

Милош Т.С., Масимович Н.Е.

Состояние эндотелия сосудов и прооксидантно-антиоксидантный баланс у беременных крыс в условиях эндотоксинемии

УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80

Актуальной проблемой современного акушерства является инфекция в период беременности, которая приводит к мертворождаемости, ранней детской смертности и заболеваемости. В Беларуси заболеваемость новорожденных при специфических инфекциях для перинатального периода составила 14,1%, а смертность — 0,38%. Цель исследований — изучить состояние эндотелия и активность перекисного окисления липидов у беременных крыс с эндотоксинемией. В экспериментах на 49 беременных крысах с внутримышечным введением эндотоксина (*Lipopolysaccharide E. coli Serotype O127:B8 «Sigma»*) в период плацентации установлено развитие дисфункции эндотелия, что проявлялось более выраженной в 2,3 раза ($p < 0,05$) констрикторной реакцией на норадралин, увеличением в 18,3 раза ($p < 0,001$) количества циркулирующих эндотелиальных клеток и снижением в 14 раз ($p < 0,001$) эндотелийзависимой вазодилатации под влиянием ацетилхолина, наряду повышением уровня продуктов перекисного окисления липидов: концентрации диеновых конъюгатов на 91% ($p < 0,001$), малонового диальдегида — на 56% ($p < 0,001$), оснований Шиффа — на 7,9% ($p < 0,05$); и снижением показателей антиоксидантной защиты: содержания ретинола на 29% ($p < 0,05$), α -токоферола — на 6% ($p < 0,001$).

Ключевые слова: беременность; эндотоксин; дисфункция эндотелия; окислительный стресс

Milosh T.S., Maksimovich N.Ye.

The endothelium of the vessels and prooxidative-antioxidative balans in pregnancy rats with endothoxinaemia

Grodno State Medical University, Ministry of Health of Belarus, Grodno, str. Gorkogo 80, 230009

Actual problem of modern obstetrics is the infection in pregnancy which leads the deadborn, early children's death rate and disease. In Belarus disease of newborns at specific infections for postnatal the period has made 14,1%, and death rate of 0,38%. The purpose of researches — to study a condition endothelium and activity of lipid peroxidation products at pregnant rats with endothoxinaemia. In experiments on 49 pregnancy rats with intramuscular introduction of endotoxine (*Lipopolysaccharide E. coli Serotype O127:B8 «Sigma»*) during the period placentation dysfunction development endothelium is established, that was shown more expressed in 2,3 times ($p < 0,05$) constriction by reaction on noradrenalin, increase in 18,3 times ($p < 0,001$) quantities circulating endothelium cages and decrease in 14 times ($p < 0,001$) the dependent endothelium vasodilatation under influence acetylcholine, to the dress increase of level of lipid peroxidation products: concentration of diene conjugates on 91% ($p < 0,001$), malone dialdehyde — on 56% ($p < 0,001$), Schiff bases — on 7,9% ($p < 0,05$); and decrease in indicators of antioxidant protection: maintenances retinol on 29% ($p < 0,05$), α -tocopherol — on 6% ($p < 0,001$).

Key words: pregnancy endotoxine; endothelium dysfunction; oxidative processes

Инфекция в период беременности — актуальная проблема современного акушерства, занимающая ведущую роль среди причин мертворождаемости, ранней детской смертности и постнатальной заболеваемости. Несмотря на целый ряд лечебно-профилактических мероприятий рождение детей с проявлениями внутриутробной инфекции у беременных с инфекци-

онно-воспалительными заболеваниями составляет в России от 10 до 58% [1, 2]. В Республике Беларусь в структуре причин смерти детей на первой неделе жизни основными являются: врожденные аномалии развития, синдром дыхательных расстройств, внутриутробные инфекции и др. Заболеваемость новорожденных при специфических инфекциях для перинатального периода составила 14,1%, а смертность — 0,38% [3].

