

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АДМА-ПОДОБНОЙ ПРЕЭКЛАМПСИИ И ГИПОПЕРФУЗИИ В ПЛАЦЕНТЕ

Анциферова О.Е.¹, Локтева Т.И.¹, Должиков А.А.¹, Гуреев В.В.¹

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, Белгород, e-mail: AnciferovaO@ya.ru

В работе представлены результаты сравнительного исследования морфофункциональных нарушений, возникающих при моделировании АДМА-подобной преэклампсии и гипоперфузии матки. Моделирование у крыс АДМА-подобной преэклампсии характеризуется подъемом артериального давления, эндотелиальной дисфункцией, протеинурией, снижением микроциркуляции в плаценте, повышением содержания жидкости в большом сальнике, нарушением развития плода. Моделирование гипоперфузии матки у крыс приводило к нарушению микроциркуляции в плацентах, уменьшению массы и роста плодов, а также к постимлантационной гибели плодов. В материнском организме наблюдалось повышение артериального давления, нарушение функции эндотелия. Полученные данные дополняют общее представление о патогенезе преэклампсии и плацентарной недостаточности. Оба моделируемых варианта патологии могут быть использованы на доклинических этапах разработки новых лекарственных препаратов для коррекции и лечения преэклампсии и плацентарной недостаточности.

Ключевые слова: крысы, преэклампсия, плацентарная недостаточность, АДМА, эндотелиальная дисфункция, ишемия плаценты, гипоплазия плодов.

COMPARATIVE STUDY MORFOFUNKCIONALNOE VIOLATIONS IN MODELING АДМА-SUCH PREECLAMPSIA AND PLACENTAL HYPOPERFUSION

Anciferova O.E. ¹, Lokteva T.I. ¹, Dolghikov A.A. ¹ Gureev V.V. ¹

¹- Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod National Research University», Belgorod, e-mail: AnciferovaO@ya.ru

The paper presents the results of a comparative issledovaniyea morphological and functional disorders arise when modeling АДМА-like pre-eclampsia and uterine hypoperfusion. Simulation АДМА in rats - like preeclampsia is characterized by the rise of blood pressure, endothelial dysfunction, proteinuria, a reduction in the microcirculation of the placenta, the increase in fluid content greater omentum, disturbance of development of the fetus. Simulation of uterine hypoperfusion in rats led to disruption of the microcirculation in the placenta, decreased weight and fetal growth, as well as to postimplantation fetal death. The mother's body was observed increase in blood pressure, endothelial dysfunction. The findings complement a basic understanding of the pathogenesis of preeclampsia and placental insufficiency. Both simulated version of the pathology can be used in pre-clinical stages of development of new drugs for the correction and treatment of preeclampsia and placental insufficiency.

Keywords: rat, preeclampsia, placental insufficiency, of АДМА, endothelial dysfunction, ischemia of the placenta, fetal hypoplasia.

Преэклампсия 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 плодными частями [1, 8]. Происходит неполная инвазия цитотрофобласта в спиральные артерии матери. Уровень перестройки самих спиральных артерий при

преэклампсии не достигает уровня при нормальной беременности [7]. Увеличенное пространство между спиральными артериями и ворсинами хориона, а также незрелость самих спиральных артерий приводит к ишемии трофобласта и повышению проницаемости фетоплацентарного барьера.

Образовавшиеся гуморальные факторы в ответ на ишемию, а также, возможно, антигены плода, прошедшие через фетоплацентарный барьер с повышенной проницаемостью, при попадании в организм матери провоцируют накопление в плазме ассиметричного диметиларгинина (ADMA), развитие генерализованной эндотелиальной дисфункции, вторичных ишемических явлений и оксидативного стресса [10]. В связи с этим, актуальность приобрело направление поиска новых лекарственных препаратов для лечения и профилактики преэклампсии, обладающих эндотелиопротективной, противоишемической, антиоксидантной активностью [1, 4]. Однако прямых данных о влиянии гуморальных факторов выделяемых ишемизированной плацентой на развитие плода и здоровые участки плаценты в доступной литературе приведено не много. В связи с этим, представленная работа посвящена исследованию морфофункциональных нарушений, возникающих при моделировании гипоперфузии матки.

