

**Тбилисский государственный медицинский университет**

*На правах рукописи*

**Тинатин Хецуриани**

**РОЛЬ ОКСИГЕННОГО СТРЕССА И  
 $\sigma_1$ -РЕЦЕПТОРОВ В РАЗВИТИИ ПРЕЭКЛАМПСИИ И ЕЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ  
ЛЕЧЕНИЕ**

14. 00. 16 – Патофизиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации, представленной на соискание

ученой степени доктора медицинских наук

**Тбилиси  
2006**

Труд выполнен в Тбилисском государственном медицинском университете

**Научные  
консультанты:**

- **Мерабишвили Нино**, доктор медицинских наук, профессор;
- **Саникидзе Тамара**, доктор биологических наук, профессор;
- **Бахуташвили Владимир**, доктор медицинских наук, профессор.

**Официальные  
оппоненты:**

- **Маисурадзе Нино**, доктор медицинских наук, профессор (14.00.16);
- **Херодинашвили Давид**, доктор медицинских наук, профессор

(14.00.01);  
- **Павлиашвили Наталья**, доктор  
медицинских наук, профессор  
(14.00.16).

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ 2006 года \_\_\_\_\_ ч., на заседании диссертационного совета м 14.16 №6 Тбилисского государственного медицинского университета (0160, Тбилиси, пр. Важа-Пшавела N29).

Ознакомиться диссертацией можно в библиотеке Тбилисского государственного медицинского университета (0160, Тбилиси, пр. Важа-Пшавела N29).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2006 года

Ученый секретарь диссертационного  
совета, кандидат медицинских наук,  
доцент -

Н.Бежиташвили

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность проблемы:**

Организм беременных и плода особенно чувствителен к воздействию различных стресс-факторов окружающей среды. Воздействие повреждающих агентов вызывает нарушение фетоплацентарного гомеостаза, обмена веществ, функций тканей и органов, развитие ранних и поздних токсикозов беременности, недонашиваемости, мертворождение (Jekson A.A. et al., 2003, Kkintraia N., 2003). Именно этим обусловлен особый интерес к причинам и механизмам развития патологий беременности (Coyswell M.E. et. al., 2003, King J. C. 2003, Niggers Y., Golobnberg R.L., 2003, Gluckman P.J., Pinal C.S, 2003, Fall C.H.D. et al. 2003). Все сказанное в равной мере относится к одному из самых частых и тяжелых осложнений беременности, преэклампсии.

Преэклампсия – специфический синдром, который клинически проявляется после 20 недель беременности повышенным артериальным давлением, протеинурией, и отеком. Преэклампсия встречается у 2-7%-ов беременных и является основной причиной смертности рожениц в США и Западной Европе. Несмотря на значительные успехи, достигнутые при исследовании этиологии и патогенеза преэклампсии, усовершенствование методов лечения, вокруг этой патологии до сих пор остается множество неразрешенных вопросов, требующих неотложного изучения.

Многочисленные факты свидетельствуют о том, что клинические проявления преэклампсии, изменения реактивности кровеносных сосудов, включая ангиоспазм и мультиорганную патологию, обусловлены развитием патологических изменений в эндотелии кровеносных сосудов (Hang T.H. et al 2002, Redwan G.W.G. et. al. 2000, Hubel C.A 2000). Высказано предположение, что

в развитии структурных и функциональных изменений эндотелия кровеносных сосудов наряду с генетическими, иммунологическими и диетическими факторами важную роль играют окислительный стресс и недостаточность оксида азота (Jauniaux E. et al 2000, Sugino N. et al 2000, Kankofer M. 2001, Haddan E,F. et al. 1997, Hung T. – H. et al. 2001, Chwalisz K. et al 1996., Huberl C.A. 1999). Считается, что последнее обстоятельство частично обусловлено преобразованием NO в пероксинитрит или же снижением активности NO-синтазы. Активность NO-синтазы (в особенности iNOS) зависит от различных факторов, в том числе от содержания холестерина, что указывает на важную роль этого соединения в становлении характерной для преэклампсии вазоконстрикции.

В то же время считают, что основным источником факторов, вызывающих дисфункцию эндотелия является плацента (Redman C.W. 1991). Гипоксия и окислительный стресс, развившиеся в плаценте под воздействием стрессорных факторов, способствуют ее физиологической дисфункции (как основного гормонпродуцирующего органа беременных), способствуют активации циклооксигеназы (COX-2), усиленному образованию простагландинов, тромбоксанов и эндотелина-1 (Walsh S.C. 1994, Walsh S.C., Wang Y., 1993), TNF- $\alpha$  (Bengo D.F. et al.1997, Redman C., Saks G., et al. 1999, Saks G., 1998). Эти соединения способны вызвать дисфункцию эндотелия в организме матери. В гипоксической плаценте в результате развития окислительного стресса уменьшается активность антиоксидантных ферментов (Takehara Y. et al. 1990, Sekiba K., et al. 1979, Pandey S. et al. 1995, Myattl et al. 1997), интенсивность образования NO (Lad J.A 1999, Voshimura T., et al. 2000, Bahimshi CS., 1999, Zhao Y., et al. 1999, Chen H., et al. 1999, Nipolitano M., 2000, (Zeislar H., et al, 2002).

Как известно, эстрогены активируют эндотелиальную eNOS (Hisamoto K. et al. 2000, Chen Z. et al, 1999), вызывают усиление экспрессии гена индуцибельной iNOS (Walsh L.S. et al 2003). E.

Svedas и соавторы (2002) показали, что в артериях изолированного миометриума беременных с преэклампсией 17-эстрадиол снижает базальный тонус кровеносных сосудов посредством воздействия на синтез NO.

Исходя из сказанного можно думать, что гипоксическое повреждение плаценты и развитие в ней окислительного стресса играет важную роль в патогенезе преэклампсии. Окислительный стресс способствует усиленному образованию вазоконстрикторов (тромбоксана, эндотелина и т. д.), снижению синтеза релаксантов (NO, простаглицина, и т.д.) и их стимуляторов – эстрогенов, повреждению эндотелия кровеносных сосудов, развитию ангиоспазма и нарушению фетоплацентарного кровообращения в организме матери. В этом процессе NO и эндотелин играют особо важную роль. Однако, литературные данные, касающиеся роли NO и эндотелина в патогенезе эклампсии весьма разнообразны, что обуславливает необходимость детального изучения этого вопроса.

Известно, что в патогенезе судорог, и в частности, судорог, сопутствующих эклампсии, важная роль принадлежит  $\sigma_1$  рецепторам. Они модулируют возбудимость пептидэргических терминалей нейрогипофиза посредством ингибирования ионного потока в  $K^+$ -потенциал-зависимых каналах (Wilk et al., 1999, Lapardes P.J., et al., 2000).  $\sigma_1$  рецепторы обнаружены в головном мозге и периферических органах, в том числе в плаценте. Они участвуют в регуляции многочисленных физиологических и патофизиологических процессов, биосинтезе эндогенных стероидных гормонов, эндокринного и иммунного ответа (Su, 1993, Bowen, 1993), моторной функции органов.  $\sigma_1$  рецепторы ингибируют выделение ишемия-индуцированного глутамата и увеличение постсинаптического потока ионов  $Ca^{2+}$ , регулируют нейронный ответ, обусловленный стимуляцией NMDA (N-methyl-D-aspartate) рецепторов, глутамат-стимулированную активность nNOS, цитотоксичность NO.

P.J. Luparlus и соавторы (2000) показали, что передача сигнала посредством  $\sigma_1$  рецепторов происходит не путем активации и фосфорилирования G-протеина, а ограничено мембраной и обеспечивается непосредственным взаимодействием с мембранными протеинами (анкирином). Этот механизм способствует передачи многочисленных вторичных сигналов. Существуют данные о том, что активация  $\sigma_1$  рецепторов стимулирует GTP-азу, возможно посредством NO-зависимого механизма. Соответственно, в патогенезе судорог при эклампсии вполне допустимо взаимодействие NO и  $\sigma_1$  рецепторов. В то же время существуют данные о подавляющем действии NO на судорожную активность (Башкатов В.Г., Раевский К.С., 1998, Maggio R., et al., 1995, Theard M.A.S., et al., 1993, Mulsch A., et al., 1994). Считается, что NO характеризуется защитным, противоконвульсивным действием до начала приступа и не действует во время генерализации припадка (Башкатов В.Г., Раевский К.С., 1998). Соответственно, характерная для преэклампсии недостаточность оксида азота, а также изменение активности  $\sigma_1$  рецепторов, возможно играют определенную роль в патогенезе судорог при эклампсии. В связи с этим интерес представляет исследование изменений активности  $\sigma_1$  рецепторов в плаценте и содержания эндогенного лиганда этих рецепторов, прогестерона в крови беременных женщин при физиологической и осложненной преэклампсией беременности.

Таким образом, анализ литературы показывает, что в патогенезе преэклампсии важную роль играют интенсификация окислительных процессов, изменение содержания оксида азота и  $\sigma_1$  рецепторов. Однако, на сегодняшний день место и роль этих параметров в патогенезе преэклампсии до конца не установлено. Не известно также происхождение механизмов, индуцирующих количественные изменения про- и антиоксидантных процессов NO и  $\sigma_1$  рецепторов. Для того, чтобы разобраться в этих вопросах необходимо глубокое изучение механизмов преэклампсии, и, в первую очередь, механизмов окислительно-восстановительных

реакций на клеточном и молекулярном уровне, установление механизмов изменения активности рецепторов и биологически активных веществ, участвующих в регуляции функции клеток, т. е. тех изменений, которые составляют патофизиологическую основу клинических проявлений преэклампсии.

### **Цель и задачи исследования.**

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования было установление изменений содержания оксида азота и  $\sigma_1$  рецепторов, механизмов развития окислительного стресса в плаценте и во всем организме при преэклампсии и роли этих процессов в патогенезе этого заболевания; на основании установленных закономерностей разработка патогенетического лечения.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Установление механизмов окислительного повреждения плаценты, для чего в клинике (при физиологической и осложненной преэклампсией беременности) и в эксперименте на морских свинках (при физиологической и осложненной окислительным стрессом беременности) будет исследовано:
  - а) сигналы ЭПР (электронного парамагнитного резонанса), отражающие интенсивность дыхания и целостность цепи электронного транспорта (убисемихиноны, FeS-центры NADH-дегидрогеназы, цитохром P-450) митохондрий, содержание железосодержащих парамагнитных комплексов ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ -трансферрин), оксида азота (свободное NO, Hb-NO, FeS-NO), интенсивность свободнорадикального окисления (спинмеченные свободные радикалы кислорода и липидов) плаценты (со стороны матери и плода) с помощью метода ЭПР.



- б) антиоксидантные ферменты (церулоплазмин,  $\text{Fe}^{3+}$ -трансферрин, каталаза, глутатионредуктаза, супероксиддисмутаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), параметры прооксидантной системы (ионы  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ), ЭПР сигналы Met-Hb, комплексов дезоксигемоглобина с NO (Hb-NO) в крови с помощью метода ЭПР и спектрофотометрии.
- в) содержание холестерина и триглицеридов в крови.
2. Установление содержания  $\sigma_1$  рецепторов в плаценте при физиологической и осложненной преэклампсией беременности радиолигандным методом (в клинике).
  3. Во время физиологической и осложненной преэклампсией беременности (в клинике и в эксперименте) установление содержания вазоактивных соединений (NO, эндотелина-1), эстрогенов и прогестерона в крови иммуноферментным, ЭПР-спектроскопическим (посредством спин-меток) методами.
  4. Установление микроморфологических изменений в плаценте экспериментальных морских свинок во время протекающей на фоне окислительного стресса беременности.
  5. Установление всех вышеперечисленных параметров у экспериментальных морских свинок при протекающей на фоне окислительного стресса беременности и лечения набором антиоксидантных препаратов (Актовегин + витамин С + витамин Е) и Плафероном ЛБ.