Возникновению акушерской патологии в настоящее время способствуют грамотрицательные бактерии

Для корреспонденции: Милош Татьяна Сергеевна, к.м.н., ассистент кафедры акушерства и гинекологии УО «Гродненский государственный медицинский университет»; e-mail: milashts@mail.ru

(*E. coli* и др.). Липополисахарид (ЛПС) или эндотоксин (ЭТ) грамотрицательных бактерий обладает токсическими и иммуногенными свойствами. Его неблагоприятные эффекты вызваны способностью стимулировать образование в макрофагах биологически активных веществ: интерлейкинов, простагландинов, веществ с окислительными свойствами [4]. Образование последних является причиной септического шока [5].

Для детализации патогенеза нарушений в системе «мать—плод» важно изучение состояния сосудистого эндотелия. По данным литературы ЛПС обладает повреждающим действием на эндотелий [6]. Эндотелий — это важный паракринный орган непрерывно синтезирующий большое количество биологически активных веществ, важных для контроля регуляции тонуса сосудов и их проницаемости, гемостаза, ангиогенеза и др. [7]. Установлена важная роль дисфункции эндотелия (ДЭ) в возникновении различной соматической патологии, однако в акушерской практике этот вопрос разработан недостаточно [8]. Согласно единичным данным, нарушение кровообращения в системе «мать — плацента — плод» и развитие токсемии при гестозе зависит от степени эндотелиальной дисфункции [9]. Повреждению эндотелия сосудов при эндотоксинемии может способствовать чрезмерная активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая происходит под воздействием «цитокриновой атаки» [8, 10].

Однако состояние эндотелия в организме матери при беременности в условиях действия бактериальных ЭТ не изучалось, в частности, не выяснено состояние эндотелийзависимых механизмов вазодилатации (ЭЗВД), степень десквамационных процессов в эндотелии кровеносных сосудов, не исследованы изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса в условиях эндотоксинемии [7, 11, 12].

Цель исследования — изучение состояния эндотелия и активности перекисного окисления липидов у беременных крыс с эндотоксинемией.

Методика

Исследования выполнены на 49 белых беспородных беременных крысах массой 200—230 г, разделенных на 2 серии (контрольная и опытная). Животные содержались в стандартных условиях, получали полноценный пищевой рацион в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Контролировались температурный, световой и шумовой режимы. При выполнении экспериментов руководствовались принципами гуманного отношения к животным. Исследования на животных проводили согласно положению комитета по биомедицинской этике УО «Гродненский государственный медицинский универ-

ситет» по гуманному обращению с экспериментальными животными (приказ ректора от 27.12.2006 г. №125).

Крысы 1-й серии ($n = 25$) — контроль, внутримышечно получали стерильный изотонический раствор NaCl в объеме 0,5 мл в период плацентации (11-е сутки беременности), животные 2-й серии ($n = 24$) в аналогичный период беременности внутримышечно получали ЛПС (*Lipopolysaccharide E. coli Serotype O127:B8 «Sigma»*) в дозе 0,4 мг/кг. Выявление беременных крыс осуществляли по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке (1-й день беременности).

Взятие материала крови, грудной аорты для исследований осуществляли под наркозом (внутримышечно тиопентал натрия, 60 мг/кг). Кровь забирали из общей сонной артерии с добавлением гепарина (20 ЕД/мл).

Состояние эндотелия кровеносных сосудов оценивали по ЭЗВД колец аорты диаметром 2—3 мм в ответ на воздействие возрастающих концентраций ацетилхолина (АцХ) изометрическим методом [13] в водяной бане типа «organ bath» (рис. 1) путем регистрации степени их изометрического напряжения и подвергнутого сокращению с помощью норадреналина, и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) колец аорты исследовали с помощью глицеролтринитрата (ГТН, 10^{-6} М) для контроля состояния гуанилатциклазного компонента миоцитов сосудов [14].

Кольцевидные сегменты аорты предварительно спазмировали норадреналином (10^{-7} — 10^{-6} М) до уровня 70% от максимальной вазоконстрикции.

