

Влияние производных ГАМК на антитромботическую функцию эндотелия и состояние микроциркуляции у животных с экспериментальным гестозом

Кафедра фармакологии и биофармации ФУВ, НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета
e-mail: vnperfilova@mail.ru

Реферат

Выявлено, что в условиях экспериментального гестоза, вызванного заменой питьевой воды на 1,8 %-й NaCl у крыс с первого дня гестации до родов, наблюдаются укорочение времени тромбообразования и нарушения в системе микроциркуляции по сравнению с животными без гестоза. Производные ГАМК-соединения РГПУ-147, РГПУ-189 и препарат сравнения сулодексид снижают скорость формирования тромба и увеличивают линейные и объемные скорости кровотока у самок с экспериментальным гестозом.

Ключевые слова: гестоз, производные ГАМК, тромбообразование, микроциркуляция.

Tyurenkov I. N., Perfilov V. N.,
Ivanova L. B., Karamysheva V. I.

Effect of GABA derivatives on endothelial function and antithrombotic state of the microcirculation in animals with experimental gestosis

Department of Pharmacology and Biopharmaceutics HFCs, Institute of Pharmacology, Volgograd
e-mail: vnperfilova@mail.ru

Abstract

Revealed that in experimental preeclampsia induced by replacing the drinking water at 1,8 % NaCl in rats from the first day of gestation until birth, observed shortening of the clotting time compared with animals without preeclampsia and disorders in the microcirculation. Derivatives of GABA compounds WPC-147 WPC-189 and comparator drug sulodexide reduces the rate of formation of thrombus and increased linear and volumetric blood flow velocity in females with experimental gestosis.

Keywords: preeclampsia, derivative of GABA, thrombosis, microcirculation.

Введение

Проблема гестоза на настоящий момент остается одной из наиболее актуальных в акушерстве из-за высокой частоты встречаемости, тяжести течения и трудности лечения. Значимость проблемы заключается в том, что гестозы оказывают негативное влияние на развитие плода и вызывают ряд состояний, имеющих серьезные последствия для здоровья женщины [1, 5, 18, 19]. Исследования последних лет показали, что ключевым фактором развития этого осложнения беременности является генерализованное повреждение эндотелия сосудов, которое приводит к вазоспазму, повышению тромбогенного потенциала крови, нарушению микроциркуляции [2, 5, 7].

На сегодняшний день патогенетически обоснованным для лечения гестоза является применение антитромбогенных препаратов, улучшающих микроциркуляцию. Однако результаты рандомизированных исследований ставят под сомнение эффективность используемых в клинике в качестве антиагрегантов ингибиторов циклооксигеназы (ацетилсалициловая кислота) и фосфодиэстеразы (дипиридамол) [16, 18, 19]. Антикоагулянт прямого действия гепарин обла-

дает серьезными побочными эффектами и заменяется низкомолекулярными гепаринами (фраксипарин, клексан) [9, 10], однако прогнозировать развитие гепарининдуцированной тромбоцитопении и в том, и в другом случае практически невозможно [3, 4, 10, 14]. Наиболее существенным антитромботическим потенциалом обладает препарат сулодексид, состоящий на 80 % из высокоподвижной гепариноподобной фракции (идурунилгликозаминогликан сульфат) и на 20 % — из дерматансульфата, но и он не лишен побочных эффектов (геморрагический диатез и др.), эффективность его показана на малом количестве исследований в условиях значительной неоднородности групп пациенток с гестозом. В этой связи поиск новых соединений, снижающих тромбообразование и улучшающих микроциркуляцию, остается актуальной задачей репродуктивной медицины.

В ряде исследований было показано, что производные гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) обладают антитромботическими (антиагрегантными и антикоагулянтными) свойствами, улучшают функцию эндотелия и микроциркуляцию. Наряду с

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

этим они оказывают антигипоксическое и антиоксидантное действие, что позволяет предполагать их эффективность в профилактике и лечении гестозов, предупреждении его тромбоэмболических осложнений [6, 12, 13].

Цель исследования

Изучение влияния производных ГАМК на тромбообразование и микроциркуляцию при экспериментальном гестозе.

