

С.Б. Назаров^{1,2}, А.С. Иванова¹, А.А. Новиков¹

Продукция оксида азота у беременных крыс и особенности постнатального системогенеза у их потомства, развивавшегося при нарушении маточно-плацентарного кровообращения

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 153012, Иваново, пр. Энгельса, 8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 153045, Иваново, ул. Победы, 8

Нарушение маточно-плацентарного кровообращения у белых крыс значительно снижает процент выживаемости потомства. Гиперфункция эритроцитарной системы и NO-зависимых механизмов регуляции в первые дни жизни крысят приводит в последствии к истощению их функциональных резервов.

Ключевые слова: оксид азота, беременность, гипоксия, системогенез

S.B. Nazarov^{1,2}, A.S. Ivanova¹, A.A. Novicov¹

Nitric oxide production at pregnant rats and feature postnatal systemogenesis at their posterity developing at insufficiency of disturbance of utero-placental blood circulation

¹ Ivanovo State Medical Academy, 8, Engels str., Ivanovo, 153462, Russia

² V.N. Gorodkov Ivanovo State Research Institute of Maternity and Childhood, 20, Pobeda str., Ivanovo, 153045, Russia

Disturbance of uteroplacental circulation at white rats considerably reduces percent of survival rate of posterity. Hyperfunction of erythrocyte system and NO-dependent mechanisms of regulation in the first days of pups' life results in an exhaustion of their functional reserves.

Key words: nitric oxide, pregnancy, hypoxia, systemogenesis

Нарушение маточно-плацентарного кровообращения (НМПК) является одним из ведущих факторов, приводящих к нарушению внутриутробного развития плода. Возникающие на фоне данной патологии изменения газового состава крови, трофики и метаболизма способствуют развитию внутриутробной гипоксии, приводящей к повреждению органов и систем плода, что является одной из причин перинатальной заболеваемости и смертности [4, 13]. Кроме того, хроническая кислородная недостаточность влечет за собой нарушение процессов адаптации плода к родам и переходу к внеутробным условиям существования [6].

Влияние НМПК на плод в настоящее время активно изучается. Наиболее адекватны для решения этих вопросов — экспериментальные исследования, в

связи с невозможностью проведения в клинике исследований на уровне органов и тканей [15].

В последние годы значительно возрос интерес к оксиду азота — соединению с широким спектром действия. Он может выступать фактором как патологического, так и саногенеза при НМПК [14]. По данным литературы, в условиях кислородного голодания организма концентрация оксида азота и его метаболитов в крови меняется, что, по всей видимости, свидетельствует о переходе клеток на нитритно-нитратный способ дыхания [5].

Цель исследования — оценка состояния NO-зависимых механизмов у беременных крыс при экспериментальном НМПК и выявления особенности постнатального системогенеза у их потомства.

Методика

Исследования проведены на 228 белых беспородных крысах. В эксперименте использовано 43 плода белых крыс в возрасте 22 дней и 136 крысят в возра-

Для переписки: Иванова Анастасия Сергеевна, канд. мед. наук, ст. преп. кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «ИвГМА» Минздравсоцразвития России. E-mail: asivanova@mail.ru

сте 2, 15 и 30 дней после рождения. Первый день беременности регистрировался по обнаружению сперматозоидов во влагалищных мазках. Взрослые животные были разделены на 3 группы: 1-я — интактные беременные крысы-самки; 2-я — животные с НМПК; 3-я — ложнопериованные крысы-самки (контроль). Нарушения маточно-плацентарного кровообращения воспроизвели по методике М.М. Варгановой [3] путем перевязки части преплацентарного сосудистого пучка на 16-й день беременности, т.е. в тот период, когда плацентация уже завершена и плод полностью переходит на плацентарное кровообращение.

Использование в эксперименте плодов в возрасте 22 дней и крысят в возрасте 2, 15 и 30 дней после рождения связано с важностью этого периода жизни в становлении эритроцитарной системы.

