



Роль оксида азота в регуляции функции перитонеальных макрофагов у крыс при экспериментальном нарушении маточно-плацентарного кровообращения

А.С. Иванова¹, И.Г. Попова², С.Б. Назаров^{1,2}

¹ – Ивановская государственная медицинская академия, Минздравсоцразвития РФ, Иваново

² – Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова, Минздравсоцразвития РФ, Иваново

Контактная информация: Анастасия Сергеевна Иванова asivanova@mail.ru

Изучение активности перитонеальных макрофагов, состояние NO-зависимых механизмов и свободнорадикальных процессов при нормальной беременности и на фоне экспериментального нарушения маточно-плацентарного кровообращения (НМПК) проводилось на белых крысах.

При введении L-NAME и при НМПК в сыворотке крови наблюдаются сходные изменения в виде снижения уровня суммарных нитратов и нитритов, усиления свободнорадикальных процессов. Активность перитонеальных макрофагов меняется противоположным образом: L-NAME ее значительно увеличивает, а НМПК — уменьшает. При сочетанном воздействии повышается продукция оксида азота и образование нитротирозина, что в этих условиях играет защитную роль, обеспечивая приспособление нарушенного фето-плацентарного кровотока к потребностям плода, активность макрофагов соответствует уровню интактных крыс.

Ключевые слова: оксид азота, беременность, перитонеальные макрофаги, гипоксия плода.

Изучение закономерностей регуляторных процессов гестации имеет не только важное теоретическое значение, но и практическую ценность, которая заключается в выяснении причин нарушения физиологических механизмов при различных патологиях беременности и выработке подходов к их коррекции. В этом плане одно из центральных мест занимает проблема NO-зависимой регуляции гестации. В результате развития этого направления исследований накоплен достаточно большой объем инфор-

мации, дающей представление о роли оксида азота при беременности и родах [15, 17, 18]. Известно, что изменение уровня NO приводит к появлению классических симптомов эклампсии, фето-плацентарной недостаточности, эмбрио- и фетопатиям, внутриутробной задержке роста и смерти плода.

Оксид азота продуцируется множеством клеток, в том числе индуцибельной NO-синтазой макрофагов, и существенно влияет на их активность. Макрофаги в работе женской репродуктивной си-

стемы выполняют множество функций: обеспечивают взаимодействие в системе мать-плацента-плод, регулируют ангиогенез и процессы апоптоза в плаценте, образование стероидных гормонов, фолликулогенез, образование желтого тела и его регрессию [3, 5].

При повышении концентрации NO на фоне усиления свободнорадикальных процессов может образовываться высокотоксичное долгоживущее соединение пероксинитрит, который вызывает повреждение клеток и тканей [8]. В то же время при дефиците оксида азота активируются липооксигеназа и циклооксигеназа, высвобождаются протеолитические ферменты и медиаторы воспаления [11, 21].

Цель работы — изучить активность перитонеальных макрофагов, состояние NO-зависимых механизмов и свободнорадикальных процессов при нормальной беременности и на фоне нарушения маточно-плацентарного кровообращения у белых крыс.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 70 белых беспородных половозрелых крысах-самках массой 200–260 г. Животные содержались в условиях вивария на стандартном рационе и имели свободный доступ к воде. Выбор крыс как объекта исследований обусловлен их гемохориальным типом плаценты, подобным человеку, что имеет значение для интерпретации данных при использовании этого вида животных в эксперименте. Первый день беременности регистрировался по появлению сперматозоидов во влагалищных мазках.

Животные были разделены на 5 групп: 1) животные с нормальной беременностью; 2) беременные крысы, полу-

чавшие неселективный ингибитор синтеза оксида азота *Nw-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME) внутримышечно в дозе 10 мг/кг с 1-го дня беременности [9]; 3) беременные крысы с экспериментальным нарушением маточно-плацентарного кровообращения [2]; 4) беременные крысы с экспериментальным нарушением маточно-плацентарного кровообращения и введением неселективного ингибитора синтеза оксида азота L-NAME внутримышечно в дозе 10 мг/кг с 1-го дня беременности; 5) ложноперированные беременные крысы (группа сравнения).

Операция по нарушению маточно-плацентарного кровообращения проводилась под нембуталовым наркозом (40 мг/кг) по методике М.М. Вартановой (1984) путем перевязки части преплацентарного сосудистого пучка на 16-й день беременности, то есть в тот период, когда плацентация уже завершена и плод полностью переходит на плацентарное кровообращение.

