

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Мороз А.С.¹, Семенникова С.В.³, Копылова С.В.¹, Строганов А.Б.²

Активность окислительных процессов при эндометрите у крыс

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского» Минобрнауки России,

603950, г. Нижний Новгород, Россия, пр. Гагарина, д. 23;

²ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, 603950, ГСП-470, г. Нижний Новгород, Россия, пл. Минина и Пожарского, д.10/1;

³ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА РФ, 603109, г. Нижний Новгород, Россия, ул. Ильинская, д. 14

Введение. Проблема лечения эндометрита связана в первую очередь с трудностями своевременной дифференциальной диагностики и отсутствием четких клинико-лабораторных критериев. Женщины с хроническим эндометритом в анамнезе даже при условии прегравидарной подготовки составляют группу высокого риска по развитию акушерских и перинатальных осложнений, причиной которых является внутриматочная инфекция. Возбудителями являются прежде всего микроорганизмы, поражающие цилиндрический эпителий канала шейки матки: гонококки и хламидии, мико- и уреоплазмы, которые снижают защитные свойства шейечной слизи, что облегчает распространение восходящей инфекции.

Цель исследования -- поиск значимых лабораторных критериев диагностики эндометрита в эксперименте.

Методика. Опыты проведены на крысах Wistar, массой 180-200 г. Эндометрит моделировали путем ретроградного введения взвеси аутокалла в полость матки с помощью спринцевания. Маркерами окислительных процессов в организме были выбраны показатели перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков. Активность перекисного окисления липидов оценивали по содержанию в плазме крови диеновых и триеновых конъюгатов и оснований Шиффа. Уровень окислительной модификации белков изучали в реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков плазмы с 2,4-динитро-фенилгидразином с образованием альдегид- и кетондинитрофенилгидразонов основного и нейтрального характера, которые регистрировали спектрофотометрически.

Результаты. Показано, что у крыс с эндометритом возрастало количество инициальных и конечных продуктов перекисного окисления липидов. При оценке активности окислительной модификации белков в плазме крови показано повышение концентрации карбонильных производных окисленных белков нейтрального и основного характера.

Заключение. Выявленный эффект может быть опосредован повышенным уровнем активных форм кислорода, образующихся при действии бактериальной флоры, а также защитной реакцией нейтрофилов, реагирующих на появление антигенных агентов. Можно полагать, что под воздействием продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков происходит повреждение мембран клеток эндометрия, что может быть одной из причин расстройства репродукции, синдрома хронической тазовой боли и развития бесплодия. Данные могут быть использованы для объективизации критериев и ранней лабораторной диагностики эндометрита.

Ключевые слова: эндометрий; эндометрит; перекисное окисление липидов; окислительная модификация белка.

Для цитирования: Мороз А.С., Семенникова С.В., Копылова С.В., Строганов А.Б. Изучение активности окислительных процессов при экспериментальном моделировании эндометрита у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 101-104.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.101-104

Для корреспонденции: Копылова Светлана Вячеславовна, e-mail: gorelaya@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.04.2018

Moroz A.S.¹, Semennikova S.V.³, Kopylova S.V.¹, Stroganov A.B.²

Activity of oxidative processes in rat endometritis

¹N.I. Lobachevsky Research State University of Nizhny Novgorod, Prospekt Gagarina 23, Nizhny Novgorod 603950, Russia;

²Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ploshchad Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

³Privolzhsky District Medical Center, Iljinskaya Str. 14, Nizhny Novgorod 603109, Russia