На 22-е сут. беременности у самок определяли содержание эритроцитов, гемоглобина (унифицированными методами) и концентрацию суммарных нитратов и нитритов (NO_x) по методике Miranda K. [2001]. У плодов и крысят определяли массу тела и жизненно важных органов (сердца, головного мозга, печени, селезенки, почек). В крови определяли содержание эритроцитов и гемоглобина, показатель гематокрита. Состояние эритропоэза оценивали по содержанию ре-

Таблица 1

Динамика изменения концентрации NO_x , массы тела и жизненно важных органов у потомства белых крыс в норме и при НМПК

Показатели	Возраст	Контроль	НМПК
Концентрация NO_x (ммоль/л)	22-дневные плоды	194,3 ± 21,48	177,1 ± 23,66
	2-дневные	146,1 ± 13,12	343,8 ± 24,18*
	15-дневные	210,3 ± 31,15	196,5 ± 28,23
	30-дневные	244,5 ± 44,41	136,4 ± 30,26*
Масса тела (г)	22-дневные плоды	4,94 ± 0,12	4,79 ± 0,20
	2-дневные	5,75 ± 0,21	6,68 ± 0,30*
	15-дневные	20,74 ± 0,66	17,01 ± 1,11*
	30-дневные	35,01 ± 1,04	36,37 ± 1,10
Масса мозга (мг)	22-дневные плоды	205,7 ± 7,38	192,2 ± 5,72
	2-дневные	292,2 ± 8,55	276,9 ± 11,0
	15-дневные	1106,2 ± 22,1	1020,2 ± 59,3
	30-дневные	1306,0 ± 19,4	1330,6 ± 17,4
Масса печени (мг)	22-дневные плоды	325,7 ± 12,28	302,3 ± 16,96
	2-дневные	273,5 ± 9,97	263,9 ± 16,7
	15-дневные	613,3 ± 28,3	501,1 ± 36,5*
	30-дневные	1720,7 ± 74,9	1726,6 ± 80,85
Масса сердца (мг)	22-дневные плоды	29,32 ± 0,98	27,60 ± 1,01
	2-дневные	37,65 ± 1,59	37,64 ± 3,63
	15-дневные	118,1 ± 6,02	105,8 ± 8,04
	30-дневные	195,6 ± 3,97	211,64 ± 7,89*
Масса селезенки (мг)	22-дневные плоды	6,88 ± 0,52	5,94 ± 0,56
	2-дневные	26,25 ± 3,06	18,17 ± 2,82
	15-дневные	56,26 ± 3,48	42,82 ± 3,15*
	30-дневные	98,13 ± 4,73	120,5 ± 7,56*
Масса правой почки (мг)	22-дневные плоды	18,84 ± 1,01	17,08 ± 0,98
	2-дневные	38,25 ± 1,40	35,41 ± 2,39
	15-дневные	121,9 ± 4,17	100,4 ± 6,30*
	30-дневные	200,5 ± 4,47	229,1 ± 10,3*
Масса левой почки (мг)	22-дневные плоды	18,60 ± 0,82	17,13 ± 0,91
	2-дневные	37,72 ± 1,30	34,61 ± 2,50
	15-дневные	120,7 ± 4,97	95,73 ± 6,52*
	30-дневные	193,5 ± 3,75	220,0 ± 10,6*

Примечание. Здесь и далее * — достоверное отличие от контрольных значений ($p < 0,05$).

тикулоцитов в крови, эритроидных клеток в органах кроветворения (печень, селезенка, красный костный мозг). Определяли диаметр эритроцитов с использованием анализатора изображений «Видео-Тест» с компьютерной программой Global Lab Image. Концентрацию суммарных нитратов и нитритов (NO_x) оценивали по методике Miranda K. [2001].

Эвтаназия взрослых животных производилась под нембуталовым наркозом (50 мг/кг) путем дислокации шейных позвонков, крысят — под эфирным наркозом путем декапитации.

Статистическая обработка данных проведена методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В исследуемых показатели взрослых крыс, а также плодов и крысят 1-й и 3-й групп существенных различий не выявлено.