У животных на 20-й день беременности осуществлялся забор крови из подъязычного сплетения. В сыворотке оценивали следующие показатели: концентрация суммарных нитратов и нитритов (NO_x , по методике *Miranda K.*, 2001), концентрация нитротирозина (с использованием набора для ИФА-исследований фирмы NBT, Нидерланды), состояние свободнорадикальных процессов и антиоксидантная активность (хемилюминесцентным методом на биохемилюминометре БХЛ-06М). Активность свободнорадикальных процессов в организме определяли по светосумме свечения (S) и максимальной интенсивности сигнала (Im), состояние антиоксидантной защиты — по тангенсу угла наклона кривой ($tg\ 2$).

Функцию перитонеальных макро-

фагов оценивали, используя предложенную Mantovani B. (1987) методику их краткосрочного культивирования с аутологичными эритроцитами [14]. Макрофаги крыс взаимодействуют с аутологичными эритроцитами *in vitro* с образованием розеткоподобных структур. Производился дифференциальный подсчет этих структур с выделением 5 типов: макрофаги без эритроцитов (МФ0), макрофаги, несущие на своей поверхности 1–2 (1-й тип, МФ1), 3–5 (2-й тип, МФ2), 6–8 (3-й тип, МФ3), более 9 эритроцитов (4-й тип, МФ4). Для интегральной оценки клеточных механизмов эритродиереза рассчитывался индекс адгезионно-фагоцитарной активности (ИАФА): $ИАФА = (МФ_1 + 2 * МФ_2 + 3 * МФ_3 + 4 * МФ_4) / МФ_0$.

Эвтаназию животных осуществляли под нембуталовым наркозом (50 мг/кг) путем дислокации шейных позвонков.

Статистическая обработка полученных результатов производилась методами вариационного анализа с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Показатели ложнооперированных животных от интактных беременных крыс достоверно не отличаются.

При введении L-NAME в организм беременных животных в сыворотке крови достоверно снижается концентрация NO_x , содержание нитротирозина не меняется, что можно объяснить торможением активности NO-синтаз. Активность свободнорадикальных процессов повышается, антиоксидантная активность увеличивается (табл. 1). На этом фоне возрастает фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов (табл. 2). Увеличивается число розеток 2 и 3 типа. Величина ИАФА

больше значений интактных животных на 512%. Усиление фагоцитоза можно объяснить, с одной стороны, нарушением под влиянием L-NAME нормальной структуры мембран [20], а с другой — свободнорадикальным их повреждением под влиянием ПОЛ, вследствие дефицита оксида азота, обладающего антиоксидантным действием [21]. Подобные изменения возникают не только в эритроцитах, но и в эндотелии, приводя к его дисфункции. В этих условиях повышается активность макрофагов через увеличение образования в них интерлейкина-6, *monocyte chemoattractant protein-1* и *nuclear factor-kB* [7]. Согласно современным представлениям, физиологическую беременность можно назвать «умеренным воспалением», а беременность при гестозе является крайним случаем — «избыточным воспалением». По мнению ряда авторов, оно связано с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов на фоне дефицита NO и чрезмерной активацией макрофагов [16], что мы и наблюдаем в нашем случае.

При нарушении маточно-плацентарного кровообращения наблюдаются изменения, сходные с предыдущей группой животных (табл. 1). В сыворотке крови снижается концентрация NO_x , содержание нитротирозина достоверно не меняется. Уровень свободнорадикальных процессов достоверно повышается. Эти изменения можно объяснить возникновением эндотелиальной дисфункции при перевязке преплацентарного сосудистого пучка, связанной с облитерацией части сосудов и существенным перераспределением кровотока на фоне гипоксии плаценты и плода [1]. В условиях сниженного синтеза оксида азота происходит оксидантное повреждение

Таблица 1

Состояние NO-зависимых механизмов
и свободнорадикальных процессов у белых крыс

Показатель	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
NO _x , ммоль/л	242,7±23,86	178,22±8,10*	165,6±8,36*	211,4±16,94#&
нитротирозин, нмоль/л	4,56±0,26	4,92±0,40*	4,57±0,56	6,23±0,42*#&
состояние свободнорадикальных процессов и антиоксидантная активность				
S, имп./с	12,46±0,98	19,36±1,81 [†]	15,28±0,92 ^{†*}	18,36±1,08 [†]
Imax, имп./с	1,91±0,08	2,93±0,11 [†]	2,76±0,09 [†]	2,72±0,08 [†]
tg2	0,52±0,02	0,72±0,04 [†]	0,66±0,05 [†]	0,30±0,02 ^{†*#}

Примечание: * — отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 1-й группы животных;

— отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 2-й группы животных;

& — отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 3-й группы животных.