Цель исследования: изучить особенности системной гемодинамики, состояние плаценты и развитие плодов при моделировании гестоза второй половины беременности.

Материал и методы исследования

Эксперимент выполнен на 40 белых крысах-самках линии Wistar массой 250–300 г. Для формирования групп беременных животных с заданными сроками, находящихся на отдельном содержании, к самкам (3 животных) подсаживали самцов (2 животных) на 24 часа. Затем животных рассаживали и через 14 суток в условиях эфирного сна пальпаторно определяли наличие беременности. В наших экспериментах беременность наступала в 30–40 %. Беременные самки были разделены на группы (n=10): I – интактные; II – с моделированием на 14 сутки беременности гипоперфузии обеих рогов матки; III – с моделированием на 14 сутки беременности гипоперфузии правого рога матки. На 14 день гестации для получения гипоперфузии обеих рогов матки у 10 животных проводили наложение серебряных клипс на брюшную аорту выше бифуркации (0,2 мм) и на обе яичниковые артерии (0,1 мм) (7, 9). Гипоперфузию правого рога матки получали у 10 животных путем наложения серебряных клипс на правую подвздошную артерии (0,1 мм) и на правую яичниковую артерию (0,1 мм). ADMA-подобную преэклампсию моделировали путем введения неселективного блокатора NO-синтазы N-нитро-L-аргинин-метилового эфира (L-NAME) внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг/сут в течение семи дней (14–20 сутки беременности) [1, 4].

На 21 сутки беременности под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в правую сонную артерию для регистрации показателей систолического и диастолического артериального давления (САД, ДАД), болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в правую бедренную вену. Проводили сосудистые пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию и эндотелийнезависимую вазодилатацию с расчетом коэффициента эндотелиальной дисфункции (КЭД) [4, 6].

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, 2]. Для исследования содержания жидкости в большом сальнике производили его взвешивание с последующим высушиванием при 37 °С в течение 24 часов и повторным взвешиванием [5].

Морфологическое исследование патологических нарушений, возникающих при моделируемых патологических процессах, проведено гистологическое исследование почек и плаценты. После выведения животных из эксперимента в поперечном направлении иссекали участки рогов матки с плацентой и плодными оболочками. Почки забирались полностью. Фиксацию материала осуществляли в 10 % растворе формалина в течение 24 часов. Подготовка образцов для гистологического исследования и изготовление микропрепаратов проведены с применением сертифицированного оборудования фирмы Leica (Германия). После фиксации производили вырезку кусочков толщиной 3 мм в вертикальном (поперечном) направлении через середину плацентарного диска с захватом стенки рога матки в месте имплантации. Рассечение почек производилось через лоханку перпендикулярно центральной оси органа. Кусочки заливали в стандартном режиме в парафин через батарею из этилового спирта и ксилола в автомате карусельного типа TP-1020 с использованием батареи из этилового спирта и ксилола. Заливку блоков со стандартной ориентацией кусочков осуществляли на станции для заливки биологического материала в парафин EG1150H с охлаждающим модулем EG1150C. Срезы для гистологического исследования толщиной 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме RM2245 с использованием одноразовых ножей. Срезы для стандартного гистологического исследования окрашивали гематоксилином и эозином в автомате для окраски гистологических срезов и мазков (Leica Autostainer XL (ST5010), Германия).

Описательное исследование гистологических препаратов выполняли под микроскопом Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Германия). Основная часть морфологического исследования выполнена после создания электронной галереи

изображений с помощью полуавтоматического сканера микропрепаратов Mirax Desk (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Германия), что позволяет максимально стандартизовать режимы морфометрического исследования, а также с помощью микроскопа «Leica DM 4000 B», оснащенного комплексом для видеорегистрации изображений и пакетом программного обеспечения для морфометрии.