При НМПК у взрослых животных содержание эритроцитов и гемоглобина существенно не меняется. В сыворотке крови достоверно снижается концентрация NO_x от $242,7 \pm 23,86$ ммоль/л в 1-й группе до $165,6 \pm 8,36$ ммоль/л в 3-й группе. Нарушение продукции NO можно объяснить возникновением при перевязке преаортального сосудистого пучка эндотелиальной дисфункции, связанной с облитерацией части сосудов на фоне гипоксии плода. В усло-

виях снижения синтеза оксида азота происходит повреждение эндотелиоцитов, нарушается реология крови, повышается активность ангиотензина, что в совокупности приводит к нарушению микроциркуляции, возникновению многоочаговой тканевой гипоксии, которая еще более усугубляет степень повреждения сосудов и сопряженных с этим осложнений у плода [1].

При анализе продукции оксида азота в постнатальном онтогенезе на фоне НМПК выявлено повышение его образования у 2-дневных крысят (табл. 1). Однако в дальнейшем содержание нитритов в крови животных постепенно снижается и на 15-е сут. имеет значения сходные с таковыми у крысят интактных беременных самок. К 30-м сут. концентрация нитритов в крови крысят 2-й группы существенно снижается по сравнению с контролем, что может свидетельствовать об истощении функциональных резервов NO-зависимых механизмов регуляции.

НМПК существенно снижает процент выживаемости потомства у белых крыс: в случае НМПК этот показатель составляет 41%, тогда как в контроле он равен 64%.

При оценке массы тела и жизненно важных органов установлено, что у плодов и 2-дневных крысят, развивавшегося при НМПК, отмечаются сходные с контролем показатели массы тела и жизненно важных органов, что можно объяснить активацией ком-

Таблица 2

Состояние эритроцитарной системы у потомства белых крыс в норме и при НМПК

Показатели	Возраст	Контроль	НМПК
Концентрация эритроцитов (Т/л)	22-дневные плоды	$1,64 \pm 0,07$	$1,72 \pm 0,14$
	2-дневные	$2,71 \pm 0,33$	$3,42 \pm 0,31$
	15-дневные	$3,42 \pm 0,17$	$3,73 \pm 0,19$
	30-дневные	$5,64 \pm 0,14$	$4,81 \pm 0,15^*$
Концентрация гемоглобина (г/л)	22-дневные плоды	$86,88 \pm 2,77$	$89,04 \pm 4,47$
	2-дневные	$100,0 \pm 1,75$	$102,1 \pm 3,47$
	15-дневные	$91,26 \pm 1,79$	$92,35 \pm 1,73$
	30-дневные	$113,9 \pm 2,29$	$92,0 \pm 4,45^*$
Концентрация ретикулоцитов (%)	22-дневные плоды	$928,1 \pm 6,32$	$966,5 \pm 4,15^*$
	2-дневные	$491,1 \pm 24,8$	$548,5 \pm 31,5$
	15-дневные	$174,3 \pm 10,4$	$289,3 \pm 25,1^*$
	30-дневные	$91,33 \pm 14,9$	$91,93 \pm 9,66$
Содержание эритроидных клеток в красном костном мозге (%)	22-дневные плоды	$6,00 \pm 0,98$	$8,72 \pm 0,69^*$
	2-дневные	$15,62 \pm 1,36$	$23,71 \pm 1,32^*$
	15-дневные	$25,50 \pm 1,28$	$20,06 \pm 0,07^*$
	30-дневные	$34,77 \pm 2,02$	$35,28 \pm 2,01$
Содержание эритроидных клеток в печени (%)	22-дневные плоды	$26,17 \pm 1,02$	$29,76 \pm 1,35^*$
	2-дневные	$19,21 \pm 1,37$	$23,50 \pm 1,52^*$
	15-дневные	$2,24 \pm 0,36$	$1,06 \pm 0,26^*$
	30-дневные	$0,00 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,10$

пенсаторно-приспособительных механизмов и гиперфункцией органов в ответ на воздействие гипоксии (табл. 1). К 15-му дню жизни выявляется уменьшение основных соматометрических показателей. К 30-му дню, как правило, у животных 2-й группы нами отмечена тенденция к возрастанию массы органов. По данным литературы, в постнатальном онтогенезе при НМПК продукция соматотропного гормона, гормонов щитовидной железы, инсулиноподобного фактора роста IGF-1 достоверно не меняется по сравнению с интактными животными [12]. Активность NO-зависимых процессов при задержке внутриутробного развития является одним из ведущих патогенетических факторов, так как оксид азота влияет на рост мышечной ткани и адипоцитов [10]. В то же время, хроническая гипоксия изменяет работу генов, ответственных за рост практически всех органов и тканей [9, 11].

