

РОЛЬ АТФ-ЗАВИСИМЫХ К⁺ КАНАЛОВ 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, Россия (305041, Курск, ул. К. Маркса,3), e-mail: kurskmed@mail.ru

Моделирование экспериментального АДМА-подобного гестоза осуществляли путем введения крысам L-NAME с 14 по 20 сутки беременности. У животных наблюдалось 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 предотвращении деструктивных явлений в плаценте по сравнению с группой не леченных животных. Введение блокатора АТФ-зависимых К⁺ каналов – глибенкламида 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 не леченных животных. Приведенные данные позволяют говорить о значительной роли АТФ-зависимых К⁺ каналов 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, глибенкламид.

ROLE OF ATP SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS 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, Russia (305041, Kursk, K. Marks str. 3), 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 morpo-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 ATP sensitive potassium channels blocker – glibenclamide 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 ATP sensitive potassium channels in the implementation of positive effects of short ischemia-reperfusion episodes in a correction of morpo-functional changes at ADMA-like preeclampsy in rats.

Key words: rats, preeclampsy, L-NAME, treatment, ischemical preconditioning, glibenclamide.

Введение

Несмотря на значительные достижения в диагностике и лечении гестоза, он по-прежнему остается грозным заболеванием второй половины беременности. По данным различных авторов, частота его встречаемости колеблется от 6 до 20 %. В структуре

материнской смертности гестоз занимает 2–3 место. 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. 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 прекондиционирования. 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 утверждать, о возможности реализации положительных эффектов коротких эпизодов ишемии-реперфузии за счет биологических процессов, протекающих при феномене ишемического прекондиционирования, как это предполагалось изначально. Ключевым моментом механизма реализации противоишемического эффекта феномена ишемического прекондиционирования является активация АТФ-зависимых K^+ каналов, поэтому выяснение их роли в коррекции морфофункциональных нарушений короткими эпизодами ишемии-реперфузии 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 при АДМА-подобном гестозе в эксперименте.

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) [5, 9]. 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 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. 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 «Віорас 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 $3,06 \pm 0,32$ ($p < 0,05$) (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 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 не леченных животных ($p < 0,05$), однако целевого 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.

Таблица № 1

Влияние коротких эпизодов ишемии-реперфузии задних конечностей на фоне введения глибенкламида на коррекцию L-NAME-индуцированного гестоза ($M \pm m$; $n=10$)

Показатель / Группа	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 [*]

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 при коррекции морфофункциональных нарушений при ADMA подобном гестозе. Только уровень КЭД оставался статистически ниже группы не леченных 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, 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], который посредством ряда внутриклеточных мессенжеров 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.

Выводы

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

Список литературы

1. Артющкова 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 прекондиционированием 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.
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 ADMA-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 Clinicsoавт Implications. Part 2 Circulation. 2001; 104: 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; 72:1293–1299.

12. Rezkalla S. H., Kloner R. A. Preconditioning in humans // Heart Fail Rev. – 2007. – 12: 201 - 206.

Рецензенты:

Покровский Михаил Владимирович, д.м.н., профессор зав. кафедрой фармакологии и фармацевтических дисциплин ИПМО НИУ БелГУ, г. Белгород.

Пахомов Сергей Петрович, д.м.н., профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии НИУ БелГУ, г. Белгород.