выраженная гипертензия, в 3 раза увеличивался коэффициент эндотелиальной дисфункции, происходили 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.

Временной промежуток защитного эффекта «отсроченной» фазы или «позднего ишемического прекодиционирования», по данным разных авторов, колеблется от 12 до 96 часов [13, 14]. Во время отсроченной фазы ишемического прекодиционирования происходит активация генома, что приводит в том числе и к индукции синтеза оксида азота [12]. Этим объясняется

улучшение функции эндотелия в эту фазу. Устранение положительных эффектов коротких эпизодов ишемии-реперфузии аминоксидом свидетельствует о важной роли в их механизме iNOS.

Выводы

Таким образом, результаты проведенного эксперимента дают основания для предположения важной роли iNOS в реализации положительных эффектов коротких эпизодов ишемии-реперфузии в коррекции морфофункциональных нарушений при ADMA-подобном гестозе. Предположительно, для реализации положительного эффекта может существовать 2 пути: прямая и опосредованная эндотелиопротекция. 1 – компенсирование недостатка NO за счет активации iNOS. 2 – уменьшение ишемических явлений в плацентарной ткани за счет феномена ишемического прекодиционирования. При этом происходит уменьшение выброса плацентой в кровоток гуморальных факторов, приводящих к развитию эндотелиальной дисфункции.

Список литературы

1. Возможности фармакологической коррекции хронической ишемии конечности в эксперименте / Е.Б. Артюшкова, Д.В. Пашков, М.В. Покровский и др. // 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 прекодиционированием эндотелиальной дисфункции при адма-подобном экспериментальном гестозе // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2011. – № 4 (123). – С. 128–134.
4. Коррекция АДМА-подобного гестоза в эксперименте / В.В. Гуреев, С.А. Алехин, А.А. Должиков, А.С. Мостовой // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2012. – №1. – С. 14–19.
5. Гуреев В.В., Полянская О.С., Должиков А.А. Коррекция АДМА-подобного гестоза в эксперименте с помощью ингибитора аргиназы L-норвалина и препаратов, входящих в стандартную схему лечения // Человек и его здоровье. – 2012. – №2. – С. 14–20.
6. Зайнулина М.С., Петрищев Н.Н. Эндотелиальная дисфункция и ее маркеры при гестозе // Журнал акушерства и женских болезней – 1997. – № 3. – С. 18–22.
7. 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.
8. Кулаков В.И., Мурашко Л.Е., Бурлёв В.А. Клинико-биохимические аспекты патогенеза гестозов // Акуш. и гинекол. – 1995. – № 6. – С. 3–5.
9. Эндотелиальная дисфункция при гестозе. Патогенез, генетическая предрасположенность, диагностика и профилактика: метод. рекомендации / Е.В. Мозговая, О.В. Малышева, 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. Фармакологическая коррекция АДМА-eNOS-ассоциированных мишеней при преэклампсии / М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, В.В. Гуреев и др. // Акушерство и гинекология. – 2011. – № 2. – С. 16–20.
12. Kloner R.A., Jennings R.B. Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning, and Their Cliniccoавт Implications. Part 2 Circulation. – 2001. – №104. – P. 3158–3167.
13. 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.
14. Rezkalla S.H., Kloner R.A. Preconditioning in humans // Heart Fail Rev. – 2007. – №12. – P. 201–206.
2. Gureev V.V. Endothelial dysfunction –is the central item in the pathogenesis of preeclampsia // Scientific Statement of Belgorod State University. 2011. no. 4 (123). pp. 5–12.
3. Gureev V.V., Pokrovskiy M.V., Dolzhikov A.A. et al. Correction of endothelial dysfunction by distant ischemic preconditioning in experimental adma- preeclampsia // Scientific Statement of Belgorod State University. 2011. no. 4 (123). pp. 128–134.
4. Gureev V.V., Aleochkin S.A. Dolzhikov A.A., Mostovoy A.S. Correction of АДМА- preeclampsia in the experiment // Kursk Scientific Practical Journal «Man and his health». 2012. no. 1. pp. 14–19.
5. Gureev V.V., Polyanskaya O.S., Dolzhikov A.A. Correction of АДМА-preeclampsia in experiment by arginase inhibitor L-norvaline and other drugs from the standard scheme of treatment // Kursk Scientific Practical Journal «Man and his health». 2012. no. 2. pp. 14–20.
6. Zaynulina M.S., Petrishev N.N. Endothelial dysfunction and it's markers in preeclampsia // Journal of Obstetrics and women's diseases. 1997. no. 3. pp. 18–22.
7. Korokin M.V., Pokrovskiy M.V., Novikov O.O. et al. Effect of L-arginine, vitamin B6 and folic acid on parameters of endothelial dysfunction and placenta microcirculation in modeling of L-NAME-induced deficiency of nitric oxide // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2011. Vol. 152. no. 7. pp. 77–80.
8. Kulakov V.I., Murashko L.E., Burleov V.A. Clinical and biochemical aspects of the pathogenesis of preeclampsia // Obstetrics and Gynaecology. 1995. no. 6. pp. 3–5.
9. Mozgovaya E.V., Malisheva O.V., Ivashenko T.E. et al. Endothelial dysfunction in preeclampsia. Pathogenesis, genetics, diagnosis and prevention: Method. recommendations. SPb., 2003.
10. Pokrovskiy M.V., Kotchkarov V.I., Pokrovskaya T.G. et al. Methodological approaches to quantified estimation of endothelial dysfunction development in L-NAME-induced model of nitric oxide deficiency in the experiment // Cuban scientific. med. vestn. 2006. no. 10 (91). pp. 72–77.
11. Pokrovskiy M.V., Pokrovskaya T.G., Gureev V.V. et al. Pharmacological correction of АДМА-eNOS-associated targets in preeclampsia // Obstetrics and Gynecology. 2011. no. 2. pp. 16–20.
12. Kloner R.A., Jennings R.B. Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning, and Their Cliniccoавт Implications. Part 2 Circulation. 2001. 104. pp. 3158 – 3167.
13. Kuzuya T., Hoshida S., Yamashita N., et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. Circ Res. 1993. 72. pp. 1293–1299.
14. Rezkalla S.H., Kloner R.A. Preconditioning in humans // Heart Fail Rev. 2007. 12. pp. 201 – 206.

References

1. Artuyshkova E.B., Pashkov D.V., Pokrovskiy M.V. et al. Possibility of pharmacological correction of chronic limb ischemia in the experiment // Exper. and clinical. Pharmacology. 2008. Vol. 71. no. 3. pp. 23–25.

Рецензенты:

Покровский М.В., д.м.н. профессор, зав. кафедрой фармакологии и фармацевтических дисциплин ИПМО НИУ БелГУ;

Пахомов С.П., д.м.н. профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии НИУ БелГУ.

Работа поступила в редакцию 10.09.2012.