### **Научная новизна работы.**

Впервые:

Комплексно исследованы механизмы управления функционирования различных систем (фето-плацентарной, рецепторной, гормональной, вазомоторной, про- и антиоксидантной) гомеостаза при физиологической и осложненной преэклампсией беременности.

Показано, что интенсивность окислительного метаболизма плаценты различна в близлежащих к плоду и матке областях плаценты, что обусловлено ее морфоструктурными особенностями и интенсивностью окислительного метаболизма.

Установлено, что в плаценте нарушение синтеза вазоактивных соединений (NO, эндотелина-1, стероидных гормонов (эстрадиола и прогестерона) является результатом развития в ней окислительного стресса и способствует увеличению реактивности кровеносных сосудов.

Установлено, что во время преэклампсии в плаценте возрастает количество  $\sigma_1$  рецепторов, что является ответной реакцией на уменьшение содержания в крови эндогенного лиганда этих рецепторов, прогестерона.

Впервые высказано предположение, что иммуномодуляторная и вазореактивная активность прогестерона при беременности проявляется посредством  $\sigma_1$  рецепторов.

Впервые в условиях экспериментального моделирования преэклампсии (посредством окислительного стресса) выявлено сходство в изменении параметров метаболизма экспериментальных животных и беременных женщин с преэклампсией; показана эффективность набора антиоксидантных препаратов (Актовегин + витамин С + витамин Е) и Плаферона ЛБ для коррекции вызванных окислительным стрессом морфоструктурных и функциональных (стероидогенез, окислительный метаболизм) изменений в плаценте.

### **Положения выносимые на защиту.**

1. Окислительный метаболизм является одним из важнейших факторов, регулирующих функционирование плаценты (энергогенез, стероидогенез, синтез вазоактивных соединений), работу иммунной и рецепторной системы организма, обеспечивает модуляцию вазоактивности кровеносных сосудов и определяет исход беременности.

2. Взаимодействие  $\sigma_1$  рецепторов синцитиотрофобласт с их эндогенным лигандом во время беременности определяет интенсивность образования вазоактивных соединений (эндотелин-1, оксид азота) и реактивность кровеносных сосудов в организме.
3. Эффективное лечение экспериментальной преэклампсии антиоксидантными препаратами (Актовегин+ витамин С + витамин Е) и Плафероном ЛБ еще раз подтверждает важную роль окислительного стресса в патогенезе преэклампсии.

### **Практическая значимость работы.**

1. На основании проведенных исследований установлены некоторые новые механизмы развития беременности, осложненной преэклампсией, в частности, роль  $\sigma_1$  рецепторов в патогенезе этого синдрома. Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможности использования  $\sigma_1$  рецепторов в качестве терапевтических мишеней при лечении преэклампсии.
2. Установлена роль окислительного повреждения плаценты в патогенезе преэклампсии. Выявлены некоторые важные прогностические параметры этого синдрома.
3. В эксперименте на морских свинках исследовано воздействие различных препаратов на интенсивность окислительного стресса при преэклампсии. На основании проведенных исследований рекомендуем включение этих препаратов (Актовегин + витамин А+ витамин Е) в схему лечения преэклампсии.

### **Апробация работы.**

Основные положения диссертации доложены на совместном заседании кафедры патофизиологии и Ассоциации патофизиологов Грузии.

### **Публикации.**

Вокруг диссертационной работы опубликовано 13 научных работ в международных изданиях.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация содержит 192 печатных страниц. Состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, обсуждение полученных результатов, выводы и практические рекомендации. Диссертация иллюстрирована 14 диаграммами, 19 фотоснимками, 14 таблицами. Список использованной литературы содержит 340 источников.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Отбор пациентов**

Клинические наблюдения и лабораторные исследования были проведены на 100 пациентках. Из них: 15 здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста, 40 - беременных с физиологическим течением беременности, 50 - беременных женщин с осложненной преэклампсией беременностью. Диагноз преэклампсии ставился на основе критериев современной классификации (Gicfford J. M., et al., 2000). В частности, систолическое артериальное давление после 20 недель гестации было  $>140$  мм рт. ст., диастолическое -  $>90$  мм рт. ст. Имели место протеинурия, отеки.

Исследуемые пациенты были подобраны из роддома имени св. Анны и св. Якима и в НИИ перинатальной медицины, акушерства и гинекологии им. К. Чачава в г. Тбилиси.

Были изучены данные анамнеза беременных. Во время их обследования обращали внимание на наследственные факторы, перенесенные в детстве заболевания, на формирование половой зрелости и репродуктивной системы, а также на экстрагенитальные заболевания, которые могли повлиять на результаты исследования. При исследовании менструальной функции заострялось внимание на продолжительность менструального цикла, болезненность, количество потерянной крови.

При изучении социального статуса принимали во внимание жилищные условия, наличие стрессовых факторов.

Всем беременным проводились рутинные исследования: общий анализ крови, анализ мочи, коагулограмма, бактериологическое изучение флоры влагалища, ультразвуковое исследование половой системы, определение группы и резус фактора крови.

С учетом особенностей проводимого исследования беременные с инфекционными или экстрагенитальными заболеваниями и с различными пороками не были включены в исследуемые группы.

При диагностики преэклампсии обращалось внимание на анамнез, объективные жалобы и клинические симптомы. Диагноз преэклампсии ставился на основе критериев современной классификации (систолическое артериальное давление после 20 недель гестации  $>140$  мм рт. ст., диастолическое -  $>90$  мм рт. ст.; протеинурия, отеки) (Gicfford J. M., et al., 2000).

Для исследования использовалась венозная кровь и плацента (области, прилежащие к плоду и матке) пациенток. Исследования были проведены на базе Тбилисского Государственного Медицинского Университета, НИИ медицинской биотехнологии и НИИ физиологии им. Бериташвили.

### *Экспериментальное моделирование синдрома преэклампсии*

В литературе существует целый ряд экспериментальных моделей преэклампсии, в основе которых лежит индукция различных характерных для этого синдрома признаков (гипертензия, протеинурия и эдема). Среди них можно отметить использование мышей гипертензивной породы (BPH/5) (Davisson R.L., et al., 2002), хроническая администрация ингибитора NO-синтазы LNAME (N<sup>ω</sup>-L-arginine metylesther) (Martinez-Orgado J., et al., 2004), систематическое введение низких доз эндотоксина или Flt1 (антагонист васкулярного эндотелиального фактора роста) (Cross J.C., 2003), трансформация активированных Th1 клеток в поздние сроки гестации (Zenclussen A.C., et al., 2004), или индукция окислительного стресса (Vanderleilie J., et al., 2004). Учитывая важную роль окислительного метаболизма плаценты в развитии беременности мы с целью экспериментального моделирования синдрома схожего с преэклампсией использовали низкие дозы синтетического генератора свободнорадикальных форм кислорода, аллоксана (Grankvist K, et al., 1981, Takasu N., et al., 1991). С целью коррекции окислительного метаболизма мы использовали синтезированный в Институте Медицинской Биотехнологии препарат Плаферон ЛБ (патент США WO 02/12444 A2) и набор антиоксидантных препаратов (Актовегин + витамин С + витамин Е).

Эксперименты проводились на половозрелых морских свинок –самках (40 животных). Экспериментальные животные были разделены на 4 группы:

- 1 группа – контрольные (интактные) животные (10 животных);
- 2 группа – экспериментальная преэклампсия (10 животных);
- 3 группа - экспериментальная преэклампсия + Плаферон ЛБ (10 животных);
- 4 группа - экспериментальная преэклампсия + набор антиоксидантных препаратов (Актовегин + витамин С + витамин Е) (10 животных).

С целью индукции синдрома подобного преэклампсии в конце 7 недели гестации (срок беременности морских свинок 9 недель) в течении 10 дней животным внутримышечно вводили аллоксан (уриэлмазоксановая кислота  $C_2H_2N_2O_4$ ) дозой 25 мг/кг.

Животным 3 и 4 групп на 3 день после инъекций аллоксана проводили 10 дневное лечение (внутримышечные инъекции) Плафероном ЛБ (дозой 2,5 мг/кг) или набором антиоксидантных препаратов (Актовегин (Nycomed Austria) (5,5 мг/кг) + витамин С (3000 мг/кг) + витамин Е (10 мг/кг)).

На 9 недели гестации животные подвергались эвтаназии в условиях общей анестезии (этамонал натрия дозой 40 мг/кг).

### *Лабораторные исследования*

#### ЭПР-спектроскопические исследования.

С целью определения окислительного гомеостаза в плаценте и крови применяли метод электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР) (Пулатова М. К. и др., 1989). Спектроскопические исследования ЭПР проводилось на радиоспектрометре РЭ-1307 (Россия), сверхвысокой частотой 9.77 ГГц частотой модуляции 50 кГц при температуре жидкого азота (-196°C). В крови определяли содержание свободно-радикальных формы кислорода ( $O_2^-$ ), липидов ( $LOO^\cdot$ ) и оксида азота (NO) методом ЭПР спектроскопии с применением соответствующих спин-ловушек. С целью определения свободного оксида азота применяли спин-ловушку диэтилдитиокарбомат натрия (DETC) (Sigma). Кровь инкубировали с DETC (0,34 мг/мл) и с  $Fe^{2+}$ - цитратом натрия (0,03 мг  $FeSO_4 \cdot 7H_2O + 3,7$  мг) в течение 10 мин. при комнатной температуре, после чего замораживали при температуре жидкого азота. Регистрацию ЭПР спектров комплексов  $NO-Fe^{2+} - (DETC)$  проводили

при температуре жидкого азота и значении микроволновой мощности 20 мВт (Галаган М. У., и др., 1997).

С целью определения свободных радикалов кислорода в крови (супероксидрадикалов) использовали спин-ловушку 5,5 диметил-1-пироллин-IV -оксид (DMPO) (SIGMA). Проводили инкубацию крови с DMPO (дозой 50 mM на 1 мл крови) в течение трех минут при комнатной температуре (Xia Y., Zweer J. L., 1997). С целью определения свободных радикалов липидов (LOO $\cdot$ ) в крови) использовали спин-ловушку  $\alpha$ -фенил-tert-бутилнитрон (PBN) (SIGMA) дозой 150 mM/мл PBN в 2,5 mM/мл трис-HCl буфере (pH 7.4) (Stoker R., et al., 1987) Проводили инкубацию крови с PBN в течение трех минут при комнатной температуре Спектры ЭПР супероксидрадикалов (O $_2$  $\cdot^-$ ) и липопероксидов (LOO $\cdot$ ) регистрировали при комнатной температуре при микроволновой мощности 20 mVt (Kramer H. J., et al., 1994).

## **Биохимические исследования**

### ***Определение активности каталазы крови***

Активность каталазы определяли методом Аebi (1984), модифицированным А. Королюк, Л. и И. Ивановой (1988) на спектрофотометре ЛОМОФ-46 (Королюк М.А., и др.,1988).

### ***Определение активности супероксиддисмутазы***

Активность супероксиддисмутазы определяли методом Fried-is (1970), модифицированным Е. В. Макаренко (1988) (Макаренко Е.В.,1988).

### ***Определение активности глутатион редуктазы.***



Активность глутатион редуктазы определяли в эритроцитах с помощью набора реактивов «Glutathion Reductase Assay Kit» (SIGMA). Активность фермента выражали количеством наномолей NADPH окисленных до NADP.

### ***Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы***

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G-6-PG) определяли набором реактивов «Glukose-6-phosphat-dehydrogenase» (SIGMA). Активность фермента выражали в условных единицах на 1г гемоглобина (Hb).

Определение содержания холестерина, триглицеридов и липопротеидов низкой плотности в плазме крови

Содержания холестерина, триглицеридов и липопротеидов низкой плотности в плазме крови определяли на аппарате фирмы Roshi по стандартной методике.

Определение содержания стероидных гормонов, прогестерона, эстрадиола и тестостерона в крови.

В сыворотке периферической крови содержание стероидных гормонов, прогестерона, эстрадиола и тестостерона определяли методом ELISA (реактив – M.B.S. - Medical Biological Service sel. -- Милан-Италия).