Материал и методы исследования

В исследовании на 35 беспородных белых крысах-самках массой 220–250 г изучено влияние производных ГАМК — соединений под лабораторными шифрами РГПУ-189 в дозе 15 мг/кг (n=7), РГПУ-147 — 50 мг/кг (n=8) и препарата сравнения сулодексида 30 МЕ/кг (n=7) на скорость тромбообразования и микроциркуляцию в условиях экспериментального гестоза (ЭГ), вызванного заменой питьевой воды на 1,8 %-й раствор NaCl у беременных самок с 1-го дня гестации до родов [15]. Группой позитивного контроля служили беременные самки, принимавшие обычную воду (n=7), в группу негативного контроля входили беременные самки с экспериментальным гестозом (n=6), получавшие физ. раствор в аналогичном с опытными группами режиме. Исследуемые вещества вводились перорально, один раз в день, ежедневно до 20-го дня беременности.

Развитие ЭГ определялось характерной для него триадой симптомов: повышением артериального давления (АД), протеинурией, выраженностью отеочного синдрома.

Измерение артериального давления проводилось у бодрствующих беременных крыс в первый и последний дни гестации неинвазивным методом с использованием компьютерной системы Power Lab/4SP с ML135 Dual Bio и MLA0112 ECG Lead Swich Box.

Определение концентрации белка в суточной моче осуществлялось фотометрически (спектрофотометр ПЭ-5400В («Экрес» Россия)) по реакции с пирогалловым красным (набор реагентов «Ольвекс-диагностикум», Россия) до и на 20-й день беременности. Для сбора мочи беременные самки помещались в метаболические камеры («Евролаб», Россия). Результаты концентрации белка рассчитывались по формуле: $C = C_{\text{станд}} \cdot D_{\text{образец}} / D_{\text{станд}}$, где $C_{\text{станд}}$ — концентрация белка в калибровочном растворе, $D_{\text{станд}}$ и $D_{\text{образец}}$ — оптическая плотность стандартной и опытной проб на длине волны 600 нм, полученный результат умножался на суточный диурез животного.

Состояние микроциркуляции исследовалось на 20-й день гестации наркотизированным (хлоралгидрат 400 мг/кг) крысам при помощи ультразвукового доплерографа («Минимакс-Допплер-К», Санкт-Петербург). Ультразвуковой датчик УЗОП – 010 – 01 с рабочей частотой 25 МГц устанавливался в проекции сосудов брыжейки. Программное обеспечение прибора позволяло характеризовать состояние системы микроциркуляции по следующим параметрам: линейные (V_{as} — максимальная систолическая скорость, V_{am} — средняя скорость, ед. измерения см/с) и объемные скорости кровотока (Q_{as} , Q_{am} , ед. измерения мл/мин). Исследование антитромботической активности соединений проводилось на модели артериального тромбоза у крыс, вызванного поверхностной аппликацией 50 % раствора хлорида железа (III) [17]. Наркотизированным (хлоралгидрат 400 мг/кг) крысам на участок предварительно выделенной сонной артерии длиной 1 см накладывался ватный диск, смоченный 50 % раствором хлорида железа (0,025 мл). Для изоляции окружающих тканей под сосуд помещалась пленка Parafilm. Выше места аппликации устанавливался ультразвуковой датчик доплерографа, регистрация кровотока производилась под звуковым и визуальным контролем до полного исчезновения пульсации в сонной артерии.