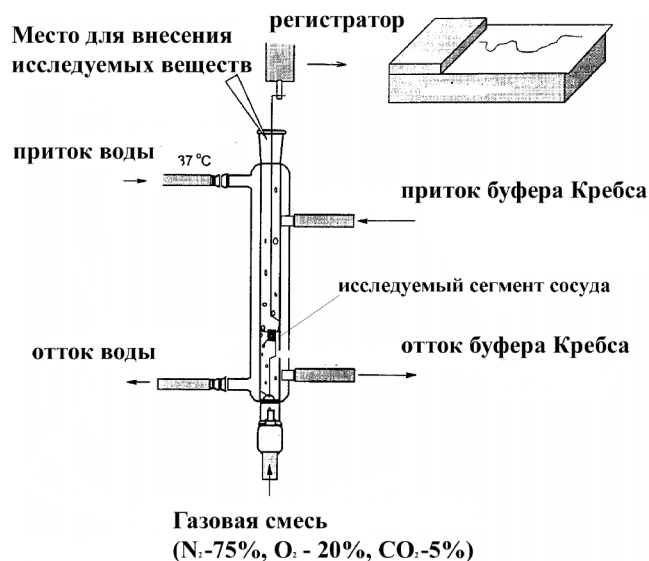


Рис. 1. Схема устройства для исследования вазоактивных реакций эндотелия сосудов *in vitro* методом изометрии

Степень морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов изучали по количеству десквамированных циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в 1 л плазмы крови методом микроскопии по Sinzinger H. [15] в модификации [16].

Прооксидантно-антиоксидантное состояние оценивали по концентрации в плазме крови продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновые конъюгаты (ДК) [17], малоновый диальдегид (МДА) определяли на основании концентрации его комплексов с тиобарбитуровой кислотой на спектрофотометре «СФ-46», Россия [18], основания Шиффа (ОШ) измеряли на спектрофлюориметре F-4010 «Hitachi», Япония [19]. Осуществляли оценку показателей антиоксидантной защиты (АОЗ): ретинола и α -токоферола (α -Т), используя способность их соединений флюоресцировать в гексановой среде на спектрофлюориметре «F-4010» фирмы «Hitachi» (Япония) [20].

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы «Statistica 6,0» [21]. После проверки данных на нормальность распределения по критерию Шапиро—Уилка рассчитывали медиану, межквартильный интервал (25-й и 75-й процентиля). Различия между группами устанавливали с помощью критериев Краскела—Уоллиса и Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение морфофункциональных изменений эндотелия кровеносных сосудов в организме самок крыс, получавших ЛПС, выявило статистически значимую констрикторную реакцию на норадреналин в 2,3 раза ($n = 11$) (рис. 2). В то же время ЭЗВД в ответ на АцХ (10^{-5} М) у крыс опытной группы была значительно меньше ($5 \pm 2,3\%$, $n = 22$, $p < 0,001$), чем в контроле ($70 \pm 10,8\%$, $n = 8$).

ЭНВД, определяемая после воздействия на предварительно спазмированные норадреналином кольца аорты ГТН (10^{-6} М) — непрямым донором оксида азота, не отличалась у крыс опытной группы по сравнению с контрольной, составив $85 \pm 7,4\%$ ($n = 9$) и $88 \pm 3,6\%$ ($n = 6$) соответственно, что свидетельствовало об отсутствии нарушений гуанилатциклазного механизма вазодилатации.

Изучение выраженности десквамации эндотелия кровеносных сосудов, на основании количества ЦЭК выявило наличие морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов у крыс, получавших в период беременности ЛПС. Количество ЦЭК в плазме крови крыс опытной группы составило $82,5 (46,0; 115,0) \times 10^4/\text{л}$ ($n = 22$, $p < 0,001$), в то время как в контроле значение этого показателя составило $4,5 (2,5; 5,0) \times 10^4/\text{л}$ ($n = 8$).