### ***Радиолигандный анализ $\sigma_1$ рецепторов.***

С целью определения содержания  $\sigma_1$  рецепторов в плаценте плацентарную ткань гомогенизировали (10 % гомогенат) в 0.3 моль в л сахарозы и центрифугировали при 3000 x g в течение 15 мин. Полученный осадок отбрасывали а надосадочную жидкость центрифугировали при 15 000 x g в течение 30 мин. Осадок гомогенизировали в 50 mM фосфатном буфере, pH 7.4 и

повторно центрифугировали при 15 000 x g в течение 30 мин. В полученном осадке (мембранная фракция) определяли количество  $\sigma$  рецепторов.

Количество  $\sigma$  рецепторов определяли по методу (Ganapathy et al., 1999). Радиоактивным лигандом был использован [ $^3\text{H}$ ] SKF 10047 (DuPont-NEN (Boston, MA) со специфической активностью 21 Кюри/ммоль. 100 мкг мембранной фракции инкубировали с 10-20 нМ [ $^3\text{H}$ ] SKF 10047 в фосфатном буфере, pH 7.4 при комнатной температуре в течение 3 часов. Общий объем инкубационной пробы составлял 200 мкл. Реакцию останавливали добавлением 5 мл холодного буфера и смесь фильтровали через фильтры Whatman GF/F (размер пор, 0.7  $\mu\text{m}$ ). Фильтры промывали 30 мл холодным буфером и радиоактивность на фильтрах измеряли с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика. Неспецифическое связывание определяли после внесения в инкубационную пробу 10 мкМ пентазоцина. Разность между тотальным и неспецифическим связыванием принимали за специфическое связывание.

Количество прогестерона в крови определяли методом ELISA с помощью иммуноферментного набора Human Diagnosticum.

### ***Гистологические исследования***

Для гистологических исследований кусочки плаценты фиксировали в 12%-ом формалине и формировали в целоидине. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

### **Статистическая обработка**

Статистический анализ ЭПР спектроскопических показателей проводили стандартным методом, а достоверную оценку разности производили путем t критерия Стьюдента.

Статистическую обработку иммунологических показателей осуществляли по формуле Фишера и с применением компьютерных программ (Версии Excell и SPSS).

## ***РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ***

### ***И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ***

Кислород активно участвует в регуляции процессов плацентации (пролиферация воросничатых цитотрофобластов, дисидуальная инвазия и ремоделирование спиральных артерий) и развитии эмбриона посредством управления транскрипции различных генов VEGF (vascular endothelial growth factor), HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ), лептина и т. д. Роль сенсора кислорода в плаценте выполняют митохондрии, в частности, железосерные белки (Huppertz B, 2003).

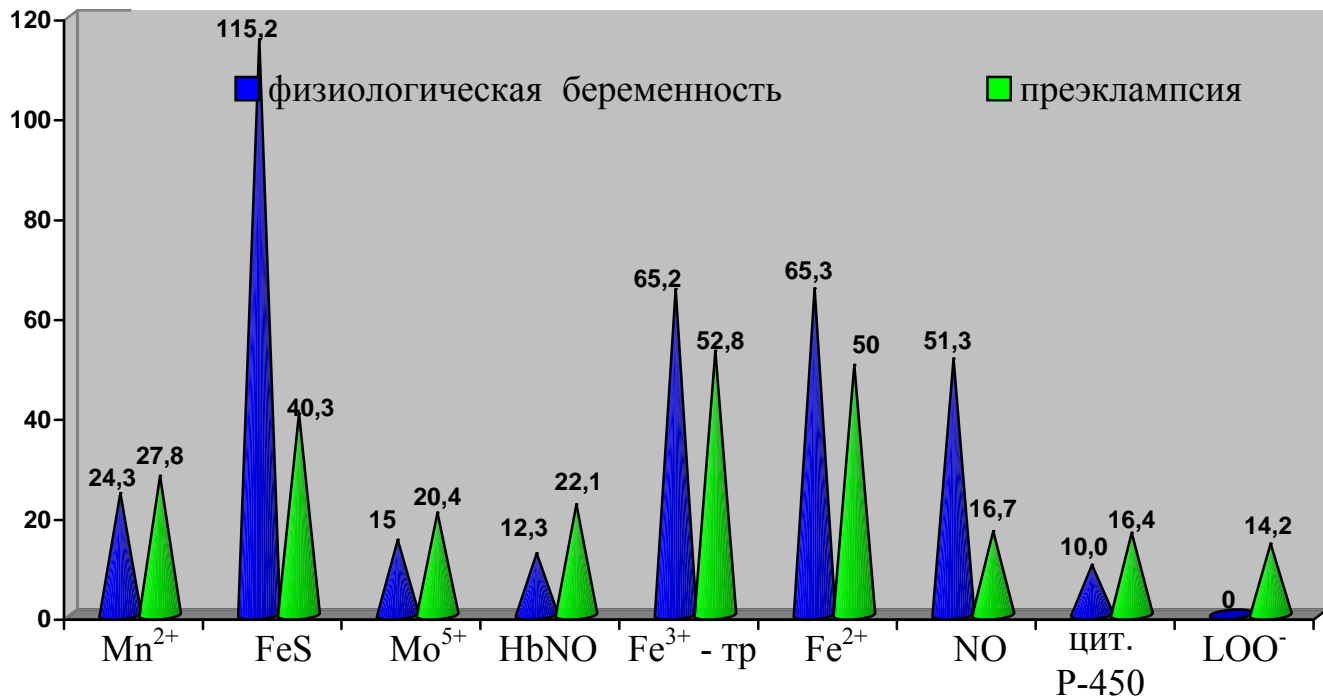
Из результатов наших исследований вытекает, что во время физиологической беременности интенсивность метаболизма плаценты в фетальной и прилежащей к матке частях плаценты различна. Для ткани, прилежащей к плаценте характерна высокая активность окислительного метаболизма, энергогенеза и стероидогенеза, протекающих в митохондриях, что проявляется сравнительно высокой активностью соответствующих ЭПР сигналов (FeS-центры, феррицитохром P-450, Fe<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup>-ионы, Fe<sup>3+</sup>-трансферрин, Mo<sup>5+</sup>-ксантиноксидаза) (диаграмма 1, 2, 3).

В митохондриях человеческой плаценты выявлено минимум два типа электронно-транспортной цепи (Klimek L., et al., 1998) – первая ответственна за синтез АТФ, вторая - за стероидогенез. Соответственно, первая цепь содержит цитохром с, вторая – цитохром P-450. Различна также природа железосерных центров (FeS), входящие в состав этих цепей: FeS-центры участвующей в процессах энергогенеза NADH- дегидрогеназы осуществляют перенос электронов

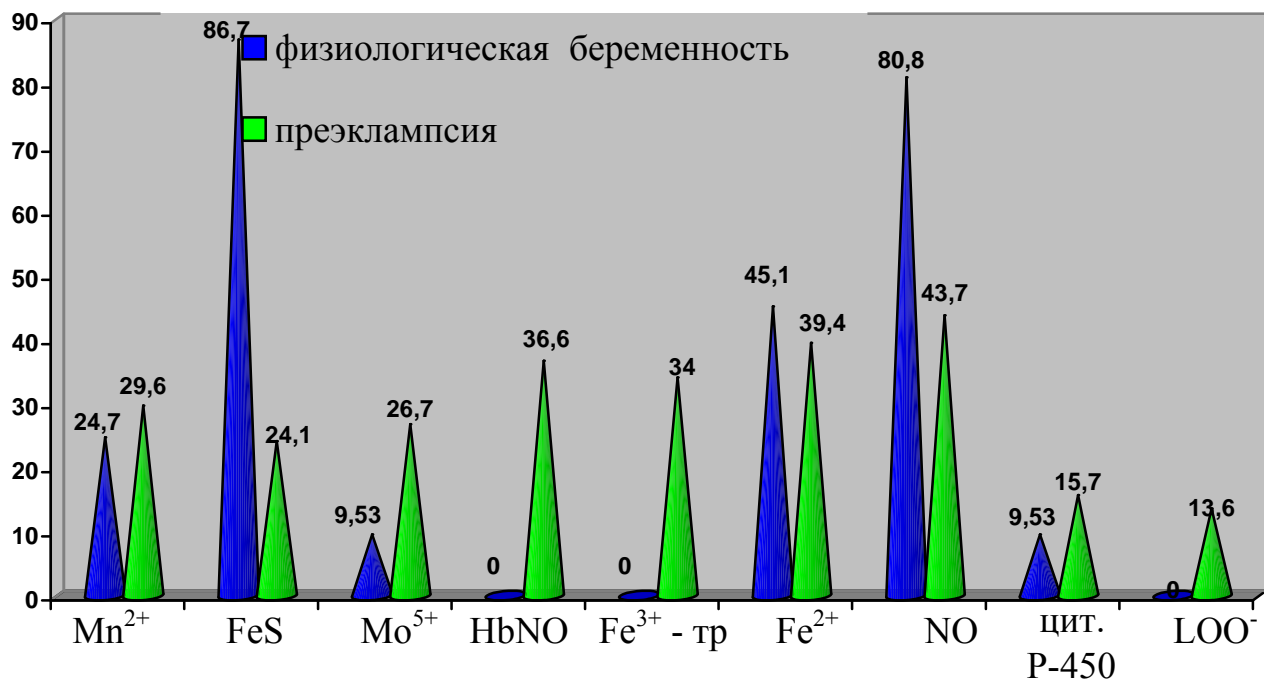
с NADH на хиноны, в процессе стероидогенеза FeS-центры аденодоксина передают электроны цитохромам P-450, участвующим в преобразовании холестерина и гидроксиглирования стероидов. В спектре ЭПР прилежащей к матке части плаценты сравнительно высокая интенсивность сигнала ЭПР FeS-центров указывает на низкую активность стероидогенеза и окислительного фосфорилирования по сравнению с фетальной зоной. Низкая интенсивность процессов энергетического способствует активации гипоксантин-ксантинооксидазной системы и накоплению ксантинооксидазы.

Накопление в плаценте участвующих в процессах пролиферации ионов железа осуществляется посредством рецепторов трансферрина, расположенных на поверхности трофобласт и микроворосничатого эпителия. Рецепторы трансферрина характеризуются сравнительно высокой афинностью по отношению к  $Fe^{3+}$ -трансферрину, чем к апотрансферрину. После эритроцитоза  $Fe^{3+}$ -трансферрина из комплекса  $Fe^{3+}$ -трансферрин/рецептор трансферрина ионы железа попадают в плаценту, где участвуют в синтетических процессах или аккумулируются в ферритине; а сам транспортный белок, трансферрин, высвобождается из клетки (McArdic H.J., 1985, Vanderpuye O.A., et al., 1986, Vereift C.K., et al., 1999). Надо отметить, что плацента характеризуется ассиметричным распределением трансферриновых рецепторов: они расположены в основном в области, прилежащей к плаценте (vanDijk J.P., et al., 1986), что проявляется особенно высокой интенсивностью сигнала ЭПР  $Fe^{3+}$ -трансферрина в этой области плаценты. В то же время интенсивность ЭПР сигнала свободного железа в фетальном участке плаценты значительно превышает его интенсивность в прилежащей к матке части плаценты, что является результатом преимущественной аккумуляции ионов железа и высокой интенсивностью синтетических процессов в фетальной области плаценты.