Результаты исследования и их обсуждение

При введении ADMA-подобного агента – L-NAME беременным самкам (25 мг/кг однократно в сутки с 14 по 20 сутки беременности) на 21-е сутки мы наблюдали развитие патологии, по своим проявлениям соответствующей критериям клинических проявлений гестоза. Происходило статистически значимое повышение систолического и диастолического АД с $134,5 \pm 2,3$ и $92,0 \pm 2,1$ до $186,3 \pm 7$ и $145,0 \pm 5,0$ мм рт. ст., соответственно и увеличение КЭД с $1,1 \pm 0,11$ до $3,12 \pm 0,17$ ($p < 0,05$) (таблица).

Значение уровня микроциркуляции в плаценте интактных беременных крыс на 21 сутки составляло $446,3 \pm 27,5$ ПЕд (перфузионных единиц). При моделировании ADMA-подобного гестоза, обнаружено ее существенное снижение до $218,3 \pm 13,7$ ПЕд. У интактных беременных крыс 12-часовой диурез составил $5,8 \pm 0,3$ мл, что соответствовало нормальным показателям у животных массой 250–300 г при протеинурии, значения которой соответствовали $0,93 \pm 0,06$ г/л, т.е. до 1,0 г/л. Введение L-NAME не оказывало существенного влияния на 12-часовой диурез. При анализе мочи обнаружено умеренно выраженное увеличение протеинурии со значениями $2,04 \pm 0,22$ г/л ($p < 0,05$). Однако нужно отметить, что при измерении микроциркуляции в почечной ткани статистически достоверной разницы между группой интактных беременных животных и животных с моделируемым ADMA-подобным гестозом не наблюдалось.

Исследование NO-продуцирующей функции эндотелия показало, что моделирование L-NAME-индуцированного дефицита NO приводило к резкому снижению экспрессии eNOS и содержания нитрит-ионов (NOx) соответственно в 1,8 и 1,7 раза (таблица).

Гистологическая картина почек у интактных беременных крыс (21 сутки беременности) была следующей: клубочки умеренно полнокровны, базальная мембрана не утолщена, воспалительные изменения в интерстиции клубочков и пирамид отсутствуют; спастические и гипертрофические изменения мелких артерий и артериол не обнаружены. Плацента крыс на 21 сутки беременности без признаков повреждения (рис. 1).

У крыс с ADMA-подобной преэклампсией обнаружено увеличение содержания жидкости в тканях большого сальника с $49,89 \pm 0,82$ % до $58,09 \pm 1,73$ % ($p < 0,05$). В почечных клубочках выявлены признаки ишемического повреждения в виде их малокровия, а также дистрофические изменения базальной мембраны капилляров клубочков с её утолщением в

виде проволочных петель. Заметной реакции мезангия не отмечалось: среднее количество клеток на клубочек составило $39,20 \pm 2,99$ (в норме $40,70 \pm 3,80$). Описанные изменения гломерулярного аппарата могут объяснять имеющуюся у крыс данной группы гиперфильтрацию с выраженной протеинурией. В мелких артериях и артериолах отмечались спазм и выраженная гипертрофия стенок.