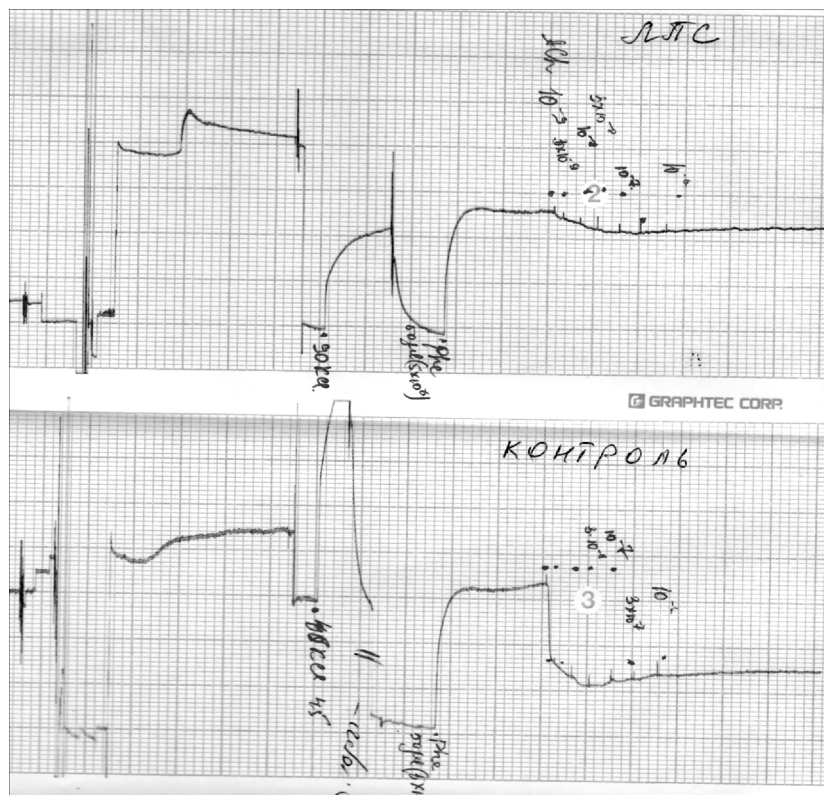


Рис. 2. Вазодилатация колец аорты крысы в период плацентации — контроль — и с введением липополисахарида (ЛПС) — опыт.

Содержание диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, оснований Шиффа, ретинола, α -токоферола в плазме крови беременных крыс после введения липополисахарида в период плацентации

Показатели	Единицы	Группы животных	
		Контроль	Липополисахарид
Диеновые конъюгаты	ΔD_{233} /мл	1,1 (0,9; 1,5)	2,1 (1,5; 2,3)**
Малоновый диальдегид	мкмоль/л	1,8 (1,1; 2,0)	2,8 (2,2; 3,6)**
Основания Шиффа	ЕД/мл	137,3 (129,6;140,9)	148,1 (142,1;156,7)*
Ретинол	мкмоль/л	5,2 (3,6; 6,3)	3,7 (3,1; 3,9)*
α -токоферол	мкмоль/л	24,8 (24,3; 25,4)	23,2 (22,1; 23,8)**

Примечание. Данные представлены в виде медианы Ме (25-й; 75-й процентиля); * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$ — различия статистически значимы между показателями опытной и контрольной групп.

У беременных крыс отмечено существенное увеличение активности ПОЛ: в плазме крови: увеличение концентрации ДК на 91%, МДА — на 56%, ОШ — на 7,9% (таблица).

Наряду с этим, установлено снижение в плазме крови концентрации показателей АОЗ: содержания ретинола на 29%, α -Т — на 6%.

Выводы

Введение эндотоксина в период плацентации беременным крысам способствует развитию дисфункции эндотелия, что проявляется повышением количества циркулирующих эндотелиальных клеток и снижением эндотелийзависимой вазодилатации под влиянием ацетилхолина.

Механизм развития дисфункции эндотелия может быть обусловлен развитием окислительного стресса, о чем свидетельствовало повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов и снижение показателей антиоксидантной защиты.