При НМПК происходят преобразования в эритроцитарной системе потомства белых крыс (табл. 2). Известно, что хроническая внутриутробная гипоксия плода, как правило, сопровождается усилением процессов гемопоэза. Анализ полученных нами данных показал, что у плодов и крысят в возрасте 2 и 15 дней концентрация эритроцитов, гемоглобина и показатель гематокрита имели значения сходные с таковыми у контрольных животных. Реакция крови на гипоксию не всегда обнаруживает заметные изменения показателей периферической крови, что может быть связано с ацидотической альтерацией красных клеток у крысят после НМПК [7]. Кроме того, возникновение ацидоза в условиях дефицита кислорода стимулирует взаимодействие макрофагов с эритроцитами, активируя их фагоцитоз [8]. Наблюдаемая на 30-й день эритропения, снижение концентрации гемоглобина и гематокрита у животных, развивавшихся при НМПК, скорее всего, связаны с гиперфункцией эритроцитарной системы в пренатальном и ранний постнатальный периоды жизни, что в конечном итоге привело к истощению ее функциональных резервов.

НМПК приводит к возрастанию среднего диаметра эритроцитов у плодов. Напряженность процессов эритропоэза приводит к тому, что у крысят 2-й группы на 30-е сутки развивается микроцитоз.

Исследование состояния кроветворения показало, что НМПК приводит к развитию выраженного ретикулоцитоза у плодов и 15-дневных крысят (табл. 2). Значительное возрастание концентрации ретикулоцитов в крови плодов данной экспериментальной группы, по всей видимости, свидетельствует об интенсивном процессе эритропоэза. В то же время, выраженный ацидоз, которым сопровождается хроническая внутриутробная гипоксия, может способствовать бы-

строму разрушению эритроцитов, а продукты разрушения красных клеток крови являются одним из главных факторов регулирующих эритропоэз [2]. Наличие ретикулоцитоза у 15-дневных крысят после НМПК может быть связано с некоторым замедлением созревания ретикулоцитов, что является негативным следствием воздействия внутриутробной гипоксии.

Анализ состояния кроветворения в печени, которая является основным плацдармом кроветворения в данный период онтогенеза, показал, что во внутриутробный период и у 2-дневных крысят после НМПК его уровень находится на достаточно высоком уровне и превышает его контрольные значения. 15-й день жизни крысят 2-й группы сопровождается значительным снижением темпов кроветворения в печени. На 30-е сут. постнатального онтогенеза содержание эритроидных клеток в этом органе у животных обеих экспериментальных групп находится на одинаково низком уровне, что указывает на прекращение эритропоэза в печени.

Как показали наши исследования, НМПК способствует интенсификации кроветворения в красном костном мозге плодов и 2-дневных крысят. Так количество эритроидных клеток в мазках красного костного мозга в случае аномальной беременности было достоверно выше, чем в контроле. Однако уже у 2-дневных крысят активность медуллярного кроветворения практически не отличается от уровня контроля. К 15-м сут. жизни интенсивность эритропоэза в красном костном мозге у крысят 2-й группы уменьшается и становится достоверно ниже контрольных значений. На 30-е сут. постнатального онтогенеза темпы медуллярного кроветворения в 1-й и 2-й экспериментальных группах имели сходные значения и практически не различались между собой. Достоверные различия в темпах эритропоэза в селезенке отсутствовали.