Таблица 2

Активность перитонеальных макрофагов у крыс разных групп

Показатели	Группы			
	1	2	3	4
МФ0, %	55,1 ±2,64	22,8±2,68*	68,89±3,53**	51,83±7,44 [#]
МФ1, %	34,6±2,12	30,2±2,86	25,00±2,72*	27,67±4,62
МФ2, %	7,67±0,94	37,0±1,89*	4,89±1,54 [#]	13,83±3,69 [#]
МФ3, %	1,67±0,50	8,50±1,95*	1,22±0,44 [#]	5,17±2,23 [#]
МФ4, %	1,00±0,47	1,50±1,20	1,11±0,66	1,50±0,66
ИАФА	1,13 ±0,14	6,89 ±1,50*	0,67±0,11**	1,95±0,58 [#]

Примечание: * — отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 1-й группы животных;

— отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 2-й группы животных;

& — отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 3-й группы животных.

эндотелиальных клеток, повышается активность ангиотензина и тромбина, что в совокупности приводит к нарушению микроциркуляции, возникновению многоочаговой тканевой гипоксии, которая еще более усугубляет степень повреждения сосудов и сопряженных с этим осложнений [12]. Таким образом, в случае НМПК также моделируется гестоз. Однако активность перитонеальных макрофагов достоверно меньше, чем у интактных животных (ИАФА ниже на 40%), и, тем более, чем у животных с L-NAME (табл. 2). Это, вероятно, можно объяснить более выраженными и менее продолжительными нарушениями образования оксида азота (при введении L-NAME NO_x снижается по сравнению с интактными крысами на 27%, при НМПК — на 46%), снижением выработки *macrophage colony-stimulating factor* [6], увеличением выработки глюкокортикоидов [10], изменением двигательной активности макрофагов вследствие гипоксии, индукцией в них процессов апоптоза [4].

При нарушении маточно-плацентарного кровообращения на фоне введения антагониста оксида азота концентрация NO_x и содержание нитротирозина достоверно повышаются по сравнению с изолированным нарушением маточно-плацентарного кровообращения и введением L-NAME. Активность свободнорадикальных процессов достоверно не меняется по сравнению с 2-й и 3-й группами животных (табл. 1), но значительно снижается антиоксидантная активность. Повышение уровня NO при сочетанном нарушении связано, вероятно, с активацией индуцибельной NO-синтазы при длительном введении антагониста оксида азота [17], что необходимо для существования плодов в этих условиях. Увеличение уровня нитротирозина

свидетельствует о высоком образовании пероксинитрита, который играет относительную саногенетическую роль, являясь вазодилататором, но при этом ингибирует активность других сосудорасширяющих веществ, увеличивая сосудистую дисфункцию [13, 19]. Активность макрофагов в этих условиях увеличивается по сравнению с изолированным НМПК и практически достигает уровня интактных крыс (табл. 2). Вероятно, повышение образования оксида азота стимулирует перитонеальные макрофаги.

Таким образом, при введении L-NAME и при НМПК в сыворотке крови наблюдаются сходные изменения в виде снижения уровня NO_x , активации свободнорадикальных процессов. Активность перитонеальных макрофагов меняется противоположным образом: L-NAME ее значительно увеличивает, а НМПК — уменьшает. При сочетанном воздействии повышается концентрация NO_x и нитротирозина, что в этих условиях играет защитную роль, обеспечивая приспособление нарушенного фето-плацентарного кровотока к потребностям плода, активность макрофагов соответствует уровню интактных крыс.

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. **Вартанова М.М.** Патогенез и профилактика синдрома отставания в развитии плода при плацентарной недостаточности и его отдельные последствия // Автореферат дисс. докт. мед. наук. Ленинград. 1984.