Summary. The challenge of treating endometritis is associated primarily with the difficulty of timely differential diagnosis and the absence of distinct clinical and laboratory criteria. Women with a history of chronic endometritis, even with a pregravid preparation, constitute a high-risk group for the development of obstetric and perinatal complications caused by intrauterine infection. The pathogens are primarily microorganisms that affect the cylindrical epithelium of cervical canal, gonococci, chlamydia, myco- and ureaplasmas, which impair protective properties of the cervical mucus and facilitate the spread of ascending infection. **The aim** of the study was experimental searching for significant and reliable laboratory criteria for the diagnosis of endometritis. **Methods.** Experiments were performed on Wistar female rats weighing 180-200 g. Animals were divided into the groups of intact animals and experimental animals with endometritis induced by retrograde injection of auto feces suspension into the uterine cavity by douching. Markers of oxidative processes included products of lipid peroxidation (LP) (triene and diene conjugates and Schiff bases) and protein oxidation (protein carbonyls) in rat plasma. **Results.** Plasma concentrations of initial and final LP products as well as of neutral and basic carbonylated proteins were increased in rats with experimental endometritis. **Conclusion.** The observed effect of experimental endometritis was apparently due to increased production of reactive oxygen species by the bacterial flora administered into the rat uterine cavity. In addition, this effect could result from the protective response of neutrophils to antigenic agents. Apparently, both LP products and oxidation-modified proteins damage cell membranes including endometrial membranes, which may cause reproductive disorders, chronic pelvic pain, and infertility. In future, after clinical studies, these indexes could be used to enhance objective and early laboratory diagnosis of endometritis.

Key words: endometrium; endometritis; lipid peroxidation; oxidative modification of proteins.

For citation: Moroz A.S., Cherkunova O.S., Khlyuneva T.Yu., Kilberger K.A., Semennikova S.V., Kopylova S.V., Stroganov A.B. Activity of oxidative processes in rat endometritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 101-104. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.101-104

For correspondence: Svetlana V. Kopylova, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Physiology, Institute of Biology and Biomedicine, UNN; 23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation, e-mail: gorelaya@mail.ru

Information about authors:

Moroz A.S., <http://orcid.org/0000-0002-5028-2486>

Semennikova S.V., <http://orcid.org/0000-0002-6466-0020>

Kopylova S.V., <http://orcid.org/0000-0002-5527-9075>

Stroganov A.B. <http://orcid.org/0000-0002-7106-4760>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 27.04.2018

Введение

Проблема лечения эндометрита, связана в первую очередь с трудностями своевременной дифференциальной диагностики и отсутствием четких клинико-лабораторных критериев. Женщины с хроническим эндометритом в анамнезе даже при условии прегравидарной подготовки составляют группу высокого риска по развитию акушерских и перинатальных осложнений, причиной которых является внутриматочная инфекция. Беременность у женщин с эндометритом статистически значимо чаще осложняется угрозой прерывания (28%) и хронической плацентарной недостаточностью (25%). При этом лишь у 16% пациенток диагностируются какие-либо значимые воспалительные изменения в общем анализе крови, не связанные с экстрагенитальной патологией [1]. Особенностью эндометрита является частый переход восходящей инфекции на маточные

трубы. Возбудителями являются прежде всего микроорганизмы, поражающие цилиндрический эпителий канала шейки матки: гонококки и хламидии, мико- и уреоплазмы, которые снижают защитные свойства шеечной слизи, что распространение восходящей инфекции [2]. Цель исследования – поиск значимых лабораторных критериев диагностики эндометрита в условиях эксперимента.

Методика

Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.77), Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. и ФЗ РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997. Работа одобрена локальным этическим

комитетом. В задачи работы входило изучение активности окислительных процессов при моделировании эндометрита у крыс. Для исследования использовано 40 половозрелых крыс-самок Wistar массой 0,18-0,2 кг из питомника лабораторных животных филиала «Андреевка» ФГБУН БМТ ФМБА России, Московская область. Животных содержали в виварии, оборудованном согласно требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» № 1045-73. Крысы находились в одинаковых пластиковых клетках с поилками, получали полноценный экструдированный комбикорм и свободный доступ к воде.