Таким образом, НМПК у белых крыс значительно снижает процент выживаемости потомства. Кроме того, внутриутробная гипоксия способствует мобилизации функциональных резервов эритроцитарной системы в пренатальный и первые дни постнатального периода жизни потомства белых крыс, которые проявляются в виде усиления процессов эритропоэза в красном костном мозге и печени. Это, в свою очередь, приводит к увеличению концентрации ретикулоцитов. В ответ на возникшую гипоксию отмечается активация NO-зависимых механизмов регуляции физиологических функций, которая проявляется в виде гиперпродукции оксида азота. Гиперфункция эритроцитарной системы и NO-зависимых механизмов регуляции в первые дни жизни крысят приводит в последствии к истощению их функциональных резервов.

Список литературы

1. **Белокриницкая Т.Е., Казанцева Е.В., Витковский Ю.А.** Некоторые патогенетические механизмы развития нарушений в фетоплацентарной системе у пациенток с артериальной гипертензией // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2005. — Т. 1. — С. 12—16.
2. **Белокриницкая Т.Е., Кузник Б.И., Хавинсон Х.В.** Влияние полипептидов эритроцитов на систему эритрона при экспериментальной анемии // Бюлл. exper. биологии и медицины. — 1992. — №8. — С. 132—134.
3. **Вартамова М.М.** Патогенез и профилактика синдрома отставания в развитии плода при плацентарной недостаточности и его отдельные последствия: Автореф. дисс. на присуждение ученой степени д.м.н. — Л., 1984.
4. **Полячкова О.Л., Бордули Г.М.** Клинико-биохимические критерии диагностики задержки развития плода // Акушерство и гинекология. — 2009. — №2. — С. 34—36.
5. **Реутов В.П., Каюшин Л.П., Сорокина Е.Г.** Физиологическая роль окиси азота в организме животных // Физиология человека. — 1994. — Т. 20, №3. — С. 165—174.
6. **Сидорова И.С., Марков И.О.** Фетоплацентарная недостаточность. Клинико-диагностические аспекты. — М.: Знание. — 2000. — 127 с.
7. **Торубарова Н.А., Кошель И.В., Яцык Т.В.** Кровотворение плода и новорожденного. — М.: Медицина. — 1993. — 207 с.
8. **Biondi C., Cotorruello C., Ensinck A.** et al. Senescent erythrocytes: factors affecting the aging of red blood cells // Immunol. Invest. — 2002. — Vol. 31, №1. — P. 41—50.

9. **Fowden A.L., Giussani D.A., Forhead A.J.** Endocrine and metabolic programming during intrauterine development // Early Hum. Dev. — 2005. — Vol. 81. — P. 723—734.

10. **Fu W., Haynes T.E., Kohli R.** et al. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats // J. Nutr. — 2005. — Vol. 135. — P. 714—721.

11. **Huang S.-T.J., Vo K.C.T., Lyell D.J.** et al. Developmental response to hypoxia // FASEB. — 2004. — Vol. 18. — P. 1348—1365.

12. **Houdijk E.C.A.M., Engelbregt M.J.T., Popp-Snijders C., Delemarrevd Waal H.A.** Endocrine regulation and extended follow up of longitudinal growth in intrauterine growth-retarded rats // Journal of Endocrinology. — 2000. — Vol. 166. — P. 599—608.

13. **Nusken K.-D., Dotsch J., Rauh M.** et al. Uteroplacental Insufficiency after Bilateral Uterine Artery Ligation in the Rat: Impact on Postnatal Glucose and Lipid Metabolism and Evidence for Metabolic Programming of the Offspring by Sham Operation // Endocrinology. — 2008. — Vol. 149, №3. — P. 1056—1063.

14. **Rosselli M., Keller P.J., Dubey R.K.** Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction // Hum. Reprod. Update. — 1998. — №4. — P. 3—24.

15. **Wu G., Bazer F.W., Wallace J.M., Spencer T.E.** Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences // J. Anim. Sci. — 2006. — Vol. 84. — P. 2316—2337.

Поступила 23.10.12

Сведения об авторах:

Назаров Сергей Борисович, д-р мед. наук, проф., зам. дир. по науке ФГБУ «Ивановский НИИМиД им. В.Н. Гордкова» Минздрава РФ, зав. кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО «ИвГМА» Минздрава РФ
Новиков Александр Анатольевич, аспирант каф. нормальной физиологии ГБОУ ВПО «ИвГМА» Минздрава РФ