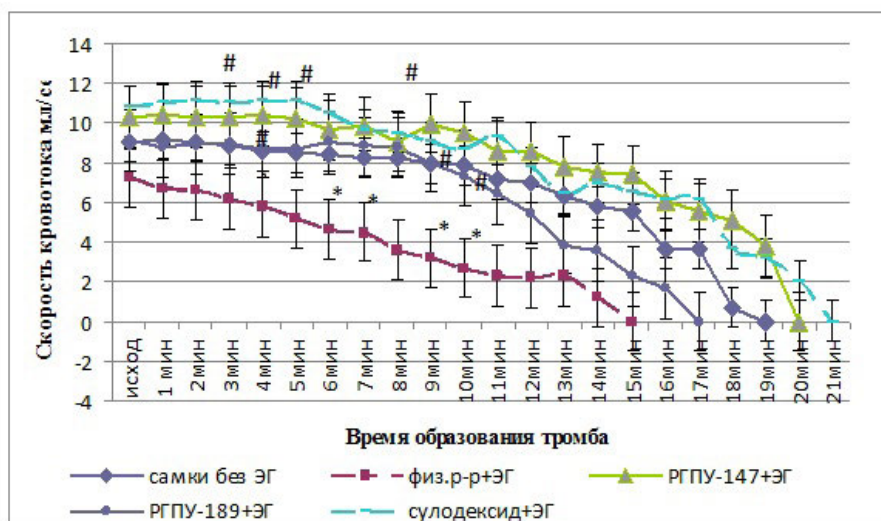


Рис. 1. Влияние соединений РГПУ-147, РГПУ-189 и препарата сравнения сулодексида на скорость тромбообразования у беременных самок с ЭГ: * — данные достоверны относительно беременных самок без ЭГ по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; # — данные достоверны относительно контрольной группы животных с ЭГ по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$

Влияние исследуемых соединений на скорость формирования тромба оценивалось по количеству времени до полного прекращения кровотока от момента наложения раствора хлорида железа (III).

Статистическую обработку результатов проводили в электронной таблице Excel 5.0 с использованием t-критерия Стьюдента при помощи пакета статистических программ Microsoft Excel 2006. Статистически достоверными различия считали при значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В группе самок, принимавших во время беременности вместо питьевой воды 1,8 %-й раствор NaCl, на 20-й день гестации наблюдалось повышение АД на 18,2 %, увеличение концентрации белка в моче в 6,2 раза по сравнению с исходными данными, уменьшение массы препаратов мозга, мышц и сальника после инкубации при 37 °C в течение 24 дней на 74,6; 76,3; 25,3 % соответственно. У животных, получавших во время беременности обычную воду, АД к 20-му дню гестации не изменялось, концентрация белка в моче увеличивалась в 1,4 раза по сравнению с исходными показателями, масса препаратов мозга, мышц и сальника снижалась на 69,7; 73,8 и 17 % соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном повышении АД, белка в моче и отека тканей у животных, принимавших во время беременности 1,8-й % раствор NaCl, что указывает на развитие у них экспериментального гестоза и согласуется с литературными данными [11, 15].

Самки с ЭГ, получавшие во время беременности производные ГАМК-соединения РГПУ-147 и РГПУ-189, а также препарат сравнения сулодексид перорально, один раз в день ежедневно уменьшали выраженность экспериментального гестоза. АД с 1-го по 20-й день беременности у данных групп животных существенно не изменялось. Концентрация белка в моче возрастала в значительно меньшей степени, чем у животных контрольной группы: у самок, получавших соединение РГПУ-147, — в 3,3, соединение РГПУ-189 — в 3, сулодексид — в 4,75 раза по сравнению с исходными данными. Масса препаратов мозга, мышц и сальника снижалась на 73,8; 73,3; 22,9 % (РГПУ-147), на 67; 73; 18,1 % (РГПУ-189) и на 68,3; 74,7; 25 % (сулодексид) соответственно, что свидетельствует о меньшей выраженности отека тканей у животных с ЭГ опытных групп.

Изучение антитромботической функции у крыс с экспериментальным гестозом показало, что на 20-й день беременности исходная линейная скорость кровотока в сонной артерии равнялась $7,21 \pm 1,3$ см/с, что было на 19,4 % ниже по сравнению с таковой у беременных самок без ЭГ ($9,1 \pm 0,7$ см/с). В группах животных, получавших соединения РГПУ-147, РГПУ-189 и препарат сравнения сулодексид, исходная скорость кровотока равнялась $10,3 \pm 3,6$; $9,15 \pm 1,5$ и $10,81 \pm 3,8$ см/сек соответственно ($p \leq 0,05$) и превышала данный показатель контрольной группы животных с экспериментальным гестозом на 41; 25,3 и 48 %. В группе беременных самок без ЭГ полная окклюзия сонной артерии тромбом наблюдалась на