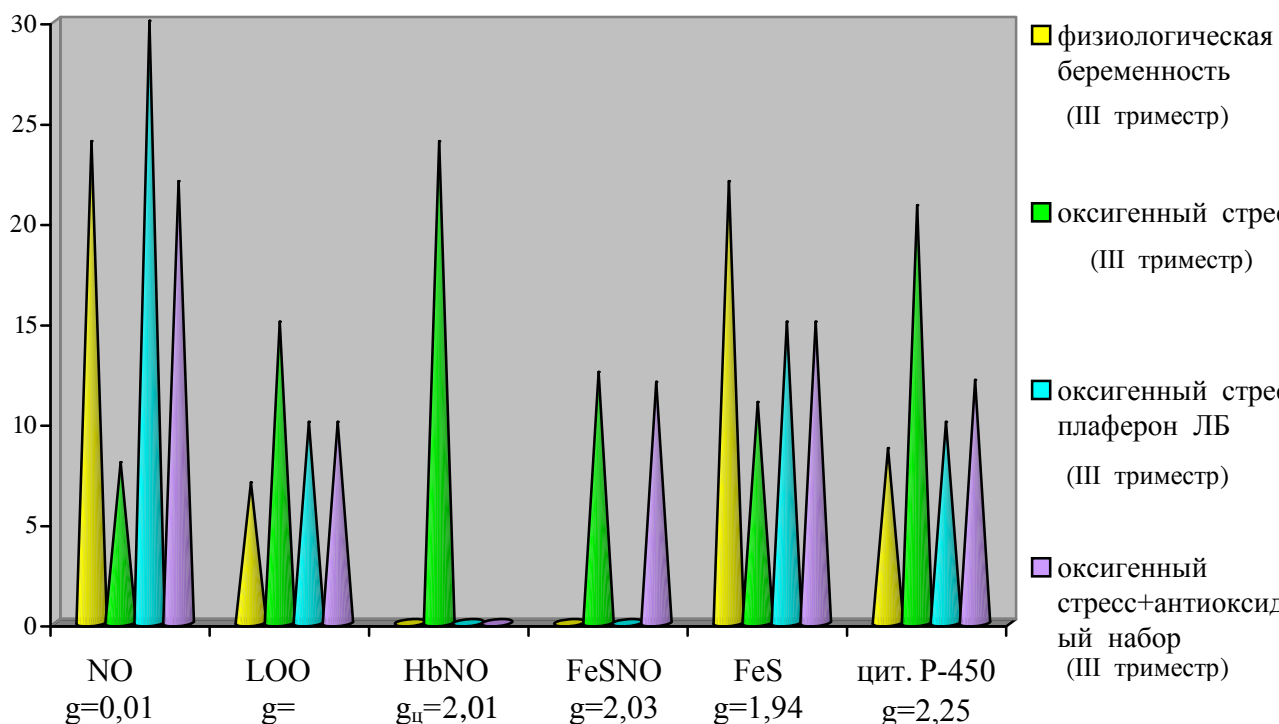
**Диаграмма 1**  
**Парамагнитные центры плаценты в околоматочной зоне**  
**при физиологической беременности и во время преэклампсии**



**Диаграмма 2**  
**Парамагнитные центры плаценты в околоплодной зоне**  
**при физиологической беременности и во время преэклампсии**



**диаграмма 3**  
**Парамагнитные центры плаценты морских свинок при физиологической и протекающей на фоне оксигенного стресса беременности и при его коррекции**



Выявленная нами разница значений параметров, отображающих интенсивность окислительного метаболизма различных участков плаценты во время физиологической беременности должна быть обусловлена ее морфоструктурными особенностями и неоднородным снабжением кислородом. Высокие показатели скорости и давления потока крови по направлению к хориональной пластинке в прилежащей к матке области плаценты обуславливают снижение парциального давления кислорода. Последнее обстоятельство способствует конкурентному с кислородом нитрозилированию митохондриальных гемсодержащих белков (цитохром с оксидазы) и образованию нитрозильных комплексов гемового железа (HbNO). Указанный механизм носит компенсаторный характер, подавляет транспорт электронов на IV комплексе, снижает интенсивность митохондриального дыхания и эти путем обеспечивает уменьшение потребления кислорода, сохранение митохондриального мембранного потенциала и защиту анаэробных клеток от повреждения (Marphy M.P., 2003). Замедление потока крови в области ворсинчатых синцитиотрофобласт обеспечивает усиленное орошение кровью и активацию митохондриального электронного транспорта (снижение ЭПР сигнала восстановленных FeS –центров) в фетальной части плаценты, что способствует интенсификации окислительного фосфорилирования и снижению уровня ксантиноксидазы. Надо принять во внимание также высокий уровень фетального гемоглобина (HbF) в крови плода; высокое сродство HbF к кислороду обеспечивает сохранению высокого уровня газообмена между кровью и тканью и обеспечение окислительного метаболизма даже в условиях недостатка кислорода (Merlet-Benichou С., 1975).

Во время физиологической беременности в клинике и эксперименте нами выявлен ЭПР сигнал липопероксидрадикалов (LOO<sup>•</sup>) низкой интенсивности в плаценте (диаграмма 1, 2, 3), ЭПР сигналы суперрадикалов (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), липопероксидрадикалов (LOO<sup>•</sup>) и ионов Mn<sup>2+</sup> (диаграмма 4, диаграмма 5) и усиление активности антиоксидантных ферментов, каталазы и супероксиддисмутазы (диаграмма 6, диаграмма 7) в крови, что свидетельствует об интенсификации процессов свободнорадикального окисления. На основании результатов собственных исследований и данных литературы (Myatt L., Cui X., 2004) можно заключить, что для физиологической беременности характерна интенсификация процессов свободнорадикального окисления, которая компенсируется ответной активацией каталазы и супероксиддисмутазы. Окислительный стресс при

физиологической беременности должен быть обусловлен характерными для беременности изменениями гормонального баланса, индуцированными воспалительной реакцией, проявляющейся активацией провоспалительного каскада (количественным увеличением с-реактивного белка, интерлейкина-6, TNF- $\alpha$ , лимфоцитов, изменениями обмена углеводов и липидов), и протекает на фоне аккумуляции субстратов метаболизма (жиров) на ранних этапах беременности и их быстрой мобилизации во второй половине беременности (Sacks G.P., et al., 1998, Sattar N., et al., 1996, Sattar N., Greer I.A., 2002).

Во время преэклампсии в условиях нарушения кровообращения в плаценте возможно развитие дефицита субстратов электроннотранспортной цепи и окислительного фосфорилирования в митохондриях, что обуславливает снижение мембранного потенциала митохондрий и интенсификацию апоптоза цитотрофобласт. Усиленный апоптоз цитотрофобласт способствует активации поли-ADP-рибоза-полимеразы (PARP) (Myalt L., 2002), истощению ее субстрата, NADH, и снижению интенсивности работы электроннотранспортной цепи митохондрий, что проявляется увеличением степени окисленности NADH-дегидрогеназы и подавлением энерго- и стероидогенеза. В результате подавления энергогенеза в митохондриях плаценты усугубляется состояние гипоксии, имеет место усиленное образование генераторов реактивного кислорода (ксантинооксидаза) и интенсификация окислительного стресса. Всему этому способствует конституционная недостаточность антиоксидантных ферментов в плаценте (Myalt L., 2002).

О высокой интенсивности окислительного стресса в организме беременных во время преэклампсии свидетельствуют результаты наших экспериментальных и клинических исследований. В крови беременных с преэклампсией и экспериментальных животных с осложненной окислительным стрессом беременностью выявлены интенсивные сигналы ЭПР липопероксидрадикалов ( $LOO\cdot$ ) супероксидрадикалов ( $O_2\cdot^-$ ), ионов  $Mn^{2+}$ , метгемоглобина (диаграмма 4) Поскольку ионы  $Mn^{2+}$  совместно с другими ионами переменной валентности являются активными катализаторами свободнорадикальных реакций, не удивительно, что резкое увеличение этих ионов в крови во время беременности сопровождается усиленной генерацией супероксидрадикалов, пероксидацией мембранных фосфолипидов и образованием липопероксидных радикалов. Во время осложненной преэклампсией беременности нами выявлены интенсификация процессов перекисного окисления липидов и развитие структурных изменений в эритроцитарных мембранах, что проявляется усиленным выходом мембранного холестерина, снижением степени деформабельности эритроцитов и их усиленным гемолизом. Высокая интенсивность процессов свободнорадикального окисления обуславливает нарушение баланса между про- и антиоксидантными системами, что проявляется инактивацией ферментов антиоксидантной защиты (церулоплазмина, СОД, глутатион-редуктазы и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы) (диаграмма 6, диаграмма 7). Таким образом, во время преэклампсии нарушается баланс между про- и антиоксидантными системами крови. Умеренная активация процессов свободнорадикального окисления, характерная для физиологической беременности сменяется некомпенсируемой интенсификацией окислительного метаболизма и развитием окислительного стресса в организме матери.

**Диаграмма №4**

**Парамагнитные центры крови при физиологической беременности и преэклампсии**

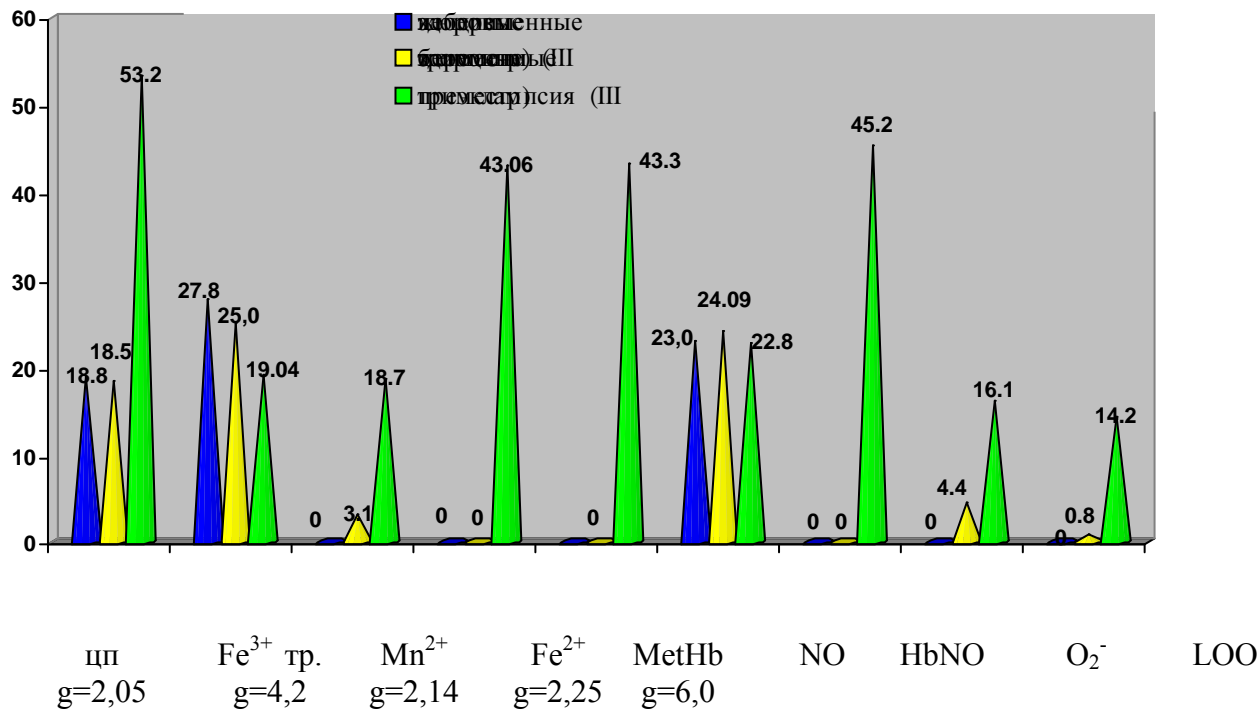




Диаграмма №5

Парамагнитные центры крови морских свинок при физиологической и протекающей на фоне оксигенного стресса беременности и при его коррекции