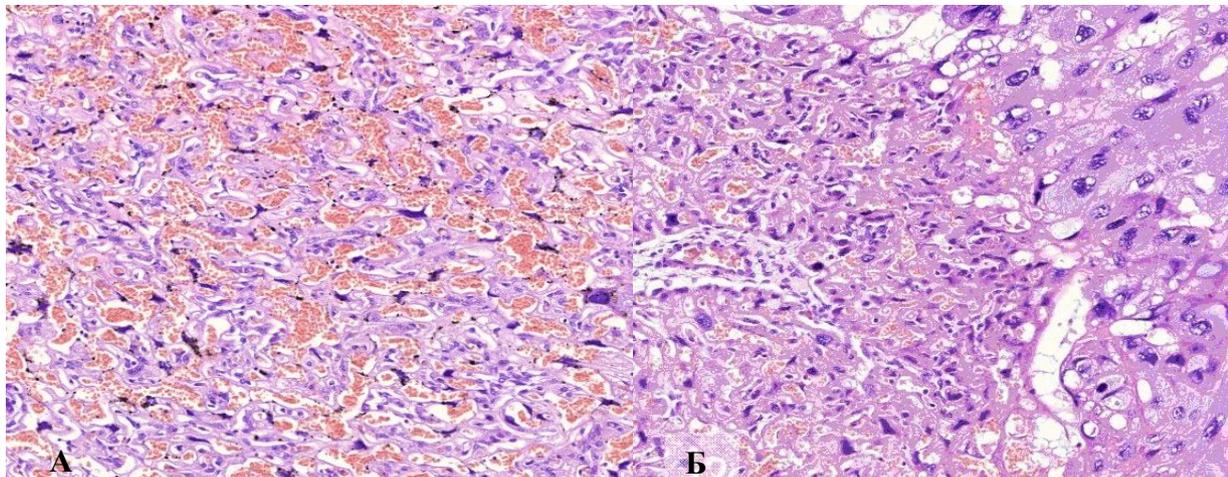


Рис. 1. Строение intactной плаценты, структура спонгиозного (ворсинчатого) слоя (а) и пограничного участка между ворсинами и слоем гигантоклеточного трофобласта (б) плаценты intactных животных: равномерное кровенаполнение капилляров ворсин и межкапиллярных пространств, относительно мономорфная структура трофобласта, непрерывность перехода от ворсинчатого слоя в трофобластический слой; Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото. X 200

Морфологическая картина плаценты при ADMA-подобном гестозе проявлялась в виде ишемии ворсин и интервиллезных пространств и сращиванием эндотелия в сосудах плаценты (рис. 2). В отдельных случаях это приводило к появлению очагов некроза децидуальных клеток в ткани плаценты. На внешней поверхности плаценты наблюдали массивные отложения фибрина.

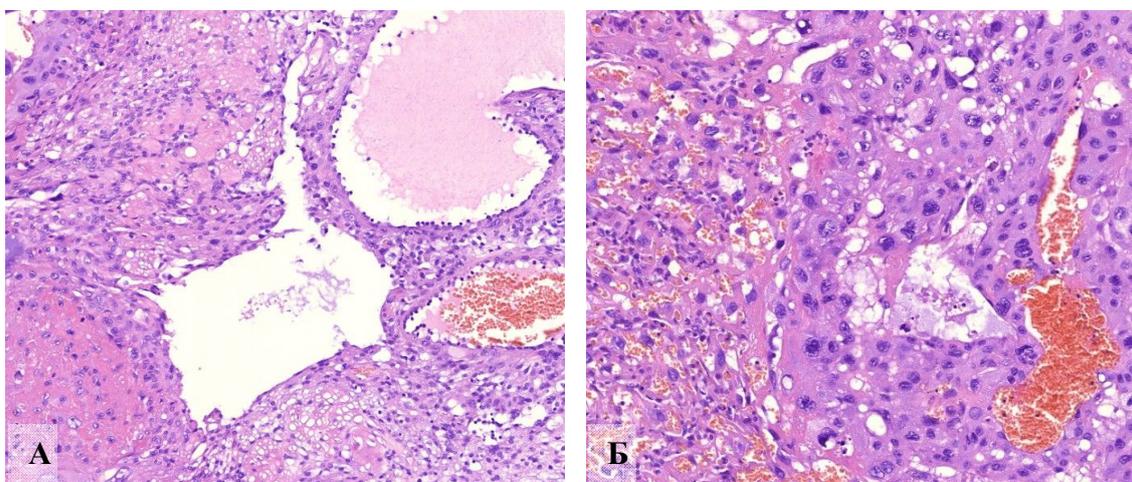


Рис. 2. Патологические изменения в плаценте при моделировании ADMA-подобного гестоза. А – неравномерное кровенаполнение спонгиозного слоя; Б – вакуольная дистрофия гигантоклеточного трофобласта; очаги некроза на