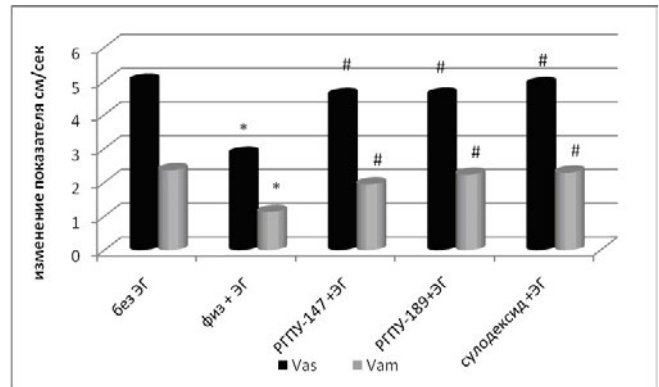


Рис. 2. Влияние соединений РГПУ-147, РГПУ-189 и препарата сравнения сулодексида на максимальную систолическую (Vas) и среднюю (Vam) линейные скорости кровотока у беременных самок с ЭГ

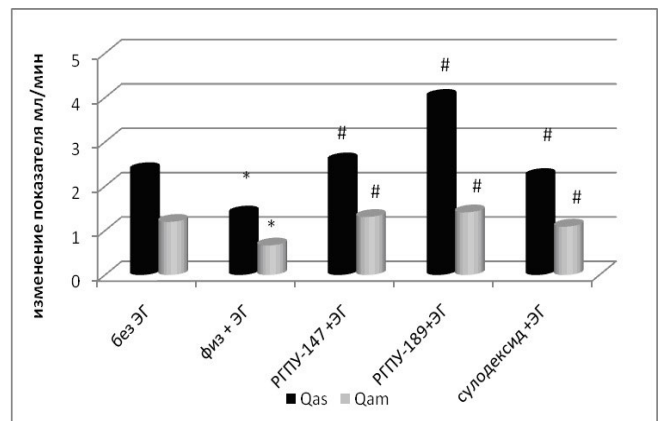


Рис. 3. Влияние соединений РГПУ-147, РГПУ-189 и препарата сравнения сулодексида на максимальную систолическую (Qas) и среднюю (Qam) объемные скорости кровотока у беременных самок с ЭГ

19-й минуте, а у животных с ЭГ полное прекращение кровотока происходило уже к 15-й минуте. У самок с ЭГ, получавших соединения РГПУ-147, РГПУ-189 и препарат сравнения сулодексид формирование тромба и прекращение кровотока в сонной артерии отмечалось на 20-й; 17-й и 21-й мин ($p \leq 0,05$) соответственно (рис. 1), что свидетельствует о снижении скорости образования тромба на 33,3; 13,3 и 40 % по сравнению с контрольной группой животных.

При изучении влияния соединений на микроциркуляцию крови выявлено снижение максимальной систолической и средней линейных скоростей кровотока в сосудах брыжейки у беременных самок с ЭГ на 44 и 52, 5 % по сравнению с таковыми без ЭГ ($p \leq 0,05$). Введение соединений РГПУ-147, РГПУ-189 и препарата сравнения сулодексида в течение периода гестации самкам с осложненной беременностью приводило к повышению максимальной систолической линейной скорости кровотока на 60,7; 64,2; 75 % соответственно, средней линейной скорости — на 73,2; 96; 98 % ($p \leq 0,05$) (рис. 2).

Максимальная систолическая и средняя объемные скорости кровотока в группе негативного контроля уменьшились на 43,4 и 45 % соответственно по сравнению с группой беременных самок без гестоза и были ниже таковых животных с ЭГ, получавших

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

соединение РГПУ-147 Qas — на 49,2 %, Qam — на 49,6 %, соединение РГПУ-189 Qas — на 65,5 %, Qam — на 53,1 %, сулодексид — Qas — на 38,1 %, Qam — на 40 % ($p \leq 0,05$) (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспериментальный гестоз, вызванный заменой питьевой воды на 1,8 %-й раствор NaCl, приводит к повышению тромбогенного потенциала крови и нарушениям микроциркуляции. Производные ГАМК-соединения РГПУ-147, РГПУ-189 и препарат сравнения сулодексид у животных с ЭГ снижают скорость формирования тромба и улучшают микроциркуляцию крови, что проявляется в увеличении времени до полной окклюзии сонной артерии и повышении линейной и объемной скоростей кровотока.

