

*Т. С. Милош,
Н. Е. Максимович*

НО-зависимые механизмы дисфункции эндотелия – фактор патогенеза нарушений потомства при экспериментальном введении липополисахарида

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

На 71 беременной крысе с внутримышечным введением липополисахарида *E. coli* «Sigma» во второй период беременности и на 42 крысятах установлена роль дисфункции эндотелия, окислительного стресса и оксида азота в генезе нарушений физического развития потомства. Ключевые слова: беременность, липополисахарид, физическое развитие, дисфункция эндотелия, оксид азота.

Беременность, осложненная инфекцией, по-прежнему является одной из наиболее актуальных проблем современного акушерства в виду широкой распространенности, сложности этиопатогенеза, недостаточной эффективности лечебно-профилактических мероприятий, высокой частоты материнской и перинатальной заболеваемости и смертности а также снижения индекса здоровья женщин, перенесших данное осложнение беременности, больших экономических затрат на проведение терапии.

Высокий уровень инфекционной заболеваемости беременных определяет актуальность изучения влияния внутриутробной инфекции на течение беременности.

Согласно исследованиям около 2% детей инфицируются внутриутробно и почти 10% во время родов или сразу после них [3]. С проявлениями внутриутробной инфекции рождается от 10 до 53% детей, мертворождаемость колеблется от 4,9 до 16,8%, а ранняя неонатальная заболеваемость – от 5,3% до 27,4%. В настоящее время доля ВУИ в Беларуси в структуре перинатальной смертности не имеет тенденции к снижению [4].

Несмотря на большое количество научных исследований, посвященных проблеме внутриутробного инфицирования плода, патогенез перинатальных нарушений изучен недостаточно, а, следовательно, недостаточно разработаны способы их патогенетической коррекции.

Среди инфекционных факторов, способствующих возникновению акушерской патологии, значительную роль играют грамотрицательные бактерии (*E. coli* и др.). Липополисахарид (ЛПС) или эндотоксин грамотрицательных бактерий обладает токсическими и иммуногенными свойствами. Неблагоприятные эффекты ЛПС вызваны его способностью стимулировать образование в макрофагах биологически активных веществ: интерлейкинов, простагландинов, веществ окислительного действия.

Повышенное образование этих веществ является причиной септического шока. Ранее проведенными исследованиями показана роль иммунного конфликта в возникновении данной патологии.

По данным литературы ЛПС обладает повреждающим действием на эндотелий. 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. Установлена важная роль дисфункции эндотелия (ДЭ) в возникновении различной соматической патологии, однако в акушерской практике этот вопрос разработан недостаточно. Показано, что нарушения кровообращения при гестозе в системе «мать – плацента – плод» и развитие токсемии зависит от степени эндотелиальной дисфункции. Роль дисфункции эндотелия в патогенезе нарушений в системе «мать-плод» при инфицированной беременности не изучена.

Данные литературы свидетельствуют не только о функциональном изменении, а и о морфологическом повреждении эндотелия кровеносных сосудов при ЛПС интоксикации организма. Причиной этих нарушений является способность ЛПС, входящих в состав микроорганизмов, вызывать развитие системного воспалительного ответа, образование и выброс в кровь разнообразных медиаторов воспаления (цитокинов, производных арахидоновой кислоты, биологических аминов, активных форм кислорода, оксида азота, фактора некроза опухолей и др.) [8]. Повреждению эндотелия сосудов при эндотоксинемии способствует чрезмерная активация перекисного окисления липидов, которая происходит под воздействием «цитокиновой атаки».

Важным патогенетическим фактором ДЭ при беременности, осложненной инфекцией, может быть нарушение целостности эндотелиальной выстилки микрососудов, обнажение субэндотелиальных структур, что в свою очередь инициирует адгезию и агрегацию тромбоцитов и тромбогенез.

Способность ЛПС индуцировать развитие окислительного стресса может стать причиной нарушений сосудистого эндотелия и приводить к нарушению маточного кровообращения и нарушению развития потомства.

Предполагается участие оксида азота (NO) в качестве одного из возможных факторов патогенеза ДЭ кровеносных сосудов. Анализ литературы, показал неизученность данного вопроса, в частности, не выяснено состояние эндотелийзависимых механизмов вазодилатации, степень десквамационных процессов в эндотелии кровеносных сосудов, отсутствуют сведения, касающиеся роли дисфункции эндотелия в патогенезе изучаемых нарушений. Вышеизложенное свидетельствует о необходимости проведения исследований по изучению морфо-функционального состояния эндотелия кровеносных сосудов, а также выяснению участия NO и окислительного стресса в патогенезе его нарушений в условиях беременности, осложненной инфекцией.

Материал и методы

Экспериментальные животные в количестве 24 беременные крысы массой 200-250 г были разделены на 2 группы. Выявление беременных крыс осуществляли по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке (1-й день беременности). Опытным крысам (n=17) внутримышечно вводили ЛПС (Е.

coli «Sigma») в дозе 0,4 мг/кг на 11-14 сутки (период плацентации) беременности. Выявление беременных крыс осуществляли по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке (1-й день беременности). Крысы контрольной группы (n=7) в аналогичные сроки беременности внутримышечно получали эквивалентное количество изотонического раствора NaCl.

У 28 опытных и 14 контрольных крысят изучали физическое развитие (прирост массы тела, отлипание ушей, появление шерсти, прорезывание резцов, открытие глаз) и созревание сенсорно – двигательных рефлексов (переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, избегание обрыва, маятниковый рефлекс, поднимание головы и передних лап, ползание, опора на задние конечности, подъем всего тела, двигательная активность, реакция на акустический стимул, обонятельная реакция, мышечная сила) и координацию движения (переворачивание в воздухе, удержание на вращающемся цилиндре, спонтанная двигательная активность) [1, 7].

Взятие материала (крови) для исследований осуществляли в условиях наркоза (внутримышечно тиопентал натрия, 40-60 мг/кг). Плазму крови получали путем центрифугирования крови, забранной из общей сонной артерии с добавлением гепарина (20 ЕД/мл), при 3000 об/мин в течение 20 минут.

У 24 беременных крыс, получавших ЛПС, и у 25 крыс контрольной группы определяли функциональное состояние эндотелия кровеносных сосудов: эндотелийзависимую (ЭЗВД) и эндотелийнезависимую (ЭНВД) вазодилатацию, осуществляли оценку морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов по степени его десквамации, изучали продукцию оксида азота и активность окислительных процессов.

ЭЗВД изучали микроскопически на основании прироста диаметра предварительно спазмированных норадреналином (НА, 10-6М) колец аорты в ответ на ацетилхолин (АцХ, 10-5М). ЭНВД оценивали аналогичным образом по реакции спазмированных НА колец аорты в ответ на глицеролтринитрат (ГТН, 10-6М) [6].

Степень морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов изучали по количеству десквамированных циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в 100мл плазмы крови методом микроскопии.

Изучение продукции NO оценивали на основании определения уровня нитритов и нитратов [NOx] в плазме крови с помощью реактива Грисса и кадмия общепринятым фотометрическим методом на КФК-3 при $\lambda=525$ нм.

Для оценки активности окислительных процессов в организме беременных крыс, получавших ЛПС, в плазме крови оценивали степень перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень показателей антиоксидантной защиты (АОЗ). Определение содержания показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния выполнено в крови, забранной из общей сонной артерии с добавлением гепарина (20 ЕД/мл), у 47 крыс (24 крысы опытной группы и 23 крысы контрольной группы).

Определение активности ПОЛ осуществляли спектрофотометрически (СФ-46, ЛОМО, Россия) по концентрации диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), оснований Шиффа (ОШ). Содержание ДК оценивали по интенсивности УФ-поглощения при длине волны 232-234 нм конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов [2]. Определение МДА осуществляли в реакции с тиобарбитуровой кислотой на спектрофотометре при длинах волн 532 нм и 580 нм [9]. Уровень ОШ определяли по интенсивности флуоресценции хлороформного экстракта при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 нм и 440 нм соответственно [10]. Состояние АОЗ оценивали по концентрации ретинола и б-токоферола в плазме крови. Содержание ретинола определяли по интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения 335 нм и длине волны флуоресценции (эмиссии) 460 нм, содержание а-токоферола – по интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длинах волн возбуждения и флуоресценции 292 нм и 325 нм соответственно на спектрофлуориметре «F-4010» фирмы «Hitachi» [5]. Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Вес новорожденных крысят опытной группы крыс, получавших ЛПС в период плацентации, составил $5,1 \pm 0,13$ г ($n=7$, $p<0,001$), в контроле – $6,1 \pm 0,07$ г ($n=8$). На 2-е сутки прирост веса крысят опытной группы составил – 9,8% ($p<0,001$), что ниже, чем в контроле (16,4%), на 5 сутки – 37% ($p<0,001$), в контроле – 50,8%, на 7-е сутки – 45,1% ($p<0,001$), в контроле – 90,2%, на 12-е сутки – 224% ($p<0,001$), в контроле – 269%, на 20-е сутки – 298% ($p<0,001$), в контроле – 472%. У потомства крыс, получавших ЛПС в период плацентации, показатели массы тела были ниже контрольных во все исследуемые сроки.

Таблица 1

Масса тела (г) у потомства крыс, получавших липополисахарид (ЛПС) в постнатальном периоде ($M \pm m$).

Группы живогных	1 сут.	2 сут.	5 сут.	7 сут.	12 сут.	20 сут.
Контроль	$6,1 \pm 0,07$ ($n=8$)	$7,1 \pm 0,11$ ($n=8$)	$9,2 \pm 0,33$ ($n=14$)	$11,6 \pm 0,79$ ($n=10$)	$22,5 \pm 0,41$ ($n=11$)	$34,9 \pm 2,31$ ($n=10$)
ЛПС	$5,1 \pm 0,13^{**}$ ($n=7$)	$5,6 \pm 0,22^{**}$ ($n=7$)	$7,0 \pm 0,09^{**}$ ($n=6$)	$7,4 \pm 0,19^{**}$ ($n=28$)	$16,5 \pm 1,10^{**}$ ($n=11$)	$20,3 \pm 1,32^{**}$ ($n=10$)

Примечание: * - $p<0,05$, ** - $p<0,001$ - различия между показателями опытной и контрольной групп.

Появление других показателей физического развития у крысят опытной группы также запаздывало: отлипание ушей отмечалось на 4 сутки постнатального периода (в контрольной группе-на 2-е сутки), появление шерсти происходило на 6-7-е сутки (в контрольной группе-на 5-е сутки), прорезывание резцов – на 11-е сутки (в контрольной группе-на 8-е сутки),

открытие глаз – на 16-17-е сутки (в контрольной группе – на 15 сутки). Также у потомства крыс, получавших во второй период беременности ЛПС, выявлено отставание созревания сенсорно – двигательных рефлексов и координации движения в период вскармливания на 3-4 суток от крысят контрольной группы.

Изучение морфо-функциональных изменений эндотелия кровеносных сосудов в организме самок крыс, получавших ЛПС, выявило более выраженную констрикторную реакцию на норадреналин 38% (n=11, p>0,05), в то время как в контрольной группе вазоконстрикция составила 33% (n=7) (табл. 2). В тоже время ЭЗВД в ответ на АцХ (10⁻⁵М) у крыс опытной группы была значительно меньше, чем в контроле (5±2,3%, n=22, p<0,001) и 70±10,8% (n=8) соответственно. После воздействия ацетилхолина на предварительно спазмированные норадреналином кольца их аорты диаметр в опытной группе составил 72±4,7% (n=17, p<0,001) от исходного диаметра колец аорты и был значительно меньше по сравнению с диаметром колец аорты крыс контрольной группы после аналогичных воздействий (97±0,6 %, n=8).

Таблица 2

Вазоконстрикция (ВК), эндотелийзависимая вазодилатация (ЭЗВД) и эндотелийнезависимая вазодилатация (ЭНВД) колец аорты и их диаметр (d) после воздействия ацетилхолина (АцХ) и глицеролтринитрата (ГТН) крыс, получавших в период беременности липополисахарид (ЛПС) (M±m).

Группы животных	ВК (%)	d (%) от исх. d после АцХ (10 ⁻⁵ М)	ЭЗВД (%)	d (%) от исх. d после ГТН (10 ⁻⁶ М)	ЭНВД (%)
Контроль	33±6,3 (n=7)	97±0,6 (n=8)	70±10,8 (n=8)	99±0,8 (n=7)	88±3,6 (n=6)
ЛПС	38±5,5 (n=11)	72±4,7** (n=17)	5±2,3** (n=22)	99±0,7 (n=18)	85±7,4 (n=9)

Примечание: * - p<0,05, ** - p<0,001 - различия между показателями опытной и контрольной групп, d – диаметр аорты

ЭНВД, определяемая после воздействия на предварительно спазмированные норадреналином кольца аорты ГТН (10⁻⁶М) – непрямым донором оксида азота, не отличалась у крыс опытной группы по сравнению с контрольной, составив 85±7,4% (n=9) и 88±3,6 % соответственно (n=6, p>0,05). При этом диаметр колец аорты крыс опытной группы составил от исходного диаметра 99±0,7% (n=18), а в контроле – 99±0,8%, (n=7, p>0,05).

При изучении выраженности десквамации эндотелия кровеносных сосудов, оцениваемой на основании определения количества циркулирующих эндотелиальных клеток, установлено повышение повреждения эндотелия кровеносных сосудов у крыс, получавших в период беременности ЛПС. Так, количество ЦЭК в плазме крови крыс опытной группы составило 94±12,3/100 мл (n=22), в то время как в контроле значение этого показателя составило 4±0,7/100 мл (n=8, p<0,001).

В результате изучения продукции оксида азота установлено повышенное содержание нитритов и нитратов в плазме крови крыс, получавших ЛПС ($99,5 \pm 4,7$ мкМ/л, $n=24$, $p < 0,001$), в то время как в контроле этот показатель составил $33,5 \pm 2,9$ мкМ/л ($n=25$), что указывает на возможное участие оксида азота в патогенезе нарушений в системе «мать-плод» при введении ЛПС в период беременности.

Изучение показателей, характеризующих прооксидантно-антиоксидантное состояние в организме беременных самок крыс, получавших в период беременности ЛПС, выявило увеличение активности ПОЛ на фоне уменьшения АОЗ, что свидетельствует об окислительном стрессе, как одном из возможных звеньев патогенеза нарушений, возникающих у потомства при действии в период беременности микробного компонента (табл.3).

Таблица 3

Содержание нитритов и нитратов (NOx), диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), оснований Шиффа (ОШ), ретинола, - токоферола в плазме крови беременных крыс после введения липополисахарида, ЛПС ($M \pm m$).

Группы животных	NO _x (мМ/л)	ДК (ДФ233 ЕД/мл)	МДА (мкМ/л)	ОШ (ЕД/мл)	Ретинол (мМ/л)	α-токоферол (мкМ/л)
Контроль	$33,5 \pm 2,9$ ($n=25$)	$1,2 \pm 0,1$ ($n=23$)	$1,6 \pm 0,10$ ($n=20$)	$137,8 \pm 3,1$ ($n=17$)	$4,9 \pm 0,31$ ($n=23$)	$24,8 \pm 0,13$ ($n=20$)
ЛПС	$99,5 \pm 4,7^{**}$ ($n=24$)	$2,1 \pm 0,13^{**}$ ($n=21$)	$2,9 \pm 0,2^{**}$ ($n=19$)	$148,5 \pm 2,26^*$ ($n=24$)	$3,6 \pm 0,17^*$ ($n=17$)	$22,1 \pm 0,65^{**}$ ($n=22$)

Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ - различия между показателями опытной и контрольной групп.

Так, концентрация ДК в плазме крови у крыс, получавших ЛПС, возросла до 75% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем, концентрация МДА в плазме крови увеличилась – до 81% ($p < 0,001$), содержание ОШ в плазме крови увеличилось до 7,8% ($p < 0,05$).

Содержание ретинола в плазме крови у самок крыс с введением ЛПС уменьшилось до 27% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем, содержание α-токоферола в плазме крови снизилось до 11% ($p < 0,001$), что свидетельствует об уменьшении антиоксидантного резерва в организме беременных крыс после введения ЛПС.

Таким образом, проведенные исследования по изучению развития потомства крыс с введением ЛПС, морфо-функционального состояния эндотелия кровеносных сосудов, продукции оксида азота, активности окислительных процессов у крыс с моделируемой введением ЛПС беременностью показали, что немаловажное значение в генезе нарушений физического и сенсорно-двигательного развития у потомства могут играть морфо-функциональные нарушения эндотелия кровеносных сосудов. Учитывая, что эндотелий играет ключевую роль в регуляции сосудистого тонуса и кровотока, в том числе и на уровне матки, его повреждение является фактором нарушений у потомства при беременности, осложненной инфекцией. В свою очередь,

повреждение эндотелия может быть обусловлено повышенной продукцией оксида азота и активацией окислительных процессов под влиянием ЛПС.

Выводы

1. Введение ЛПС беременным крысам в период плацентации ухудшает физическое развитие потомства, способствует отставанию созревания сенсорно – двигательных рефлексов и ухудшает координацию движений.
2. Дисфункция эндотелия кровеносных сосудов, проявляющаяся нарушением эндотелийзависимых механизмов вазодилатации и десквамацией эндотелия сосудов, является одним из звеньев патогенеза нарушений у развивающегося потомства при введении липополисахаридного компонента микробов, а, следовательно, может иметь место в патогенезе нарушений при беременности, осложненной инфекцией.
3. Возникновение дисфункции эндотелия кровеносных сосудов, а также нарушений развития потомства крыс, получавших ЛПС, обусловлено NO-зависимыми механизмами.
4. Коррекция нарушений физического и сенсорно-двигательного развития потомства при воздействии ЛПС компонента микроорганизмов в период беременности должна быть направлена на устранение дисфункции эндотелия кровеносных сосудов как важного звена их патогенеза.

Литература

1. Воронина, Т. А. Характеристика фармакологических свойств феназепама / Т. А. Воронина, Ю. И. Вихляев // Феназепам, Киев, Наукова думка. – 1982. – С. 87 – 151.
2. Костюк, В. А. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Е. Ф. Лунец // Вопросы мед. химии. – 1984. – № 4. – С. 125 – 127.
3. Макаров, О. В. Современные представления о внутриутробной инфекции / О. В. Макаров // Акушерство и гинекология. – 2004. – № 1. – С. 10 – 13.
4. Сорокина, С. Э. Ценность клинических методов обследования в прогнозировании внутриутробного инфицирования плода / С. Э. Сорокина // Акушерство и гинекология. – 2003. – № 5.-С. 50 – 53.
5. Черняускене, Р. Ч. Одновременное флюориметрическое определение концентраций витаминов Е и А в сыворотке крови / Р. Ч. Черняускене, З. З. Варшкявичене, П. С. Грибаускас // Лабораторное дело. – 1984. – Т. 6. – С.362 – 365.
6. Busse, R. Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and functional implications / R. Busse, I. Fleming, V. Schini // In: The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology (eds. Koprowski, H., Maeda, H.).-Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. – 1995. – P. 7 – 18.
7. Brady, J. V. Subcortical mechanisms in emotional behavior: Affective changes following septal forebrain lesions in the albino rat / J. V. Brady, V. J. H. Nauta // J. Cong and Physiol. Pscychol. – 1953. – P. 339 – 346.

8. Gryglewski, R. J. The endothelium: a new secretory organ target or promoter of pathophysiological derangements in ICU patients / R. J. Gryglewski // *The Endothelium: A New Secretory organ.* – 1995. – P.207 – 215.
9. Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, M. Uchiyama // *Anal. Biochem.* – 1978. – V. 86. (1). – P. 271 – 278.
10. Rice-Evans, C. A. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research / C. A. Rice-Evans, A.T. Diplock, M.C.R. Symons // Elsevier. – 1991. – Elsevier Amsterdam-London-New York. – Tokyo. – P. 291.