*границе гигантоклеточного трофобласта и децидуальной ткани;
дистрофические изменения, малокровие децидуального слоя. Окр.
гематоксилином и эозином. Микрофото. X 200*

Наложение серебряных клипс выше бифуркации аорты и на 2 яичниковые артерии приводило к подъему артериального давления до $155,4 \pm 3,6$ и $109,3 \pm 5,7$ мм рт. ст. Коэффициент эндотелиальной дисфункции повышался до $2,02 \pm 0,23$ ($p < 0,05$). Кроме этого происходило снижение микроциркуляции в плаценте обоих рогов матки до $229,7 \pm 9,9$ при $446,3 \pm 27,5$ ПЕд у интактных беременных самок. Моделирование снижения кровотока в обеих рогах матки приводило к статистически значимому по сравнению с интактными беременными животными повышению протеинурии до $1,34 \pm 0,11$ г/л ($p < 0,05$).

Исследование NO-продуцирующей функции эндотелия у животных с редуцированным кровотоком в обоих рогах матки показало отсутствие статистически значимой разницы экспрессии eNOS в эндотелии и концентрации конечных метаболитов NO в плазме крови по сравнению с беременными интактными животными.

При моделировании редуцированного кровотока в обоих рогах матки в плаценте наблюдались ярко выраженные изменения ишемического генеза (рис. 3).

Наложение клипс на артерии, кровоснабжающие только правый рог матки, приводило к снижению микроциркуляции в плаценте правого рога до $204,4 \pm 14,3$ и до $309,0 \pm 15,8$ ПЕд в левом роге матки ($p < 0,05$). Статистически значимого изменения артериального давления, КЭД, диуреза, протеинурии и NO-синтезирующей функции эндотелия у этих животных не выявлено.

При моделировании редуцированного кровотока в правом роге в плацентах правого рога матки возникали изменения ишемического генеза, и морфологическая картина принципиально не отличалась от состояния плацент у группы животных с моделированием редуцированного кровотока в обоих рогах матки.

Интегральная характеристика балльной оценки изменения морфологических показателей при моделировании АДМА-подобного гестоза и моделирования редуцированного кровотока в матке представлена в таблице.