Согласно одной из теорий возникновения гестоза, увеличение тромбогенной активности крови, которое неизбежно приводит к негативным микроциркуляторным изменениям, связано с нарушением функции эндотелия [1, 2]. В норме эндотелий выполняет анти-тромботическую функцию, синтезируя и выделяя в кровь дезагреганты и антикоагулянты. Дисфункция резко меняет направление его эндокринной активности на противоположную — протромботическую.

Увеличение антитромбогенного потенциала крови под влиянием производных ГАМК связано, вероятно, с их эндотелиопротективной активностью, которая была показана в работе [6] и проявлялась в ограничении под влиянием соединений РГПУ-147 и РГПУ-189 нарушений вазодилатирующей (улучшение показателей эндотелийзависимой вазодилатации, повышение стабильности и мощности функционирования системы синтеза NO, снижение сопротивления и увеличение эластичности сосудов), антикоагулянтной (увеличение АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени, снижение уровня фибриногена) и антиагрегантной активности, которая выявлена у производных ГАМК в экспериментах *in vivo*, что может быть связано с индукцией синтеза в эндотелиоцитах веществ, подавляющих адгезию и агрегацию тромбоцитов (простациклин) и *in vitro* — с влиянием на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в тромбоцитах посредством ингибирования кальмодулина [8].

Причинами эндотелиальной дисфункции также могут быть гипоксия и оксидативный стресс. Гипоксия приводит к нарушению окислительных

процессов в митохондриях клеток, накоплению промежуточных метаболитов цикла трикарбоновых кислот и недоокисленных жирных кислот, которые легко подвергаются перекисному окислению с образованием свободных радикалов, ингибирующих антиоксидантные ферменты.

Свободные радикалы оказывают повреждающее действие на мембраны и органеллы клеток, индуцируют гиперкоагуляцию, увеличивают деградацию NO, что усугубляет эндотелиальную дисфункцию. Производные ГАМК, в том числе и РГПУ-147 и РГПУ-189, оказывают антиоксидантное и антигипоксическое действие, что, возможно, вносит определенный вклад в механизм их эндотелиопротекторной и анти-тромботической активности [13].

Таким образом, повышение анти-тромбогенного потенциала крови и улучшение микроциркуляции в условиях ЭГ, вероятно, обусловлено совокупностью эндотелиопротекторных, антиагрегантных и анти-коагулянтных свойств производных ГАМК, способностью улучшать реологические свойства крови, оказывать антигипоксическое и антиоксидантное действие [6, 12, 13].

Выводы

1. Замена питьевой воды на 1,8 %-й раствор NaCl с 1 дня гестации до родов приводит к развитию у беременных самок экспериментального гестоза, о чем свидетельствует повышение АД, протеинурия и выраженный отечный синдром.

2. При ЭГ наблюдаются увеличение тромбогенного потенциала крови и нарушения в системе микроциркуляции, о чем свидетельствует укорочение времени образования тромба и замедление линейных и объемных скоростей кровотока у самок с осложненной беременностью по сравнению с таковыми без ЭГ.

3. Производные ГАМК-соединения РГПУ-147 и РГПУ-189 оказывают выраженное анти-тромботическое действие, улучшают микроциркуляцию у беременных самок с ЭГ, что проявляется в снижении скорости формирования тромба и ограничении редукции скоростей кровотока по сравнению с контрольной группой самок с ЭГ. По эффективности исследуемые соединения сопоставимы с препаратом сравнения сулодексидом.