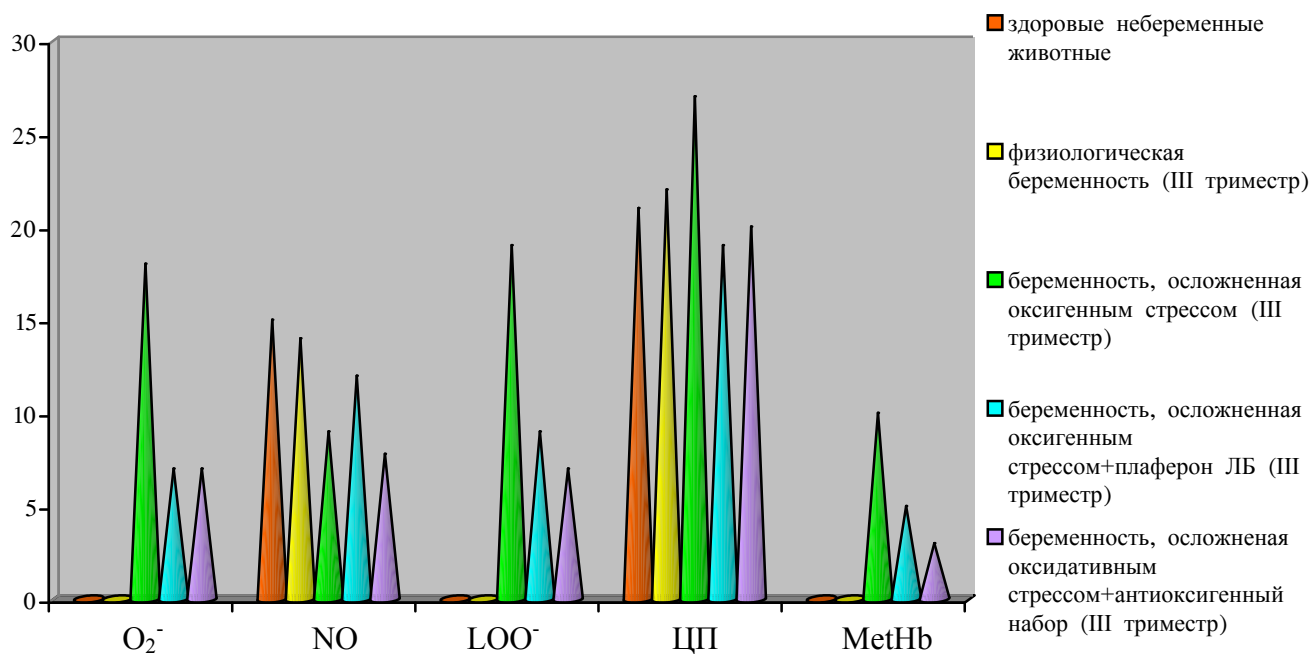
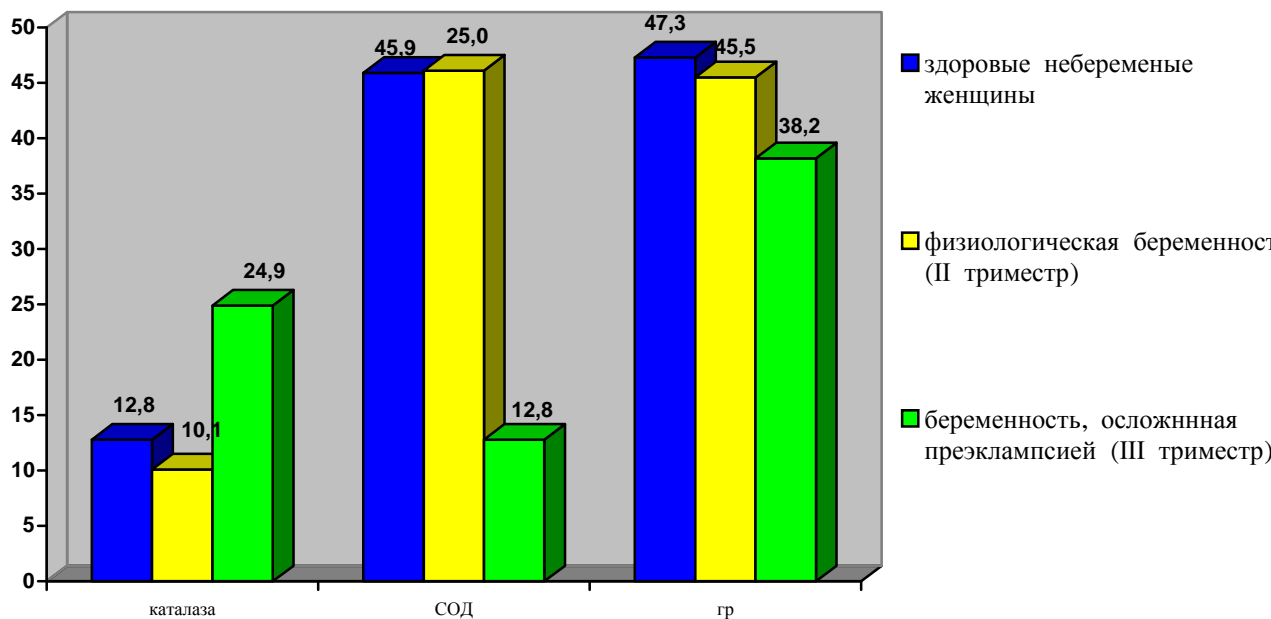
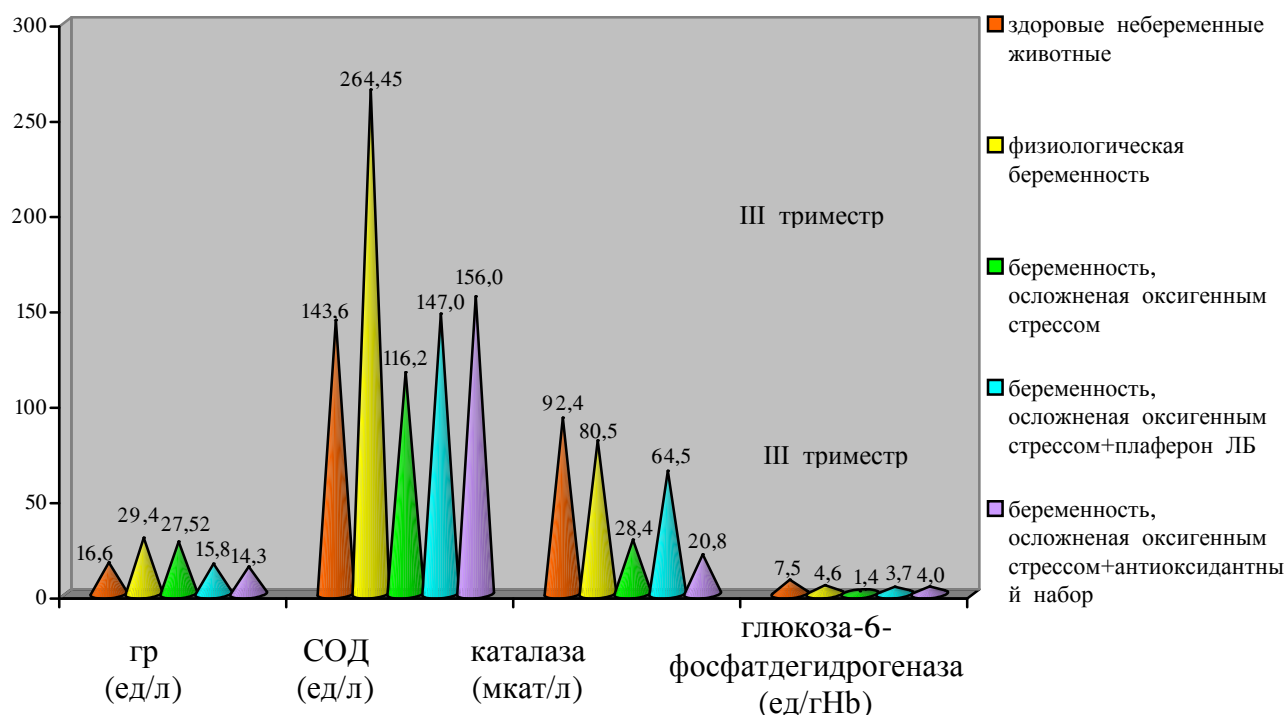


Диаграмма №6

Активность антиоксидантных ферментов крови при физиологической и осложненной преэклампсией беременности



**Активность антиоксидантных ферментов крови морских свинок при физиологической и протекающей на фоне оксигенного стресса беременности и при его коррекции**



Окислительный стресс является важнейшим физиологическим фактором регуляции процессов пролиферации и дифференциации в плаценте (Adelman D.M., Gertsenstein M., et al., 2000, Genbacev O, et al., 1997). Изменения редокс статуса в плаценте способствуют изменению фенотипа цитотрофобласт, и их активности, включая пролиферацию, миграцию инвазию в миометрий, подавление васкуляризации плаценты, развитию дегенеративных процессов в синцитиотрофобластах и преждевременному прерыванию беременности (Kauma S.W., et al., 1999). Окислительный стресс посредством воздействия на активность коллагеназы MMP-2 и MMP-9 способствует подавлению инвазии трофобласт и нарушению васкуляризации плаценты. Резкие изменения окислительного метаболизма, перекисное окисление мембранных фосфолипидов способствуют нарушению проницаемости митохондриальных мембран, открытию мегапор с участием антиапоптозного фактора BCL-2, уменьшению ионных градиентов, выделению малых размеров протеинов (цитохром c) в цитоплазму, активации каспаз, развитию апоптоза и некроза (Huppertz B, 2003). Считается, что характерная для третьего триместра физиологической беременности интенсификация смертности трофобласт происходит при участии фосфатидилинозитол-3- и митоген-активируемых каспаз (PI-3-K, MAPK), которые спонтанно активитруются в условиях окислительного стресса и гипоксии (Mackova M, et al., 2003).

Многочисленные исследования свидетельствуют о важной роли NO в патогенезе преэклампсии. В плаценте выявлены eNO- и iNO-синтазные системы: в ворсинчатых кровеносных сосудах и синцитиотрофобластах выявлена эндотелиальная форма NO-синтазы (eNOS) (Myatt L., 2002); в ворсинчатой строме плаценты существует также индуцибельная форма NO-синтазы (iNOS) (Myatt L., et al., 1997); в синцитиотрофобластах, эндотелии и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов содержание iNOS относительно низкое (Baylis S.A., 1999).

Ввиду вазодилататорной активности оксида азота (Williams D.J., et al., 1997) и способности регулировать функции трофобластов (Gaglotti C., et al., 2000) эта молекула играет важную роль в регуляции физиологической беременности. Имплантация (Gaglotti

C., et al., 2000) и дифференциация (Lyll A., et al., 1998) бластоцитов в плаценту, подвижность и способность инвазии трофобласт (Cartwright D.P., et al., 1999) регулируется посредством NO. Оксид азота модулирует апоптоз реснитчатых трофобласт (Dash P.R., et al., 2000). Известно, что физиологически образующееся в трофобластах NO проявляет антиапоптозную активность посредством нитрозилирования протеинов, например, каспазы-3. Увеличение продукции NO, хотя не способно полностью ингибировать апоптоз, снижает его активность.

В литературе существуют противоположные данные об изменении метаболизма NO при преэклампсии. Во время эклампсии некоторые авторы отмечают интенсификацию синтеза оксида азота, обусловленную, по-видимому, как индуцированной окислительным стрессом усиленной экспрессией iNOS, а также адаптационной интенсификацией экспрессии eNOS в ответ на низкую перфузию ткани плаценты, гипоксию и увеличенную резистентность кровеносных сосудов (Haddad E.K., et al., 1997, 181). Выявленное другими авторами снижение интенсивности синтеза оксида азота является результатом мутации гена eNOS и уменьшения содержания его РНК (Holden D.P., et al., 1998, Weiner C.P., et al., 1994, Ratherford R.A., 1995). Т.Н. Hung и соавторы (2001) (Hung T.H., et al., 2001) считают, что уменьшение содержания оксида азота в плаценте может быть вызвано характерной для преэклампсии интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, нарушением баланса между NO и супероксидрадикалами ( $O_2^-$ ) и трансформацией оксида азота в пероксинитрит. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о наличии остатков нитротирозина в плаценте при преэклампсии. (Myatt L., et al., 1996). Пероксинитрит участвует в пероксидационных процессах в биологических мембранах, окислении белков, нитрирует их аминокислотные остатки, что обуславливает изменение структуры и функции белков, нарушает тирозинкиназную сигнальную систему, посредством нитрозилирования электронотранспортных белков митохондрий ингибирует транспорт электронов в митохондриях, способствует деструкции гладкомышечных клеток ворончатого эпителия, интенсификации апоптоза и некроза синцитиотрофобласт, нарушения перфузии, транспорта и стероидогенеза в плаценте (Hung T.H., et al., 2001, Kossenjans W., et al., 2000, Ачук 2002). По нашему мнению во время преэклампсии редокс-зависимая трансформация NO в плаценте является основной причиной уменьшения содержания оксида азота (диаграмма 1, 2, 5). Уменьшение содержания NO способствует развитию ишемии плаценты, дистрофических изменений и очаговых некрозов синцитиотрофобласт, повреждению кровеносных сосудов, увеличению чувствительности клеток плаценты к проапоптозным стимулам, интенсификации апоптоза и некроза.