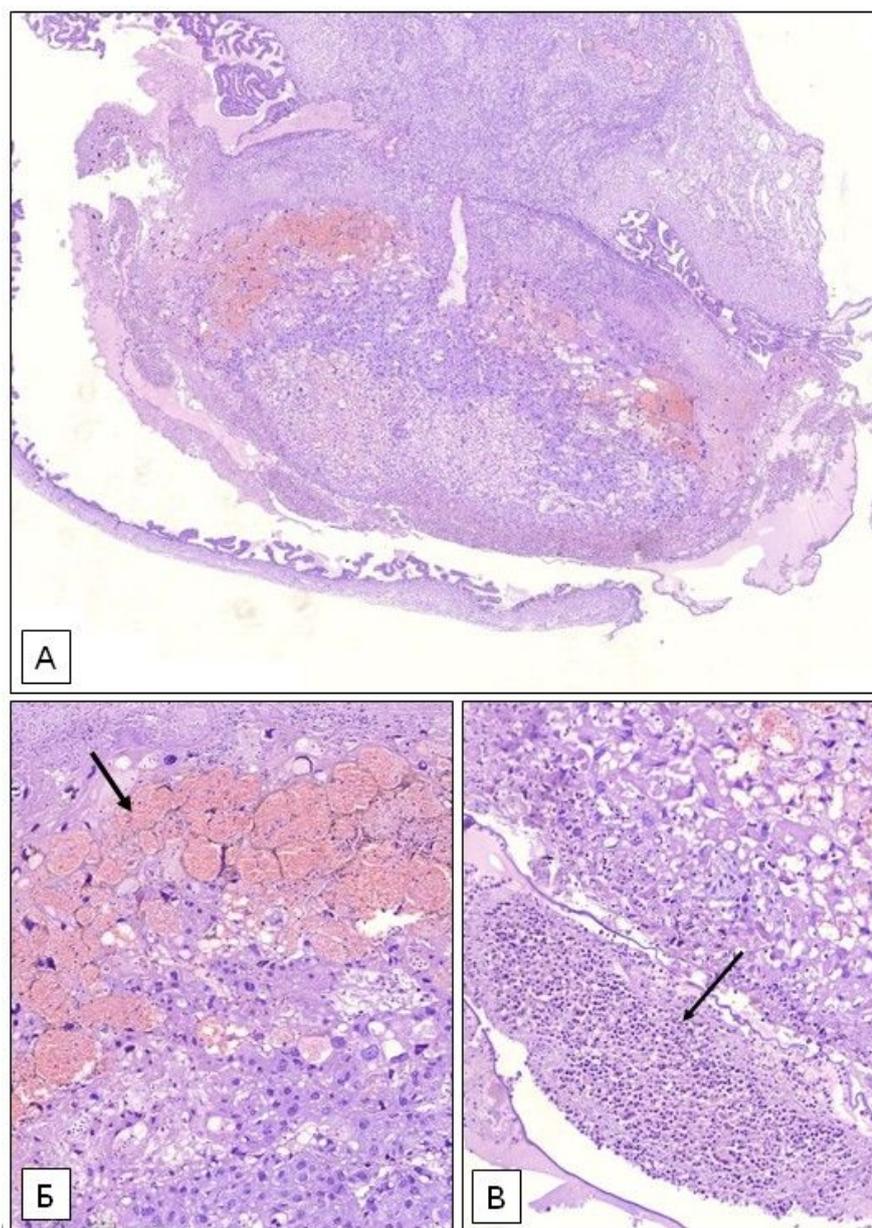


Рис. 3. Патоморфологические изменения плаценты при ишемии. А – общий вид с обширными некрозами и кровоизлияниями в лабиринтной зоне (ЛЗ), Б – некрозы и геморрагические озера в ЛЗ, Б – крупный очаг гнойного децидуита, расслоение тканей на границе плаценты и стенки матки. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото. X50 (А), X200 (Б, В)

Значения морфофункциональных показателей у беременных крыс при моделировании АДМА-подобного гестоза и редуцированного кровообращения в матке ($M \pm m$; $n=10$)

Показатель \ Группа	Беременные интактные	Беременные + L-NAME	Беременные (редуцированный кровотоков в 2х рогах матки)	Беременные (редуцированный кровотоков в правом роге матки)
САД, мм рт. ст.	$134,5 \pm 2,3^y$	$186,3 \pm 7^*$	$155,4 \pm 3,6^*$	$138,8 \pm 4,4^y$
ДАД, мм рт. ст	$92,0 \pm 2,1^y$	$145,0 \pm 5,0^*$	$109,3 \pm 5,7^*$	$89,8 \pm 5,8^y$
КЭД, усл. ед.	$1,10 \pm 0,11^y$	$3,12 \pm 0,17^*$	$2,02 \pm 0,23^*$	$1,29 \pm 0,08^y$