Список литературы

1. Казюкова Т.В. Показатели феррокинетики при инфекционно-воспалительных заболеваниях у детей раннего возраста. *Педиатрия*. 2004; (3): 42-48.
2. Ткачева И.И., Тареева Т.Г., Федорова А.В. Рациональные методы профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний матери, плода и новорожденного при акушерской и экстрагенитальной патологии. . 1999; (3): 80-84.
3. Вильчук К.У. Достижения и перспективы развития неонатальной службы в Республике Беларусь. *Вопросы организации и информатизации здравоохранения*. 2010; (3):33.
4. Макаров О.В., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Бахарева И.В., Таранец А.Н. Диагностическое значение исследования амниотической жидкости при внутриутробном инфицировании. *Акушерство и гинекология*. 2003; (4): 3-4.
5. Салахов И.М., Ипатов А.И., Конев Ю.В., Яковлев М.Ю. Современные аспекты патогенеза эндотоксического шока. *Успехи современной биологии*. 1998;(1): 33-49.

6. Чижиков Н.В., Юревич Е.В., Опарина О.Н., Агеев И.С. Интегральные показатели кишечного липополисахарида и антиэндотоксинового иммунитета у больных атеросклерозом нижних конечностей в сочетании с дисциркуляторной атеросклеротической энцефалопатией. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2009; 2 (10):60-70.

7. Conrad K.P., Davis A.K. Nitric oxide synthase activity in placenta from women with preeclampsia. *Placenta*.1995; 16 (8): 691-699.

8. Киселева Н.И. Дисфункция эндотелия при гестозе: патогенез, диагностика и лечение. *Охрана материнства и детства*. 2006; 1(7):49-56.

9. Ветров В.В. Синдром эндогенной интоксикации в акушерско-гинекологической практике. *Эфферентная терапия*. 2001; 7 (1):4-9.

10. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю. Роль оксида азота в развитии и предупреждении дисфункции эндотелия. *Вестник Витебского госуд. мед. ун-та*. 2003; 2 (2):5-17.

11. Lual F.,Young A., Greer L.A. NO concentration are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am. J. Obstet Gynec*.1995; 173 (1): 714-718.

12. Vane J.R., Anggard E.E., Batting R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *New England J. of Medicine*. 1990; 323 (1): 27-36.

13. Hladovec J., Rossman P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thromb. Res*. 1973; 3: 665-674.

14. Максимович Н.Е., Козловский В.И., Максимович Н.А. Современные экспериментальные методы оценки состояния морфо-функциональных свойств эндотелия сосудов. *Журнал ГрГМУ*. 2004; (2): 26-30.

15. Sinzinger H., Virgolini J., Fitscha P. Stabilization of endothelial lining and decrease in circulation endothelial cells. *Br. J. Pharm*. 1988; 25: 775-776.

16. Власов Т.Д. Системные нарушения микроциркуляции как следствие органной постишемической реперфузии. *Сб. науч. трудов «Патофизиология микроциркуляции и гемостаза»*. Санкт-Петербург; 1998:90-106.

17. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. *Лабораторное дело*. 1983; (3): 33-35.

18. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. *Elsevier Amsterdam-London-New York-Tokyo. Elsevier*. 1991: 291.

19. Fletcher B.L., Dillard, C.J., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.* 1973; 52 (1): 1-9.

20. Черняускене Р.Ч. Варшкявичене З.З., Грибаускас П.С. Одновременное флюориметрическое определение концентраций витаминов Е и А в сыворотке крови. *Лабораторное дело.* 1984; (6): 362-365.

21. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера; 2003. 312 с.