3. **Шестопалов А.В.** Метаболическая активность плацентарных макрофагов и молекулярные механизмы формирования плаценты при различных вариантах течения беременности // Автореферат дисс. докт. мед. наук. Ростов-на-Дону. 2007.
4. **Burke M.R., Troeger C., Brinkhaus W. et al.** Severely reduced presence of tissue macrophages in the basal plate of preeclamptic placentae // *Placenta*. 2001. Vol. 22. № 4. P. 309–316.
5. **Cohen P.E., Nishimura K., Zhu L., Pollard J. W.** Macrophages: important accessory cells for reproductive function // *Journal of Leukocyte Biology*. 1999. Vol. 66. P. 765–772.
6. **Fried G., Sand A., Èstlund E. et al.** Endothelin-1 and macrophage colony-stimulating factor are co-localized in human amnion membrane cells and secreted into amniotic fluid // *Molecular Human Reproduction*. 2003. Vol. 9. № 11. P. 719–724.
7. **Gonzalez W., Fontaine V., Pueyo M. E. et al.** Molecular plasticity of vascular wall during G-Nitro-L-Arginine Methyl Ester—induced hypertension. Modulation of proinflammatory signals // *Hypertension*. 2000. Vol. 36. P. 103–109.
8. **Goodrum L.A., Saade G.R., Belfort M.A. et al.** Arginine flux and nitric oxide production during human pregnancy and postpartum // *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2003. Vol. 10. № 7. P. 400–405.
9. **Huang H.-S., Ma M.-Ch., Chen J.** Chronic L-arginine administration increases oxidative and nitrosative stress in rat hyperoxaluric kidneys and excessive crystal deposition // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2008. Vol. 295. P. 388–396.
10. **Imperatore A., Rolfo A., Petraglia F. et al.** Hypoxia and Preeclampsia: Increased Expression of Urocortin 2 and Urocortin 3 // *Reproductive Sciences*. 2010. Vol. 17. № 9. P. 833–843.
11. **Kanner J, Harel S, Granit R.** Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclo-oxygenase and hemoglobin // *Lipids*. 1992. Vol. 27. P. 46–49.
12. **Krikun G., Huang S.T., Schatz F. et al.** Thrombin activation of endometrial endothelial cells: a possible role in intrauterine growth restriction // *Thromb Haemost.* 2007. Vol. 97. № 2. P. 245–253.
13. **Liu S., Beckman J.S., Ku D.D.** Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994. Vol. 268. P. 1114–1121.
14. **Mantovani B.** Phagocytosis of in vitro aged erythrocytes — a sharp distinction between activated and normal macrophages // *Exp. Cell. Res.* 1987. Vol. 173. № 1. P. 282–286.
15. **Nath A.K., Enciso J., Kuniyasu M.** Nitric oxide modulates murine yolk sac vasculogenesis and rescues glucose induced vasculopathy // *Development*. 2004. № 131. P. 2485–2496.
16. **Redman C.W.G., Sargent I.L.** Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response — a review // *Placenta*. 2003. Vol. 17. P. 1–27.
17. **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.
18. **Sladek S.M., Magness R.R., Conrad K.P.** Nitric oxide and pregnancy // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 272. P. 441–463.
19. **Villa L.M., Salas E., Darley-Usmar M, Radomski M.W.** Peroxynitrite induces

- both vasodilation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. Vol. 91. P.12383–12387.
20. *Vokurkova M., Dobesova Z., Pechanova O. et al.* Erythrocyte ion transport and membrane lipid composition in young and adult rats with NO-deficient hypertension // *Life Sci*. 2003. Vol. 73. P. 1637–1644.
21. *Wink D., Hanbauer I., Krishna M., DeGraff W. et al.* Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 9813–9817.

Role of nitric oxide in the regulation of peritoneal macrophages in rats offspring chronic disturbance of the uteroplacental blood circulation

A.S. Ivanova, I.G. Popova, S.B. Nazarov

Exam of the activity of peritoneal macrophages, NO-dependent state and mechanisms of free radical processes in normal pregnancy and in the background of the experimental disturbance of the utero-placental circulation (DUPC) was done with using of white rats.

With the introduction of L-NAME and DUPC in serum observed similar changes in the form of lower levels of total nitrate and nitrite, increasing free radical processes. Activity of peritoneal macrophages varies in the opposite way – L-NAME significantly increases her, and DUPC - decreases. When combined action of increased production of nitric oxide formation and nitrotyrosine that under these conditions plays a protective role by providing adaptation impaired fetoplacental blood flow to the needs of the fetus, the activity of macrophages corresponds to the intact rats.

Key words: nitric oxide, pregnancy, peritoneal macrophages and fetal hypoxia.