Микроциркуляция, пер. ед.	446,3±27,5 ^y	218,3±13,7 [*]	229,7±9,9 [*]	204,4±14,3 ^{*R} 309,0±15,8 ^{*yL}
NOx, мкмоль/дЛ	2,28±0,11 ^y	1,28±0,08 [*]	2,12±0,11 ^y	2,15±0,09 ^y
eNOS, %	113,2±5,1 ^y	68,5±3,3 [*]	104,5±6,6 ^y	105,4±3,2 ^y
Комплексная оценка патоморфологических изменений, в баллах	0-1	5-6 [*]	5-6 [*]	5-6 ^{*P} 0-1 ^L
Содержание жидкости в тканях б. сальника, %	49,89±0,82 ^y	58,09±1,73	52,86±2,66	48,78±2,00 ^y
Масса плодов, г	1,73±0,06 ^y	1,52±0,06 [*]	1,16±0,04 [*]	1,13±0,06 ^{*R} 1,31±0,08 ^{*L}
Рост плодов, мм	24,59±0,42 ^y	22,91±0,34 [*]	20,10±0,27 [*]	20,89±0,45 ^{*R} 22,90±0,45 ^{*L}
Рост/вес, мм/г	14,91±0,28 ^y	15,93±0,31 [*]	18,25±0,55 [*]	19,36±0,76 ^{*R} 18,63±0,68 ^{*L}
Постимплантационная гибель, %	0	0	36,53±2,86 [*]	34,16±3,37 ^{*R} 18,66±5,66 ^{*L}

Примечание: *– при $p < 0,05$ в сравнении с интактными беременными крысами; ^y–при $p < 0,05$ в сравнении с беременными крысами с L-NAME, R-микроциркуляция в правом роге матки, L-микроциркуляция в левом роге матки.

Выводы

Таким образом, комплексный анализ морфофункциональных изменений при моделировании различных патологий беременных позволяет сделать вывод о том, что ADMA-подобная модель наиболее приближена к гестозу второй половины беременности. В пользу этого свидетельствуют: повышение артериального давления, нарушение взаимоотношения вазоконстрикторных и вазодилатирующих механизмов, снижение микроциркуляции в плаценте, повышение протеинурии, нарушение NO-синтезирующей функции эндотелия, комплекс морфологических изменений в почках и плаценте, что послужило причиной использования ее как базовой модели.

Список литературы

1. Гуреев В.В. ADMA – eNOS – детерминированные пути фармакологической коррекции гестоза / В.В. Гуреев, М.В. Покровский, М.В. Корокин и др. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2014. – 265 с.; ил.
2. Гуреев В.В. Роль iNOS в коррекции эндотелиальной дисфункции при ADMA-подобном гестозе короткими эпизодами ишемии-реперфузии в эксперименте // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 8–2. – С. 298–301.

3. Гуреев В.В. Роль АТФ-зависимых K^+ каналов в коррекции эндотелиальной дисфункции при АДМА-подобном гестозе короткими эпизодами ишемии-реперфузии в эксперименте // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5, <http://www.science-education.ru/105-7053>.
4. Гуреев В.В., Жилинкова Л.А., Ступакова Е.Г. Коррекция эндотелиальной дисфункции никорандилом, тетрагидробиоптерином и резвератролом при моделировании экспериментального гестоза // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1-1. – С. 58–62.
5. Иванова Л.Б. Влияние производных ГАМК на функцию эндотелия крыс с экспериментальным гестозом / Л.Б. Иванова, В.И. Карамышева, В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков // Проблемы репродукции. – 2012. – № 1. – С. 28–30.
6. 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.
7. Crocker I Gabor Than Award Lecture 2006: pre-eclampsia and villous trophoblast turnover: perspectives and possibilities // Placenta. – 2007 - Apr; 28 Suppl A: S4 - 13.
8. Ducray J.F., Naicker T., Moodley J. Pilot study of comparative placental morphometry in pre-eclamptic and normotensive pregnancies suggests possible maladaptations of the fetal component of the placenta. // European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology. 2011 May; 156 (1):29-34.
9. Endothelin type A receptor antagonist attenuates placental ischemia-induced hypertension and uterine vascular resistance / К.В. Tam Tam, E. George, K. Cockrell [et al.] // Am J Obstet Gynecol. – 2011. – Vol. 204: 330. – P. 331–e334.
10. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction / J.S. Gilbert, M.J. Ryan, B.B. LaMarca [et. al.] / Am J Physiol Heart Circ Physiol 294: H541–H550, 2008. First published November 30, 2007; doi:10.1152/ajpheart.01113.2007.