В созданной нами экспериментальной модели преэклампсии (модель окислительного стресса) в плаценте выявлены острые и хронические инфаркты, дисциркуляторные хронические дистрофические некрозы долей, тяжелая дистрофия синцитиотрофобласт, кардио- и цитолитический, разрушение структурной целостности лакун и нарушение функции интерлабиума. Таким образом можно заключить, что окислительный стресс и редокс-зависимое уменьшение содержания NO способствуют развитию острой и хронической недостаточности плаценты.

Таким образом, во время физиологической беременности оксид азота обеспечивает сохранение баланса между содержанием кислорода и интенсивностью митохондриального дыхания, регуляцию интенсивности окислительного метаболизма, мембранного потенциала митохондрий, защиту клеток от повреждения.

Во время преэклампсии в условиях развившейся вследствие нарушения кровообращения глубокой гипоксии нитрозилирование митохондриальных белков является одной из основных причин подавления митохондриального дыхания, истощения запасов аденозинтрифосфата, уменьшения ионных градиентов и гибели трофобласт.

Попадание токсических продуктов нарушенного метаболизма плаценты в систему кровообращения матери вызывает изменение вазоактивности кровеносных сосудов. В

этом процессе особое место принадлежит таким вазоактивным соединениям, как оксид азота, эндотелин и вазоактивные стероидные гормоны.

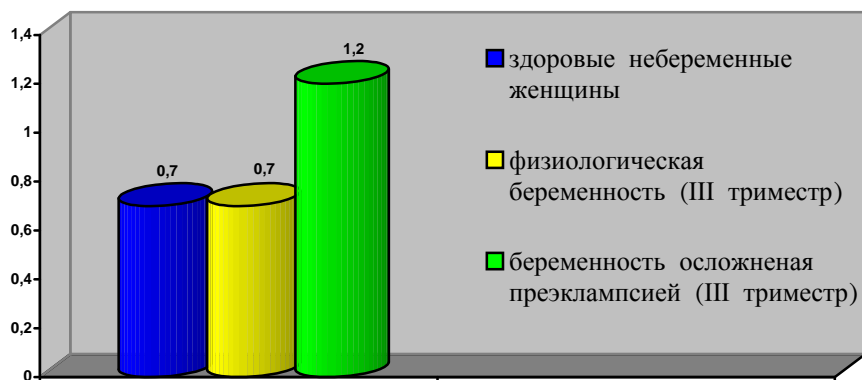
Из результатов наших исследований следует, что во время физиологической беременности в крови содержание оксида азота значительно не изменяется по сравнению с показателями, характерными для здоровых небеременных женщин.

Во время преэклампсии как в клинике, так и в эксперименте содержание свободного оксида азота в крови статистически достоверно уменьшается (диаграмма 4, 5). Среди причин этого уменьшения надо отметить редокс-зависимую трансформацию NO в пероксинитрит и ингибирующее воздействие избыточного холестерина на активность эндотелиальной NO-синтазы (Adams M.R., et al., 2000, Anderson T.J., et al., 1995).

Эндотелин-1 – эндогенный пептид, обладающий потенциально сильной вазоконстрикторной активностью. Во время третьего семестра беременности в клинике и эксперименте нами выявлено увеличение уровня эндотелина-1 в исследуемой крови (диаграмма 8). Надо отметить, что согласно данным литературы (Khedum S.M., et al., 2002, Naiker S., et al., 2001, Slowinski T., et al., 2002), уровень эндотелина-1 особенно высок в поздние сроки осложненной преэклампсией беременности, что свидетельствует о том, что это вазоактивное соединение не участвует в инициации преэклампсии, а активируется при его прогрессировании (Khalil R. A., Granger J.P., 2002). M. Napolitano и соавторы (2000) во время беременности, осложненной преэклампсией выявили увеличение экспрессии мРНК по сравнению с физиологической беременностью (Napolitano M., et al., 2000). По мнению авторов во время преэклампсии в ишемической плаценте возрастает секреция эндотелина-1 в ответ на снижение перфузии плаценты с целью компенсаторного усиления потока материнской крови по направлению к плоду (Granger J.P., et al., 2002, Redman C.W., Sargent I.L., 2003). Увеличение уровня эндотелина-1 также может быть обусловлено снижением его NO-индуцированного клиренса на фоне уменьшения содержания NO (Sing H. J., et al., 2001).

**Диаграмма №8**

**Содержание эндотелина в крови при физиологической и осложненной преэклампсией беременности**



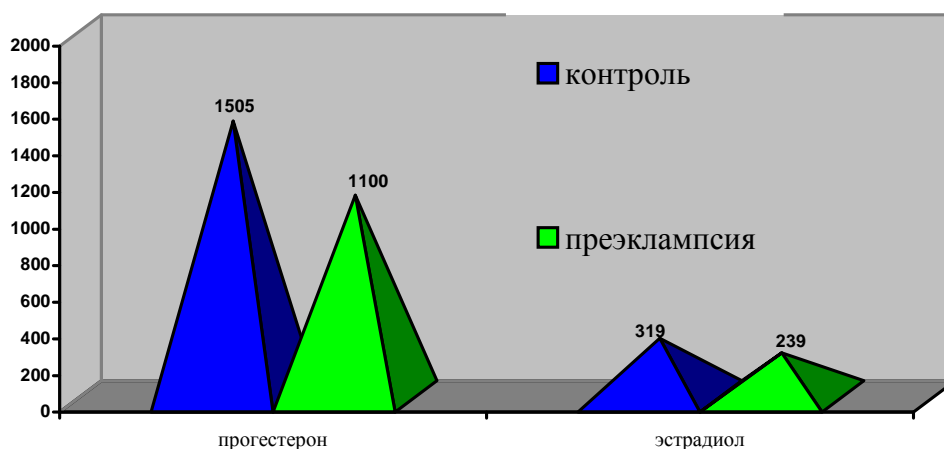
Эндотелин-1 в высоких концентрациях проявляет цитотоксическое действие на трофобласты, ингибирует их функции, пролиферацию и жизнеспособность, способствует дегенерации синцитиотрофобласт, развитию инфарктов и некрозов в плаценте. Кроме этого эндотелин-1 способствует снижению продукции антиоксидантов в трофобластах (глутатиона и глутатион дисульфида), усилению выделения цитотоксических агентов (малонового диальдегида, липопероксидов) в материнской крови и этим путем способствует интенсификации окислительного стресса, повреждению клеточных мембран эндотелия кровеносных сосудов и усугублению эндотелиальной дисфункции (Fiore G., et al., 2005, Scalera F., Dittric R., et al., 2002). Надо отметить, что реактивные соединения кислорода сами по себе мощные вазоконстрикторы (Tolando R., et al., 2000).

Barden и соавторы показали, что в эндотелиальных клетках пуповины, выделенных из крови беременных с преэклампсией и инкубированных с LDL и HDL, выявлена усиленная экспрессия эндотелина-1 (Barden A., et al., 1999).

Плацента выполняет эндокринную функцию во время беременности. В ней синтезируются стероидные гормоны (прогестерон и эстрадиол), необходимые для нормального течения беременности. Во время физиологической беременности в конце третьего триместра в плаценте синтезируется большое количество прогестерона (примерно в 10 раз больше, чем в яичниках во время лютеиновой фазы (Strauss I.H., et al., 1995). Конверсия холестерина в прогестерон начинается на внутренней мембране митохондрий в десмолазной реакции расщепления боковой цепи холестерина до прегненолона (Strauss I.H., et al., 1995), которая катализируется экспрессируемым в трофобластах плаценты цитохромом P-450 (Strauss I.H., et al., 1996). Цитохром P-450 также участвует в гидроксировании различных стероидов в положении 11 $\beta$ . В этой реакции роль донора электронов выполняет адренodoxин, который восстанавливается NADPH-зависимой адренodoxинредуктазой. Цитохром P-450 парамагнитен в окисленном низкоспиновом состоянии. Во время интенсификации стероидогенеза интенсивность сигнала ЭПР феррицитохрома P-450 ( $g_1=2,42$ ;  $g_2=2,25$ ;  $g_3=1,92$ ) уменьшается, что обусловлено или присоединением субстрата, и переходом фермента в высокоспиновое состояние ( $g=8,0$ ), или же образованием непарамагнитных комплексов в результате одноэлектронного восстановления в присутствии субстрата (Пулатова М.К., и др., 1989). В это время интенсивность ЭПРА сигнала восстановленного адренodoxина уменьшается.

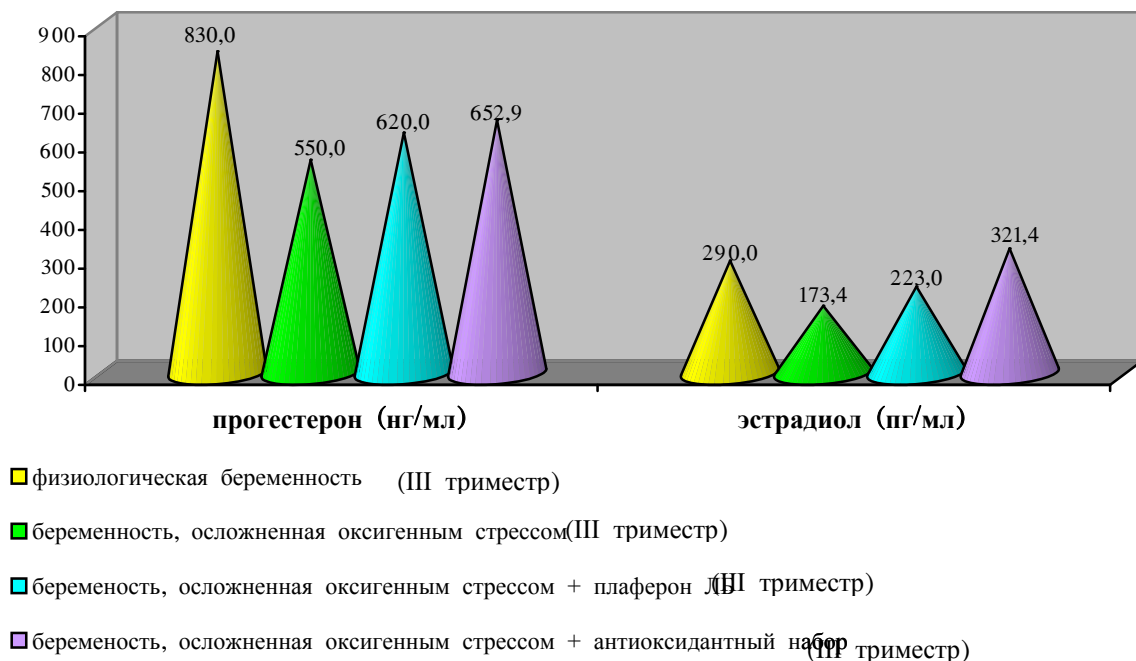
Во время экспериментальной преэклампсии нами выявлено уменьшение интенсивности сигнала ЭПР FeS-центров и увеличение интенсивности сигнала ЭПР цитохрома P-450, что указывает на увеличение степени окисленности электронно-транспортной цепи митохондрий и нарушении стероидогенеза в плаценте (диаграмма 3). Эти данные коррелируют с результатами гормонального исследования о снижении содержания эстрадиола и прогестерона в крови беременных женщин с преэклампсией и в крови эспериментальных животных с осложненной окислительным стрессом беременностью (диаграмма 9, 10). J. Klimek и соавторы показали, что снижение интенсивности синтеза прогестерона во время окислительного стресса в плаценте обусловлено подавлением десмолазной активности митохондриального цитохрома P-450 и не зависит от его катализирующей активности в гидроксировующих реакциях.