Поступила 03.05.13

References

1. Kazyukova T.V. Indicators ferrocenic at infectious-inflammatory diseases at children of early age. *Pediatrics.* 2004; (3): 42-8. (in Russian)

2. Tkacheva I.I., Tareeva T.G., Fedorova A.B. Rational methods of preventive maintenance and treatment of infectious-inflammatory diseases of mother, fetus and the newborn at obstetrics and extragenital pathologies. *Vestnik Rossiyskoy assotsiatsii akusherov-ginekologov.* 1999; (3): 80-4. (in Russian)

3. Vil'chuk K.U. Achievements and development prospects neonatal services of Belarus. *Voprosy organizatsii i informatsii zdavookhraneniya.* 2010; (3): 33. (in Belarus)

4. Makarov O.V., Koval'chuk L.V., Gankovskaya L.V., Bakhareva I.V., Taranets A.N. Diagnostic value of research amniotic fluid at prenatal infection. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2003; (4): 3-4. (in Russian)

5. Salakhov I.M., Ipatov A.I., Konev Yu.V., Yakovlev M.Yu. Modern aspects pathogenesis endotoxin a shock. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 1998;(1): 33-49. (in Russian)

6. Chizhikov N.V., Yurevich E.V., Oparina O.N., Ageev I.S. Integrated indicators intestinal lipopolysaccharide and antiendotoxin immunity at bottom finitenesses sick of an atherosclerosis in a combination with discirculation an atherosclerotic encephalopathy. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki.* 2009; 2 (10):60-70. (in Russian)

7. Conrad K.P., Davis A.K. Nitric oxide synthase activity in placenta from women with preeclampsia. *Placenta.* 1995; 16 (8): 691-9.

8. Kiseleva N.I. Endothelium dysfunction at preeclampsia: pathogenesis, diagnostics and treatment. *Okhrana materinstva i detstva.* 2006; 1(7):49-56. (in Belarus)

9. Vetrov V.V. Syndrome endogenic intoxications in obstetrics-gynecologic practice. *Efferentnaya terapiya.* . 2001; 7 (1):4-9. (in Russian)

10. Manukhina E.B., Malyshev I.Yu. Role of nitric oxide in development and the dysfunction prevention endothelium. *Vestnik Vitebskogo gosud. med. unistituta.* 2003; 2 (2): 5-17. (in Belarus)

11. Lual F., Young A., Greer L.A. NO concentration are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am. J. Obstet Gynec.* 1995; 173 (1): 714-8.

12. Vane J.R., Anggard E.E., Batting R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *New England J. of Medicine.* 1990; 323 (1): 27-36.

13. Hladovec J., Rossman P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thromb. Res.* 1973; 3: 665-74.

14. Maksimovich N.E., Kozlovskiy V.I., Maksimovich N.A. Modern experimental methods of an estimation of a condition of morfo-functional properties endothelium vessels. *Zhurnal GrGMU.* 2004; (2): 26-30. (in Belarus)

15. Sinzinger H., Virgolini J., Fitscha P. Stabilization of endothelial lining and decrease in circulation endothelial cells. *Br. J. Pharm.* 1988; 25: 775-6.

16. Vlasov T.D. System infringements of microcirculation as consequence body postischemic reperfusion. *Cb. nauch. trudov «Patofiziologiya mikrotsirkulyatsii i gemostaza».* Sankt-Peterburg;1998: 90-106. (in Russian)

17. Gavrilov V.B., Mishkorudnaya M.I. Spektrofotometrichesky definition of the maintenance of hydroperoxides lipid in blood plasma. *Laboratornoe delo.* 1983; (3): 33-5. (in Russian)

18. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. *Elsevier Amsterdam-London-New York-Tokyo. Elsevier.* 1991: 291.

19. Fletcher B.L., Dillard, C.J., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.* 1973; 52 (1): 1-9.

20. Chernyauskene R.Ch. Varshkyavichene Z.Z., Gribauskas P.S. Simultaneous fluorimetric definition of concentration of vitamins E and A in blood whey. *Laboratornoe delo.* 1984; (6): 362-5. (in Russian)

21. Rebrova O.Yu. The statistical analysis of medical data. Application of a package of applied programs STATISTICA. М.: Медиа Сфера; 2003. 312 с. (in Russian)

Received 03.05.13

Сведения об авторах:

Максимович Наталья Евгеньевна — д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет»