

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ L-АРГИНИНА НА ТЕЧЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ И СОСТОЯНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ

С.Р. САМПАРА, О.З. ЯРЕМЧУК, О.О. ШЕВЧУК

ГБУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет
им. И.Я. Горбачевского МЗ Украины»

Резюме. В результате проведенных исследований на беременных мышах линии Balb/c с моделированным антифосфолипидным синдромом установлено, что предшественник синтеза оксида азота L-аргинин (Тивортин) предупреждает смертность животных, улучшает показатели фертильности и состояние потомства, нормализует показатели системы прооксиданты/антиоксиданты в плаценте животных на 18 сутки беременности и в легких новорожденных животных, положительно влияет на состояние дыхательной системы новорожденных мышей.

Ключевые слова: тивортин, антифосфолипидный синдром, беременность, новорожденные, сурфактант.

FEATURES OF THE INFLUENCE OF L-ARGININE IN PREGNANCY AND THE RESPIRATORY SYSTEM OF NEWBORNS IN EXPERIMENTAL ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

S.R. SAMPARA, O.Z. JAREMCZUK, O.O. SHEVCHUK

HSEI "I.Ya. Gorbachevsky Ternopil State Medical University of Ministry
of Public Health of Ukraine"

Resume. It was shown on pregnant Balb/c mice that the precursor of nitric oxide synthesis L-arginine (Tivortin) decreases the level of animal mortality, improves fertility and offspring condition, normalizes prooxidant/antioxidant balance in the placenta of animals on the 18th day of pregnancy and in the lungs of newborn animals. It also possesses a positive effect on the respiratory system of newborn mice

Key words: tivortin, antiphospholipid syndrome, pregnancy, newborn, surfactant.

Введение. Главную роль в патогенезе антифосфолипидного синдрома (АФС) играет образование антител к собственным фосфолипидам (аФЛ), преимущественно кардиолипину, что приводит к развитию сосудистых тромбозов и лежит в основе возникновения акушерской патологии [17]. При беременности, протекающей на фоне АФС, в кровотоке матери циркулируют аФЛ, что отрицательно сказывается на процессах имплантации и эмбриогенеза, а также провоцирует привычные выкидыши, преждевременные роды и возникновение респираторных расстройств у новорожденных [2,6]. В основе этих нарушений лежит тромбообразование в микроциркуляторном русле, возникающее под влиянием аФЛ, что приводит к развитию плацентарной недостаточности и хронической гипоксии плода и сопровождается невынашиванием беременности, задержкой структурно-функционального развития легочной ткани плода с недостаточным созреванием системы сурфактанта и, как следствие, возникновением

респираторного дистресс-синдрома новорожденного [6, 7].

Несмотря на то, что патогенетические аспекты акушерского АФС достаточно освещены [12, 13], имеются лишь единичные исследования о роли в патогенезе осложнений АФС недостаточности системы оксида азота (NO) – вазоактивного соединения, которое синтезируется в организме из аминокислоты L-аргинина под влиянием фермента NO-синтазы и синтез и биодоступность которого нарушается при акушерском АФС [14, 16].

Цель данной работы – установить возможность уменьшения осложнений беременности и улучшения состояния плодов и новорожденных животных при экспериментальном антифосфолипидном синдроме с помощью предшественника синтеза NO L-аргинина.

Материалы и методы исследования: Исследование проводилось на 96 биологических объектах: 30 половозрелых самках мышей линии Balb/c (из них в процессе эксперимента забеременело 18 особей), их плодах и

новорожденных (66 особей). Животные содержались в условиях вивария с контролируемым температурным режимом, на стандартном рационе, со свободным доступом к пище и воде. Все манипуляции с мышами проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей [15].

АФС моделировали с использованием кардиолипина («Sigma», США), который вводили внутримышечно 4 раза (30 мкг на одну инъекцию, промежутки между инъекциями составляли 14 дней) [5]. Для повышения эффективности иммунного ответа кардиолипин вводили в адьюванте Фрейнда. Модель АФС формировалась через 2 недели после последней инъекции кардиолипина. Подопытных самок мышей разделили на три группы (по 10 особей в каждой: 1 – интактные животные, 2 – животные, у которых моделировали АФС, 3 – животные, которым после воспроизведения АФС вводили L-аргинин (Тивортин, ООО "Юрия-Фарм", 25 мг/кг, внутривбрюшинно ежедневно в течение 10 дней до оплодотворения и на протяжении 17 дней беременности). Через 10 суток после начала прегравидарной терапии предшественником синтеза NO самок всех трех групп спаривали с самцами. Первый день беременности у самок подтверждали наличием белых вагинальных пробок и путем микроскопии вагинальных мазков, окрашенных метиленовым синим [4]. Исследования проводили на 18-е сутки беременности и сразу после родов. Подсчитывали количество плодов, мест имплантации (белое дисковидное утолщение стенки матки), резорбций (шаровидное утолщение матки, до 2 мм в диаметре), а также количество новорожденных [5]. Взвешивание животных проводилось на электронных лабораторных весах (плодов – на 18 сутки беременности, новорожденных – сразу после рождения).

Для подтверждения развития АФС проводили реакцию микропреципитации (РМП) с кардиолипиновым антигеном – с помощью тест системы «Антиген кардиолипиновый, для РМП» («Биолек», Украина, Харьков) [5].

Определяли: в 10 % гомогенатах плаценты самок и легких новорожденных: активность супероксиддисмутазы (СОД) [10], каталазы [8], содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ) [3] и ТБК-активных продуктов (ТБП) [1]. Также подсчитывали количество беременных самок, их смертность, массу плодов, новорожденных и плаценты, количество мест

имплантаций и резорбций. Рассчитывали постимплантационную гибель эмбрионов по формуле:

$$\text{ПсИГ} = \frac{\text{КМИ} - \text{КЖП}}{\text{КМИ}} \times 100 \%$$

ПсИГ – постимплантационная гибель эмбрионов.

КМИ – количество мест имплантаций,

КЖП – количество живых плодов.

В гомогенатах матки определяли концентрацию нитрит-аниона NO(2) (-) [11]. Определяли поверхностную активность экстрактов легких новорожденных мышей с помощью метода Паттла [9].

Для статистических расчетов использовали компьютерную программу Statistica от компании StatSoft (Россия).

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что в контрольной группе мышей линии Balb/c забеременело 50 % особей, среди животных с АФС – 40 %, а среди мышей, которым предварительно вводили Тивортин, – 90 % самок. Смертность среди беременных самок была отмечена только в группе животных с контрольной патологией (25 %).

У самок из группы контроля в среднем было по 8-9 живых плодов, места резорбций отсутствовали, что свидетельствует об отсутствии постимплантационной гибели эмбрионов. У самок с АФС количество живорожденных плодов на одну самку составляло 4-5, при этом ПсИГ была равна 36,9%.

В группе животных с АФС, которым вводили Тивортин, количество живых плодов составило в среднем 5-7 на мышью, а показатель ПсИГ был существенно ниже (14 %) в сравнении с животными с АФС, которым не проводили коррекцию.

Как свидетельствуют результаты, представленные в таблице 1, средняя масса плодов на 18-е сутки беременности у самок с АФС была на 15 % ниже, чем плодов от самок контрольной группы. Масса плодов у самок, которым вводили Тивортин, была на 23 % выше показателей группы животных с АФС и достоверно не отличалась от контрольной группы, что свидетельствует о нормализации данного показателя. Масса новорожденных у самок 2-й группы не отличалась от аналогичного показателя в контроле, а в 3-й группе была на 19 % больше, чем в контроле. Масса плаценты у самок с АФС проявляла тенденцию к снижению, по сравнению с аналогичным показателем у контрольных животных. У животных, которым вводили Тивортин, данный показатель не отличался от контроля (табл. 1).

Таблица 1.

Некоторые показатели фертильности и состояния матки и плаценты при антифосфолипидном синдроме и назначении Тивортин (M±m)

Показатель	Группа животных		
	Контроль	АФС	АФС+Тивортин
Среднее количество плодов на 1 самку	8,8 ± 0,3	4,6 ± 0,2 p < 0,01	6,1 ± 0,3 p ₁ < 0,01 p < 0,01
ПсИГ, %	0	34,8	9,7
Средняя масса плодов, мг	845,0 ± 10,0	705,0 ± 7,0 p < 0,01	881,0 ± 9,0 p ₁ < 0,01 p > 0,05
Средняя масса новорожденных, мг	1210,0 ± 7,0	1180 ± 50,0 p > 0,05	1440 ± 30,0 p ₁ < 0,01 p < 0,01
Средняя масса плаценты, мг	190,0 ± 3,0	180,0 ± 3,0 p > 0,05	194,0 ± 5,0 p ₁ > 0,05 p > 0,05
ГПЛ (плацента), 10 ³ усл. ед./кг	4,4 ± 0,16	6,0 ± 0,08 p < 0,01	5,4 ± 0,10 p ₁ < 0,01 p < 0,01
СОД (плацента), усл. ед./кг	4,21 ± 0,07	2,26 ± 0,06 p < 0,01	6,54 ± 0,11 p ₁ < 0,01 p < 0,01
NO ₂ ⁻ (плацента), мкмоль/ кг	6,63 ± 0,04	5,16 ± 0,02 p < 0,01	6,70 ± 0,12 p ₁ < 0,01 p > 0,05

В гомогенатах плаценты мышей с АФС зарегистрировано повышение уровня ГПЛ на 36 % с одновременным снижением активности СОД на 46 % по сравнению с контролем (p < 0,01) (см. табл. 1). Указанные изменения сопровождались уменьшением содержания стабильного метаболита NO – NO(2)(-) в гомогенатах плаценты мышей с АФС (на 22 % по сравнению с контрольной группой). У мышей, которым предварительно вводили Тивортин, по сравнению с контрольной патологией, уровень ГПЛ уменьшился на 10 %, уровень СОД повысился на 189 % (p < 0,01), а содержание стабильного метаболита NO в ткани плаценты – NO(2)(-) выросло на 30 % (p < 0,01) и не отличалось от контроля (см. табл. 1).

При исследовании показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы установлено, что в гомогенатах легких у новорожденных мышей от самок с АФС происходило повышение уровня ТБП с 3,2 ± 0,004 до 5,5 ± 0,01 (нмоль/мл), или на 71%, и каталазы с 19,8 ± 0,07 до 35,3 ± 0,1 (мкат/кг), или на 78 %, с одновременным снижением СОД с 27,9 ± 0,1 до 18,4 ± 0,2 (усл.ед./кг), или на 34 % (p = 0,01). В легких новорожденных, матери которых получали L-тивортин, в сравнении с предыдущей группой (с АФС без коррекции), снизился уровень ТБП на 35 % (до 3,06 ± 0,01 ммоль/кг) и каталазы на 54 % (до 16,2 ± 0,07 мкат/кг), с одновременным

повышением СОД на 26 % (до 23,2 ± 0,1 усл.ед./кг) (рис.1).

При исследовании поверхностной активности экстрактов легких методом Паттла установлено, что у мышат, родившихся от самок группы контроля, коэффициент стабильности составил в среднем 0,99 ± 0,01, что соответствует низкому поверхностному натяжению и свидетельствует о нормальном количестве сурфактанта. У новорожденных от самок с АФС данный показатель снижался и составил 0,69 ± 0,01, что подтверждает угнетение образования сурфактанта в легких животных этой группы [16]. У мышат, родившихся от самок, которым прегравидарно и во время беременности вводили Тивортин, данный показатель находился на уровне 0,83 ± 0,03, что соответствует нижней границе нормы [16].

Заключение. Таким образом, предшественник синтеза оксида азота L-аргинин (препарат Тивортин) способствует повышению показателей фертильности и улучшению состояния потомства (количества и массы плодов и новорожденных животных) у самок мышей линии Balb/c с антифосфолипидным синдромом, предупреждает их гибель во время беременности, нормализует показатели системы прооксиданты/антиоксиданты в плаценте на 18 сутки беременности и в легких новорожденных животных, положительно влияет на состояние дыхательной системы новорожденных мышей.

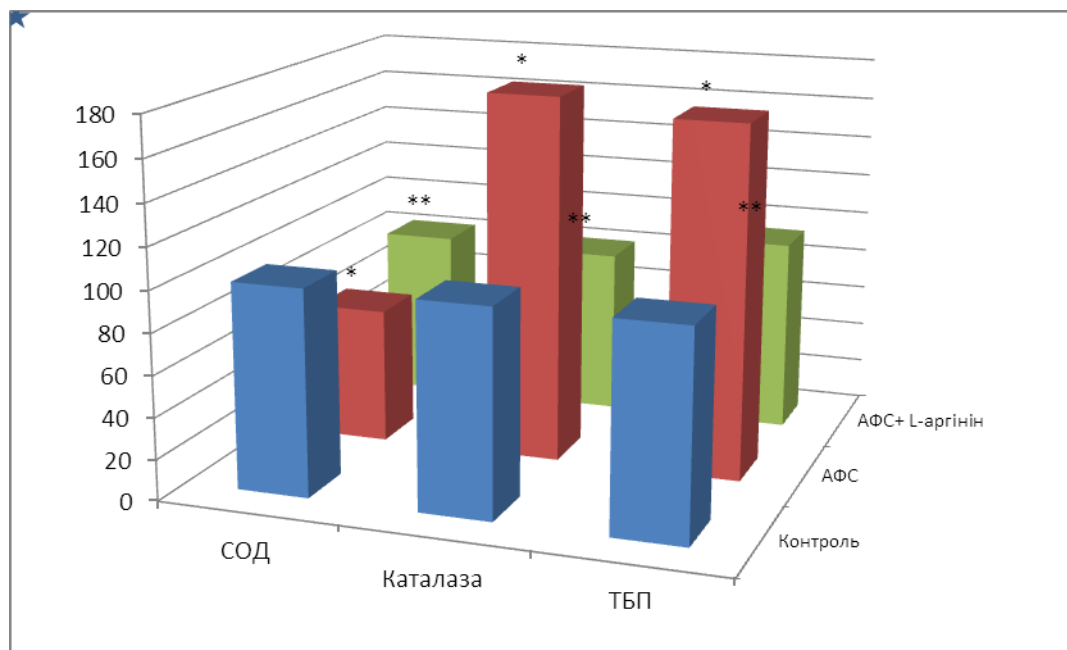


Рис. 1. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в легких новорожденных мышей при антифосфолипидном синдроме и коррекции L-аргинином (%).

Примечание. Достоверность различий относительно: * – контроля, ** – антифосфолипидного синдрома; показатели в контроле приняты за 100 %.

Выводы:

1. Экспериментальный акушерский антифосфолипидный синдром у мышей линии Balb/c сопровождается снижением массы плаценты, количества и массы плодов и новорожденных животных, увеличением числа мест резорбции в плаценте, возрастанием коэффициента послеимплантационной гибели, увеличением в плаценте содержания продуктов перекисного окисления липидов с уменьшением активности супероксиддисмутазы, что происходит на фоне снижения уровня синтеза оксида азота. Смертность среди беременных самок в группе с антифосфолипидным синдромом составляет 25 %.

2. При исследовании поверхностной активности экстрактов легких новорожденных мышей от матерей с АФС отмечается уменьшение образования сурфактанта.

3. Предшественник синтеза оксида азота L-аргинин (Тивортин) при гестационном антифосфолипидном синдроме препятствует гибели животных во время беременности, способствует снижению репродуктивных потерь, о чем свидетельствует уменьшение процента мест резорбции плодов, показателя послеимплантационной гибели, нормализации массы плаценты, плодов и новорожденных животных.

4. L-аргинин (Тивортин), при его использовании для прегравидарной подготовки и во время беременности у мышей линии Balb/c с антифосфолипидным синдромом, способствует восстановлению активности

супероксиддисмутазы, каталазы, содержания гидроперекисей липидов в гомогенатах плаценты, в легких новорожденных мышей – уменьшению дисбаланса в системе прооксиданты/антиоксиданты и стимуляции синтеза сурфактанта.

Литература:

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. Бандур Н.Н. Развитие респираторного дистресс-синдрома у новорожденных в зависимости от количества антифосфолипидных антител / Н. Н. Бандур // Врач аспирант. – 2006. – №6. – С. 542–546.
3. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
4. Доклінічне вивчення лікарських засобів, призначених для лікування плацентарної дисфункції : методичні рекомендації / Л.В. Яковлева, Г.В. Зайченко, А.Г. Ципкун [таін.]. – К., 2009. – 61 с.
5. Зайченко Г. В. Морфологічний стан матки та плаценти при експериментальному моделюванні гестаційного антифосфоліпідного синдрому на мишах / Г. В. Зайченко, Ю. Б. Лар'яновська, Т. В. Деєва [та ін.] // Український

медицинский альманах. – 2011. – Т. 14, № 4. – С. 136-141.

6. Ижедерова И.Р. Особенности развития гипоксических повреждений внутриутробного плода и новорожденного при антифосфолипидном синдроме / И.Р. Ижедерова, Л.Н. Иванов, Т.Н. Охотина // Медицинский альманах. – 2010. – №4. – С. 105–108.

7. Кириченко Ю.А. Застосування амніоінфузії для профілактики респіраторного дистрес-синдрому при недоношеній вагітності, ускладненій передчасним вилиттям навколоплідних вод / Ю.А. Кириченко // Актуал.пробл.медицины и биологии.–2002. – № 1. –С. 235–242.

8. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова [и др.] // Лаб.дело. –1988. – № 1. – С. 16-18.

9. Нестеров Е. Н. О методах и некоторых результатах изучения поверхностно-активного вещества легких (сурфактанта) / Е. Н. Нестеров, Г. В. Кобзев, Г. А. Заварзина // Архив патологии. – 1973. – Т. 35, № 10. – С. 72 – 75.

10. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чавари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678 – 681.

11. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, A.W. Davie, J. Golawski[et. al.] // Anal. Biochem. – 1982. – Vol. 126, N. 1. – P.131 – 138.

12. Antiphospholipid antibodies induce vascular functional changes in mice: a mechanism of vascular lesions in antiphospholipid syndrome? / Belizna C, Lartigue A, Favre J, Gilbert D [et al.] // Lupus. – 2008. – 17(3). – P. 185-194.

13. Chieko Mineo. New Insights into the Molecular Basis of the Antiphospholipid Syndrome / Chieko Mineo, P.W. Shaul // DrugDiscovTodayDisMech. – 2011. – 8(1-2): e 47–e 52.

14. Dual effect of nitric oxide on uterine prostaglandin synthesis in a murine model of preterm labour / M. Cella, M.G. Farina, A.P. Dominguez Rubio Di Girolamo, M.L. Ribeiro, A.M.

Franchi // BrJPharmacol. – 2010. – 161(4). – P. 844–855.

15. European convention for protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Counsil of Europe. – Strasburg, 1986. –N. 123. – 52 p.

16. Evaluation of the tocolytic effect of morphine in a mouse model of lipopolysaccharide-induced preterm delivery: the role of nitric oxide / M. Javadi-Paydar, A.Lesani, R.Vakilipour, P. Ghazi[etal.] // EurJObstetGynecolReprodBiol. – 2009. – 147(2):166-72.

17. Levine J. S. The antiphospholipid syndrome / J. S. Levine, D. W. Branch, J. Rauch // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol. 346, N. 10. – P. 752–763.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛ АНТИФОСФОЛИПИД СИНДРОМДА L-АРГИНИННИНГ ХОМИЛАДОРЛИК КЕЧИШИГА ВА ЯНГИ ТЎҒИЛГАНЛАРДА НАФАС ТИЗИМИ ХОЛАТИГА ТАЪСИРИНИНГ ЎЗИГА ХОС ХУСУСИЯТЛАРИ

С.Р. САМПАРА, О.З. ЯРЕМЧУК,
О.О. ШЕВЧУК

Украина ССВ И.Я. Горбачевский номидаги
Тернополь Давлат медицина университети

Резюме. Антифосфолипид синдроми билан касалланган Balb/c туридаги хомиладор тажриба сичқонларида текшириш натижаларига кўра, азот оксиди синтезининг авлоди L-аргинин (Тивортин) хайвонлар ўлим кўрсаткичини оғоҳлантириб, фертил ва насл холати кўрсаткичларини яхшилайти. Шунингдек хомиладорликнинг 18 суткасида хайвонлар плацентасида ва янги тўғилган хайвонлар упкасида прооксидантлар, антиоксидантлар кўрсаткичини меъёрлаштириб, янги тўғилган сичқонлар нафас тизими холатига ижобий таъсир кўрсатади.

Калит сўзлар: тивортин, антифосфолипид синдроми, хомиладорлик, янги тўғилганлар, сурфактант.