Животные были разделены на 2 группы: интактные (контроль) и животные, у которых воспроизводили эндометрит (опыт) по модифицированной нами методике К.Ю. Тихаевой и соавт. [3]. Эндометрит моделировали ретроградным введением взвеси аутокалла в полость матки с помощью спринцевания. Активность процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию в плазме крови диеновых и триеновых конъюгатов и оснований Шиффа [5]. Уровень окислительного модифицирования белков (ОМБ) изучали в реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков плазмы крови крыс с 2,4-динитро-фенилгидразином (2,4-ДФГ) с образованием альдегид- и кетондинитрофенилгидразонов основного и нейтрального характера ($\text{АДНФГ}_{\text{нейтр}}$, $\text{АДНФГ}_{\text{осн}}$, $\text{КДНФГ}_{\text{нейтр}}$, $\text{КДНФГ}_{\text{осн}}$), которые регистрировали спектрофотометрически при длинах волн от 230 до 535 нм. Для проведения измерений экстинкций в тестах использовался спектрофотометр СФ-2000 (Санкт-Петербург, Россия). С целью определения степени выраженности и стадии окислительного стресса вычисляли площадь под кривой спектра окислительной модификации белков [6]. Полученное значение площади под кривой делили на содержание общего белка плазмы крови крыс (г/л) и окончательное значение выражали в единицах оптической плотности/грамм белка (ед. $\text{ОП}_{\text{нм}}/\text{г}$ белка).

Забор крови производили из подъязычной вены на 10 сут после моделирования эндометрита. Уровень физиологической нормы определяли у интактных животных. Полученные данные обработаны с помощью пакетов прикладных программ BIOSTAT и Microsoft Excel с использованием t-критерия Стьюдента, результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$ [7].

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного эксперимента показали, что в плазме крови у крыс группы «опыт» статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивалось количество инициальных и конечных продуктов ПОЛ — диеновых и триеновых конъюгатов на 18% и 53%, соответственно и оснований Шиффа в 2,8 раза по сравнению с интактными животными. Интенсификация процессов ПОЛ подтверждалась повышением соотношения «основания Шиффа/диеновые конъюгаты» в 2,4 раза. Подъем уровня диеновых и триеновых конъюгатов свидетельствовал об инициации процессов окисления, а увеличение концентрации оснований Шиффа — о дестабилизации мембран, в том числе, и мембран клеток эндометрия.

Помимо активации процессов ПОЛ наблюдалось увеличение интенсивности окислительной модификации белков, которая статистически значимо усиливалась в 2,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «интактные животные».

Содержание первичных маркеров окислительного стресса в нашем эксперименте составило 8,03 ед. $\text{ОП}_{\text{нм}}/\text{грамм}$ белка, содержание вторичных маркеров составило 3,10 ед. $\text{ОП}_{\text{нм}}/\text{грамм}$ белка, что превышало интактные значения более чем в 2 раза.

При сопоставлении между собой изучаемых показателей (таблица) оказалось, что у опытных животных концентрации $\text{АДНФГ}_{\text{нейтр}}$ и $\text{КДНФГ}_{\text{нейтр}}$ возросла в 2 и 2,5 раза соответственно, а $\text{АДНФГ}_{\text{осн}}$ и $\text{КДНФГ}_{\text{осн}}$ — в 4 раза относительно интактных животных.

Таблица

Влияние экспериментального эндометрита на интенсивность окислительной модификации белков (ед. $\text{ОП}_{\text{нм}}/\text{грамм}$ белка) в плазме крыс

	АДНФГ		КДНФГ		ОМБ
	Нейтральные	Основные	Нейтральные	Основные	
Интактные	3,23±0,31	0,3±0,04	1,09±0,30	0,01±0,00	4,63±0,67
Эндометрит	6,83±1,51*	1,2±0,34*	2,7±0,7*	0,04±0,01*	10,77±1,05*

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «интактные животные».

Изменения, выявленные в плазме крови экспериментальных животных, свидетельствуют об увеличении интенсивности окислительного стресса в организме. В процессе ПОЛ равновесие смещается в направлении образования конечных продуктов липопероксидации, таких как основания Шиффа, что может привести к образованию цитотоксических веществ и создать потенциальную угрозу организму. Можно полагать, что в результате ОМБ усиливается как фрагментация, так и агрегация белковых молекул. Наиболее важным следствием этого может являться ингибирование ферментов [8].

Заключение

Таким образом, под воздействием как продуктов перекисного окисления липидов, так и окислительной модификации белков, происходит деградация мембран клеток эндометрия, что может являться одной из причин расстройства репродукции, синдрома хронической тазовой боли и развития бесплодия. После клинической части исследования в перспективе, возможно использование данных показателей с целью объективизации критериев и ранней лабораторной диагностики эндометрита.

Литература

1. Долгушина В.Ф., Курносенко И.В., Спиридонова К.С., Хитрова М.Н. Особенности течения беременности, родов, послеродового периода у женщин с хроническим эндометритом в анамнезе. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*. 2014; 3: 65-8.
2. Agraval V., Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2012; 17(1): 12-9.
3. Тихаева К.Ю., Ткаченко Л.В., Рогова Л.Н., Куркин Д.В. Метод моделирования хронического воспаления эндометрия и его патогенетическое обоснование. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2015; 45(1): 31-4.
4. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 1: 127-1

Сведения об авторах:

Мороз Анастасия Сергеевна, аспирант каф. физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского; (25%)

Семенникова Софья Владимировна, канд. мед. наук, зав. физиотерапевтическим отделением ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России, (25%)

Копылова Светлана Вячеславовна, канд. биол. наук, доцент каф. биохимии и физиологии Института биологии и биомедицины, e-mail: gorelaya@mail.ru (25%)

Строганов Андрей Борисович, доктор мед. наук, доцент, доц. каф. урологии им. Е.В. Шахова ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России (25%)

5. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порогов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопросы медицинской химии*. 1995; 1: 24-6.
6. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. Окислительная модификация белков и активность катепсина Н тимомитов крыс в условиях in vitro модулирования синтеза оксида азота (II). *Казанский медицинский журнал*. 2014; 95(4): 553-7.
7. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.; Практика; 1998.
8. Обухова Л.М., Ерлыкина Е.И., Копытова Т.В. Белки плазмы крови и свободнорадикальная активность при злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей. *Вестник удмуртского университета*. 2017; 27(3): 380-5.

References

1. Dolgushina V.F., Kurnosenko I.V., Spiridonova K.S., Khitrova M.N. Features of the course of pregnancy, childbirth, the postpartum period in women with a chronic history of endometritis. *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik*. 2014; 3: 65-8. (in Russian)
2. Agraval V., Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2012; 17(1): 12-9.
3. Tikhayeva K.Yu., Tkachenko L.V., Rogova L.N., Kurkin D.V. The method of modeling chronic inflammation of the endometrium and its pathogenetic justification. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2015; 45(1): 31-4. (in Russian)
4. Volchegorsky I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G., Lifshits R.I. Comparison of different approaches to the definition of LPO products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1989; 1: 127-31. (in Russian)
5. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porogov I.G. Oxidative modification of human serum proteins, method of its determination. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1995; 1: 24-6. (in Russian)
6. Abalenikhina Yu.V., Fomina M.A. Protein oxidative modification and cathepsin H activity in rats' thymocytes at nitrogen oxide (II) synthesis modulation in vitro. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 95(4): 553-7. (in Russian)
7. Glanz S. *Medico-biological statistics. [Mediko-biologicheskaya statistika]*. Moscow; Praktika; 1998. (in Russian)
8. Obukhova L.M., Erlykina E.I., Kopytova T.V. Blood plasma proteins and free radical activity of neoplasm tumors of epithelial tissues. *Vestnik udmurtskogo universiteta*. 2017; 27(3): 380-5. (in Russian)