**Содержание прогестерона и эстрадиола при физиологической и при осложненной преэклампсией беременности**



Во время беременности прогестерону важная роль принадлежит в сохранении электролитного баланса и регуляции базального тонуса кровеносных сосудов. Высокий уровень прогестерона в крови беременных обеспечивает сохранение содержания ионов  $K^+$  (Ehrlich E.N., Lindheimer M. D., 1972), которые регулируют поток  $Na^+$  и  $Cl^-$ , мембранный потенциал, проницаемость медленных кальциевых каналов и тонус кровеносных сосудов (Furesta C., et al., 1993, Patrat C., 2000). В условиях окислительного стресса в плаценте снижение интенсивности образования прогестерона способствует нарушению гомеостаза  $K^+$ , изменению мембранного потенциала в клетках гладкой мускулатуры кровеносных сосудов, открытию медленных каналов  $Ca^{2+}$  (Barbagallo M., et al., 2001), с последующей констрикцией кровеносных сосудов, характерной для преэклампсии гипертензией, протеинурией и отеками. I. Buhimschi (1995) и Q. P. Liao (1996) показали, что инъекции прогестерона способствуют снижению LNAME-индуцированной гипертензии у крыс (Buhimschi I., et al., 1995, Liao Q.P., et al., 1996).

**Содержание прогестерон и эстрадиола при физиологической и протекающей на фоне оксигенного стресса беременности и при его коррекции**



Многочисленные исследования свидетельствуют о важной роли эстрадиола в регуляции тонуса кровеносных сосудов и артериального давления (Svedas E., et al., 2002). Считается, что эта регуляция осуществляется NO-зависимыми механизмами (MacRitchie A.N., et al., 1997) с участием рецепторов эстрадиола, которые регулируют активность NO-синтазы (eNOS) посредством воздействия на комплекс I<sub>3</sub>-киназа-серин-трионин Akt-киназа (Shaul P.W., 1999, Darblade B., et al., 2002). Как известно, эстрогены активируют eNOS (Hisamoto K. et al. 2000, Chen Z. et al, 1999), вызывают усиление экспрессии гена iNOS (Walsh L.S. et al 2003). E. Svedas и соавторы (2002) показали, что в изолированной артерии миометрия беременных женщин с преэклампсией 17-эстрадиол уменьшает базальный тонус кровеносных сосудов путем воздействия на синтез NO.

Выявленное нами уменьшение уровня эстрадиола в крови во время преэклампсии в клинике и эксперименте тесно связано с уменьшением содержания свободного оксида азота.

Считается, что в патогенезе преэклампсии помимо развития ишемических процессов в плаценте, генетических нарушений и изменений липидного метаболизма важная роль принадлежит снижению иммунно-адаптационной способности организма (Cooper et al., 1993). Клинические исследования последних лет свидетельствуют о снижении клеточного и гуморального иммунитета и увеличении продукции цитокинов и антител против различных аутоантигенов во время преэклампсии (Taylor, 1997). Несмотря на то, что иммунологические нарушения, по-видимому, не участвуют в инициации патологического процесса, при наличии неадекватного ответа организма они могут значительное влияние оказать на развитие преэклампсии (Vinaiter et al., 1995).

Как известно, иммуносупрессорная функция прогестерона важную роль играет в развитии иммунотолерантности в организме матери по отношению к плоду и сохранении беременности (Ganapathy M. E., et al, 1999). Su и соавторы (Su et al., 1988) показали, что прогестерон помимо взаимодействия с рецептором прогестерона характеризуется высокой афинностью к  $\sigma_1$  рецепторам.  $\sigma_1$ -рецепторы – уникальные рецепторы, выявленные в головном мозге, печени (Ross S.B., 1991), гастроинтестинальном тракте (Harada Y., et al., 1994), надпочечниках, семенных железах (Wolfe S.A., 1989) и плаценте (Hanner M., et al., 1996, Seth P, et al., 1998).  $\sigma_1$  рецепторы расположены на поверхности воросинчатого эпителия плаценты (Ramamoorthy J.D., et al., 1995). Существуют многочисленные данные об участии  $\sigma_1$  рецепторов в регуляции иммунной функции (Ganapathy M.E., et al., 1999, Carr et al., 1992, Cassellas et al., 1994, Liu et al., 1995, Derocq et al., 1995, Carayon et al., 1995,



Bourrie et al., 1995). Показано, что лиганды  $\sigma_1$  рецепторов способствуют ингибированию ответной реакции лимфоцитов на митогены *in vivo* и *in vitro* (Carr et al., 1992, Cassellas et al., 1994). Лиганды  $\sigma_1$  рецепторов характеризуются иммуносупрессорной активностью, вызывают ингибирование продукции провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) (Decorq et al., 1995), подавление острой реакции организма по отношению к аллотрансплантанту (Carayon et al., 1995).

В наших исследованиях было установлено, во время осложненной преэклампсией беременности в плаценте рожениц количество  $\sigma_1$  рецепторов значительно возрастает (диаграмма 11), что находится в обратной корреляции с изменениями содержания прогестерона в крови (диаграмма 9).

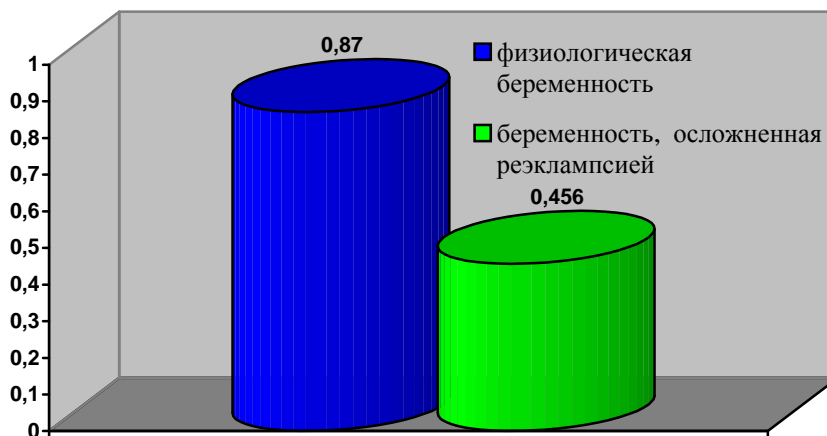
С учетом высокой афинности  $\sigma_1$  рецепторов по отношению к прогестерону и потенциально высокой противовоспалительной активности этого гормона (Roman F.J., et al., 1989), было сделано предположение о возможности проявления иммунной активности прогестерона посредством  $\sigma_1$  рецепторов (Siiteri P.K., et al., 1977, Su et al., 1988). Это предположение особенно важно, если учесть, что во время беременности содержание прогестерона в крови значительно превышает концентрацию, необходимую для насыщения рецепторов прогестерона, расположенных на поверхности лимфоцитов.

Существуют данные, свидетельствующие о том, что помимо иммуномодуляторной активности  $\sigma_1$  рецепторы характеризуются вазоконстрикторным действием (Altura V.T., 1983).  $\sigma_1$  рецепторы регулируют поток ионов  $Ca^{2+}$  путем модуляции проницаемости каналов (Ela C., et al., 1994, Nguyen et al., 1998; Church et al., 1995).

Высказана гипотеза, что мобилизация кальция из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму происходит в основном посредством взаимодействия  $\sigma_1$  рецепторов с рецептором инозитол 1,5,5-трифосфата. Под действием агонистов  $\sigma_1$  рецепторов (кокаин, пентазоцин, стероиды) возможна дисоциация  $\sigma_1$ -рецепторы/анкиринового комплекса с инозитол 1,5,5-трифосфатом (InsP<sub>3</sub>) (Hayashi T., Su T.P., 2001 Hayashi T., Su T.P., 2001), что способствует усилению связи InsP<sub>3</sub>-а со своим рецептором и увеличению потока кальция в клетку. Оказалось, что лиганды  $\sigma_1$  рецепторов (кокаин) стимулируют выделение эндотелина, что подтверждается существованием  $\sigma_1$ -связывающих сайтов на эндотелиальных клетках (Wilbert-Lampen U., 1998). Блокада  $\sigma_1$  – рецепторов секс-стероидами или антипсихотическими агентами обеспечивает восстановление эндогенно-индуцированных вазомоторных нарушений (Wilbert-Lampen U., et al., 1998). Исходя из вышесказанного считаем, вазореактивность прогестерона и его способность регулировать электролитный баланс обусловлена взаимодействием с  $\sigma_1$ -рецепторами. Не исключено, что прогестерон посредством регуляции  $\sigma_1$ -зависимой интенсивности кальциевого потока воздействует на активность кальций-зависимой NO-синтазы (eNOS, iNOS) и этим путем регулирует интенсивность образования NO и реактивность кровеносных сосудов. В пользу этого предположения свидетельствуют данные P.J. Luparlus и соавторов (2000), свидетельствующие о способности  $\sigma_1$ -рецепторов регулировать активность GTP-азы, возможно, посредством NO-зависимых механизмов.

#### Диаграмма 11

#### Содержание $\sigma$ -рецепторов в плаценте рожениц при физиологической и при осложненной преэклампсией беременности



Таким образом, во время физиологической беременности в плаценте, где концентрация прогестерона значительно превышает его уровень в крови присоединение прогестерона  $\sigma_1$ -рецепторами синцитиотрофобласт обуславливает развитие в организме матери иммунодепрессии и толерантности по отношению к плоду, уменьшение образования эндотелина-1, снижение реактивности кровеносных сосудов и сохранение беременности.

Снижение уровня прогестерона является одной из причин активации клеточного звена (Th1) иммунитета (Szekeres-Bartho J., 1996). Интерес представляют данные о существовании отрицательной корреляции между содержанием эндотелина и количеством Th-2 клеток в плазме крови во время преэклампсии и физиологической беременности (Kuwajima T., 2001). Увеличение уровня эндотелина-1 ассоциирует с развитием дисбаланса лимфоцитов Th1/Th2. Исходя из вышесказанного следует, что недостаточность прогестерона при преэклампсии способствует активации клеточного иммунитета в организме беременных, увеличению содержания эндотелина-1, снижению синтеза NO и развитию гипертензии.

Выявленное нами увеличение количества  $\sigma_1$ -рецепторов во время преэклампсии возможно является проявлением ответной реакции организма на уменьшение уровня синтезируемого в плаценте прогестерона, что еще более усугубляет дисбаланс между вазоактивными соединениями и иммунными клетками (Th1/Th2).

Полученные результаты дают возможность сделать заключение о возможности применения  $\sigma_1$ -рецепторов в качестве потенциальных терапевтических мишеней при различных заболеваниях, протекающих на фоне иммунных нарушений.

Из результатов наших исследований следует, что интенсификация окислительного метаболизма играет важную роль в развитии первичных морфофункциональных нарушений в плаценте, нарушении синтеза вазоактивных соединений (оксид азота, эндотелин-1, прогестерон, эстрадиол, реактивные формы кислорода), увеличении реактивности кровеносных сосудов и развитии преэклампсии в организме матери. Исходя из вышесказанного считаем целесообразным применение антиоксидантов при лечении преэклампсии. В пользу этого соображения свидетельствуют данные литературы об успешном применении С и Е витаминов (Myatt L., 2002, Sacks G.P., et al., 1998) и генератора оксида азота (L-аргинина) (Darblade B., et al., 2002) при лечении преэклампсии.

С целью подтверждения нашей рабочей гипотезы о важной роли окислительного стресса, в механизмах развития различных патогенетических звеньев преэклампсии, и поиска новых путей патогенетического лечения этого синдрома при лечении экспериментальной модели индуцированной окислительным стрессом преэклампсии мы использовали препарат Плаферон ЛБ и набор антиоксидантных препаратов (Актовегин + витамин С + витамин Е).