Литература

1. Аляутдинова, О. С. Значение исследования системы гемостаза при неосложненном течении беременности и прогнозирования тромбгеморрагических осложнений / О. С. Аляутдинова, Л. М. Смирнова // *Акушерство и гинекология*. — 1999. — № 2. — С. 18–23.
2. Баев, О. Р. Профилактика и лечение нарушений в системе гемостаза при гестозе / О. Р. Баев, А. А. Чурганова // *Вопросы гинекол., акушерства и перинатол.* — 2008. — Т. 7. — № 5. — С. 59–67.
3. Баркаган, З. С. Клиническое значение и проблемы

лечения больных с индуцированной гепарином тромбоцитопенией / З. С. Баркаган // *Терапевт. арх.* — 1999. — № 7. — С. 72–76.

4. Баркаган, З. С. Применение низкомолекулярных гепаринов при беременности / З. С. Баркаган [et al] // *Клин. фармаколог. терминолог.* — 1998. — № 4. — С. 21–24.

5. Венцовский, Б. М. Поздние гестозы беременных / Б. М. Венцовский, А. А. Богомольца, А. А. Ходак // *Здоровья Украины*. — 2004. — № 7. — С. 21–23.

6. Воронков, А. В. Эндотелиальная дисфункция и

пути ее фармакологической коррекции: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / А. В. Воронков. — Волгоград, 2011. — 46 с.

7. Зайнулина, М. С. Тромбофилия: этиологический фактор или патогенетический аспект осложненного течения беременности / М. С. Зайнулина, Е. А. Корнюшина, Д. Р. Бикмулина // Журн. акушерства и женских болезней. — 2010. — Т. LIX. — № 1. — С. 18–30.

8. Ледеяев, М. Я. Влияние новых соединений — производных гамма-аминомасляной кислоты на агрегацию тромбоцитов и свертывание крови: автореф. дис. ... канд. мед. наук / М. Я. Ледеяев. — М., 1986. — 23 с.

9. Мочалов, А. А. Нарушения в системе гемостаза и его коррекция у беременных с метаболическим синдромом / А. А. Мочалов [и др.] // Лечащий врач. — 2011. — № 3. — С. 43–47.

10. Мурашко, А. В. Роль антиагрегантов в акушерской практике / А. В. Мурашко, З. Х. Кумыкова // Consilium Medicum. Акушерство. — 2006. — Т. 8. — № 6. — С. 12–16.

11. Мясникова, В. В. Нарушение в системе легкиеплацента в условиях экспериментального гестоза у крыс / В. В. Мясникова [и др.] // Бюлл. эксперимент. биол. и мед. — 2005. — № 140 (7). — С. 24–27.

12. Перфилова, В. Н. Изменения функционирования системы микроциркуляции под влиянием нового производного ГАМК — соединения РГПУ-147 при хроническом стрессорном воздействии / В. Н. Перфилова [и др.] // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2007. — № 4. — С. 64–67.

13. Перфилова, В. Н. Влияние структурного аналога ГАМК на выраженность процессов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в условиях ишемического повреждения миокарда / В. Н. Перфилова [и др.] // Вестник Волгоград. мед. ун-та. — 2010. — Вып. 1 (33). — С. 74–76.

14. Пестрикова, Т. Ю. Коррекция гиперкоагуляционного синдрома у беременных группы риска невынашивания беременности / Т. Ю. Пестрикова, Е. А. Юрсова, В. А. Ткаченко // Российский вестник акушера-гинеколога. — 2009. — № 4. — С. 59–62.

15. Beausejour, A. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat / A. Beausejour [et al] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2003. — Vol. 285. — P. 375–383.

16. Chiaffarino, F. A small randomized trial of low-dose aspirin in women at high risk of pre-eclampsia / F. Chiaffarino [et al] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. — 2004. — № 112. — P. 142–144.

17. Kurz, K. D. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride / K. D. Kurz, B. W. Main, G. E. Sandusky // Thromb. Res. — 1990. — Vol. 15. — P. 269–280.

18. Pipkin, F. B. Where next for prophylaxis against pre-eclampsia? / F. B. Pipkin [et al] // Br. J. Obstet. Gynecol. — 1996. — № 103. — P. 603–607.

19. Walsh, S. W. Eicosanoids in preeclampsia. Prostaglandins Leukot / S. W. Walsh // Essent. Fatty Acids. — 2004. — № 70. — P. 223–232.