Плаферон ЛБ обладает антиоксидантной, иммуномодуляторной, NO-модуляторной активностью. Многочисленные исследования свидетельствуют, что Плаферон ЛБ

характеризуется мембраностабилизирующим действием, способствует нормализации митохондриального дыхания и процессов энергогенеза (Джавахишвили Н., и др., 2001), активации  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-зы, стабилизации редокс-статуса субклеточных органелл, клеток и тканей, что в свою очередь обеспечивает нормализацию синтеза и последующего метаболизма оксида азота, участвующего в регуляции адаптационных механизмов окислительного метаболизма и сохранении редокс-статуса организма (Gongadze M., et al., 2002, Bakhutashvili A.V., et al., 2001). Плаферон ЛБ обладает способностью ингибировать каспазы 3, 8, и 9, характеризуется апоптоз-ингибирующим действием в условиях гипоксии (Bakhutashvili A.V., et al., 2001).

Препарат Актовегин представляет собой гомогенат телячьей сыворотки, содержащий низкомолекулярные пептиды и нуклеиновые кислоты. Препарат способствует улучшению клеточного метаболизма в тканях посредством усиления транспорта и внутриклеточной утилизации глюкозы и кислорода, способствует ускорению метаболизма АТФ и увеличению энергетических ресурсов клеток. В условиях обусловленной гипоксией повышенной энергетической недостаточности организма Актовегин обеспечивает стимуляцию энергетических процессов, улучшение кровообращения.

Витамин Е – универсальный антиоксидант биологических мембран и липидов крови. Он особенно эффективен во время детоксикации супероксидрадикалов, однако не проявляет активности при взаимодействии с гидроксилрадикалами. В биологических жидкостях особое значение принадлежит С витамину.

Как следует из результатов наших исследований, во время экспериментальной преэклампсии оба использованных нами препарата способствует улучшению окислительного метаболизма организма, что проявляется восстановлением ферментной активности СОД, церулоплазмينا и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (диаграмма 7), снижением интенсивности образования свободнорадикальных форм кислорода и липидов в крови и плаценте (диаграмма 3, 5). Надо отметить, что на фоне воздействия Плаферона ЛБ активность глутатион редуктазы увеличивается, а под действием набора антиоксидантных препаратов не меняется по сравнению со значениями, характерными для преэклампсии.

Плаферон ДБ и набор антиоксидантных препаратов способствовал восстановлению электронно-транспортных цепей митохондрий, участвующих в синтезе АТФ стероидных гормонов (диаграмма 3), увеличению уровня NO в ткани до контрольного уровня за счет снижения интенсивности редокс-зависимой трансформации оксида азота и высвобождения из нитрозилированных комплексов электронно-транспортных белков митохондрий.

Уменьшение уровня реактивных форм кислорода и увеличение содержания свободного оксида азота способствует восстановлению васкуляризации плаценты и активации в ней компенсаторных и регенерационных процессов, что в свою очередь проявляется увеличением объема клеток и ядер, усилением пролиферативной активности синцитиотрофобласт.

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что после лечения набором антиоксидантных препаратов и Плафероном ЛБ в организме морских свинок выявляется активация компенсаторно-восстановительных и регенеративных процессов. В основной части плаценты выявляется ярко выраженная васкуляризация и ангиогенез, резкое увеличение объема клеток и ядер синцитиотрофобласт с высокой пролиферативной активностью. Выявлено также восстановление структурной целостности интерлабиума и лакун. Пролиферация синцитиотрофобласт способствует восстановлению гормонального дисбаланса. Надо отметить, что после лечения на фоне компенсаторно-восстановительных и регенерационных процессов лишь в отдельных участках обнаруживаются микронекротические кровоизлияния фиброзные повреждения кровеносных сосудов, дистрофические изменения синцитиотрофобласт с исключением лакун, единичные очаги кардио- и цитолитического.

Восстановление электроннотранспортной цепи стероидогенеза в митохондриях и интенсификация пролиферации клеток способствует восстановлению гормонального дисбаланса, что проявляется увеличением содержания прогестерона и эстрадиола в крови.

Надо отметить, что в случае применения набора антиоксидантных препаратов в крови выявлено особенно эффективное увеличение уровня эстрадиола и прогестерона (диаграмма 10), что обусловлено непосредственным детоксицирующим воздействием использованных препаратов на реактивные формы кислорода, являющиеся основными виновниками инактивации электронно-транспортных белков стероидогенеза. Нормализация содержания NO в крови под действием Плаферона ЛБ обусловлена хорошо известной модулирующей активностью этого препарата на синтез NO (активность eNOS и iNOS) (Джавахишвили Н., и др., 2001, Gongadze M., et al., 2002). В отличие от набора антиоксидантных препаратов антиоксидантная, NO-модулирующая активность Плаферона ЛБ обусловлена не непосредственным взаимодействием с реактивными формами кислорода и их детоксикацией, а отличными механизмами, включая воздействие на проницаемость мембранных ионных каналов и активность транскрипционных факторов (Нозадзе Л. И др., 2005).

Таким образом, из результатов наших экспериментальных исследований вытекает, что набор антиоксидантных препаратов и Плаферон ЛБ посредством различных механизмов обеспечивают стабилизацию окислительного метаболизма беременных морских свинок и способствуют улучшению васкуляризации плаценты, регенерации синцитиотрофобласт, усилению стероидогенеза, нормализации гормонального гомеостаза и вазомоторной регуляции кровообращения. Эти результаты еще раз подтверждают важную роль окислительного стресса в патогенезе преэклампсии. Таким образом, можно заключить, что окислительный метаболизм является важнейшим регуляторным фактором функционирования плаценты, регулирующим интенсивность энергогенеза, стероидогенеза, синтеза вазореактивных соединений, и этим путем обеспечивает модуляцию иммунной системы, функционирование рецепторов, вазореактивности кровеносных сосудов и определяет исход беременности.

## **ВЫВОДЫ**

1. Окислительный метаболизм является одним из важнейших регуляторных факторов метаболизма плаценты, который определяет интенсивность энергогенеза, стероидогенеза синтеза вазоактивных соединений, обеспечивает модуляцию иммунной системы, функционирования рецепторов, вазореактивности кровеносных сосудов, и определяет исход беременности.
2. Во время физиологической беременности морфоструктурные особенности и неоднородное снабжение кислородом близлежащих к плоду и к матке областей плаценты обеспечивает сравнительно высокую интенсивность окислительного метаболизма в близлежащей к плоду части плаценты, что проявляется изменением содержания соответствующих парамагнитных комплексов (FeS, Fe<sup>3+</sup>-трансферрин, цитохром P-450, Fe<sup>2+</sup>-ионов, HbNO-комплексов).
3. Во время преэклампсии имеет место смена характерной для физиологической беременности умеренной активации процессов свободнорадикального окисления некомпенсируемой интенсификацией окислительного метаболизма и развитием окислительного стресса в организме матери.
4. Во время преэклампсии редокс-зависимая трансформация NO в пероксинитрит и усиленное образование нитрозильных комплексов с гемовыми и негемовыми белками (FeSNO, HbNO) является причиной выявленного нами снижения содержания оксида азота в плаценте.

5. Интенсификация окислительного стресса и редокс-зависимое снижение содержания NO в плаценте способствуют повреждению кровеносных сосудов, развитию дисциркуляторной ишемии, дистрофических изменений в синцитиотрофобластах, очаговых некрозов, острой и хронической недостаточности.
6. Во время преэклампсии редокс-зависимая трансформация NO в перксинитрит, обусловленная повышенным содержанием холестерина и недостатком эстрадиола низкая активность эндотелиальной NO-синтазы способствуют уменьшению содержания оксида азота в крови.
7. Во время преэклампсии в крови беременных женщин и экспериментальных животных увеличение содержание эндотелина-1 является следствием ответной компенсаторной реакции на снижение перфузии плаценты; высокие концентрации эндотелина-1 цитотоксичны, вызывает интенсификацию окислительного стресса в трофобластах, повреждение клеточных мембран эндотелия кровеносных сосудов и усугубление эндотелиальной дисфункции.
8. Во время преэклампсии уменьшение содержания прогестерона и эстрадиола в крови является следствием окислительного повреждения плаценты, увеличения степени окисленности ее электронно-транспортной цепи.
9. Во время физиологической беременности избыток эндогенного лиганда  $\sigma_1$ -рецепторов синцитиотрофобласта, прогестерона, обуславливает развитие в организме матери иммунодепрессии и толерантности по отношению к плоду, снижению образования эндотелина-1, уменьшению реактивности кровеносных сосудов и способствует сохранению беременности.
10. Во время осложненной преэклампсией беременности на фоне снижения содержания прогестерона рожениц резко возрастает количество  $\sigma_1$  рецепторов в плаценте. Последнее обстоятельство обуславливает нарушение электролитного состава, увеличение содержания эндотелина-1, гиперреактивности кровеносных сосудов, развития гипертензии и преэклампсии.
11. На фоне лечения экспериментальной преэклампсии набором антиоксидантных препаратов (Актовегин + витамин С + витамин Е) и Плаферомом ЛБ имеет место стабилизация окислительного метаболизма, усиление стероидогенеза в плаценте, нормализация гормонального гомеостаза и вазомоторной регуляции кровообращения, что способствовало в плаценте улучшению васкуляризации, активации регенерационных и компенсаторных процессов в синцитиотрофобластах.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

- С целью регуляции иммуностатуса организма и возникновения вазореактивных соединений при преэклампсии, целесообразно применение эндогенных блокаторов  $\sigma_1$  рецепторов (стероидных гормонов).
- С целью коррекции окислительного метаболизма плаценты и зависимых от него морфологических (развитие дистрофических и очаговых некрозов, повреждение сосудов) и функциональных (стероидогенез, синтез вазореактивных соединений) изменений при преэклампсии, целесообразно применение антиоксидантных препаратов.

## **СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Изменения показателей липидного обмена и степени деформабельности эритроцитов при беременности, осложненной преэклампсией. Сборник научных трудов ТГМУ. т. XI, 2004 г. ст. 483-485.
2. Роль гиперхолестеринемии в развитии эндотелиальной дисфункции, характерной для преэклампсии. Сборник научных трудов ТГМУ. т. XI, 2004 г. ст. 485-488.
3. Alteracions of Oxidative metabolism at the pregnansy attended with preeklampsia. Annals of biomedical research and education. Tbilisi State Medical University. Vol. 4.Iss. 12. January-March. 2004., p. 34-35.
4. Changes in placental no levels during physiological pregnancy and pregnancy complicated with eclampsia. Annals of biomedical research and education. Tbilisi. State Medical University. Vol. 4. Issue 3. July-September. 2004. p. 141-143.
5. Сравнение некоторых параметров метаболизма у пациентов при физиологической беременности в маточной и фетальной областях. Georgian Medical News. Tbilisi-New York.N7-8 (112-113). Июль-Август. 2004. стр. 26-30.
6. Роль окислительного стресса в плаценте в патогенезе преэклампсии. Georgian Medical News. Tbilisi-New York.N10 (115). Октябрь 2004. стр. 21-24.
7. Роль нарушений окислительного метаболизма в развитии эндотелиальной дисфункции преэклампсии. Georgian Medical News. Tbilisi-New York. N7-11 (115) Октябрь 2004. стр. 21-24.
8. Факторы, участвующие в нарушении метаболизма оксида азота и развитии эндотелиальной дисфункции при преэклампсии. Аллергология и иммунология . Москва, Россия, т. 5, №3. 2004, с. 393-395.
9. Количественные изменения  $\sigma_1$  – рецепторов в плаценте при преэклампсии. Аллергология и иммунология . Москва, Россия, т. 6, №4. 2005, стр.520-522.
10. Роль стероидных гормонов в патогенезе преэклампсии. Аллергология и иммунология . Москва, Россия, т. 7, №1. 2006, стр. 22-24;