

УДК 577.152.27-591.41:591.39-613.842.

Т.В. Горбач, В.Ю. Юнусов, С.Н. Мартынова

УРОВЕНЬ ИНТОКСИКАЦИИ ОРГАНИЗМА И ЭЛАСТИЧНОСТЬ СОСУДОВ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ–ПОТОМКОВ КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ДЕЙСТВИЮ ТАБАЧНОГО ДЫМА

Харьковский национальный медицинский университет

Резюме. В работе изучено влияние различных вариантов пассивного «табакокурения» крыс-родителей на показатели перекисного окисления липидов в сыворотке крови, содержание коллагена и эластина в сосудах. Установлено, что при «табакокурении» родителей возрастает концентрация ТБК-активных продуктов и молекул средней массы в сыворотке крови новорожденных крысят, что свидетельствует о токсическом дей-

ствии компонентов табачного дыма на плод. Выявлено значительное снижение эластина и увеличение коэффициента коллаген/эластин в аорте и бедренной артерии крысят, наиболее выраженные изменения отмечаются в случае «табакокурения» обоих родителей.

Ключевые слова: крысы, «табакокурение», сосуды, эластин, коллаген, перекисное окисление липидов.

Введение. Проблема снижения перинатальной заболеваемости и смертности – одна из главных медицинских проблем всех стран мира. За последнее десятилетие в Украине резко ухудшилась демографическая ситуация и при этом сохраняются высокие показатели осложнений перинатального периода, поэтому чрезвычайно актуальным как для науки, так и для практического здравоохранения является изучение механизма влияния повреждающих факторов в системе мать-плацента-плод [1]. Среди этих факторов важное значение занимает табакокурение (пассивное и активное) родителей. Общеизвестен факт широкого распространения табакокурения среди молодежи, причем высока доля курящих и среди беременных. Действие ингредиентов табачного дыма на сосуды активных курильщиков достаточно хорошо изучено, табакокурение названо основным этиологическим фактором атеросклероза у молодых пациентов [5]. Менее изучено влияние пассивного табакокурения. О влиянии табачного дыма на сосуды плода практически ничего не известно. В отдельных работах изучается состояние сосудов у детей разного возраста, рожденных курящими матерями. Обнаружено, что табакокурение матерей приводит к развитию эндотелиальной дисфункции у детей, значительному снижению продукции вазодилататора – оксида азота [10]. В то же время установлен факт проницаемости плаценты для большинства токсических компонентов табачного дыма и накопления их в амниотической жидкости [11]. В связи с этим изучение влияния табакокурения родителей на сосуды плода является чрезвычайно актуальным.

Кровообращение – важнейший фактор адаптации органов к меняющимся условиям внешней и внутренней среды. Артериальная система обладает двумя важными взаимосвязанными функциями: 1) доставка адекватного количества крови от сосудов к периферическим тканям, 2) демпфирование колебаний артериального давления, обусловленных интермиттирующим желудочковым выбросом [11]. Нарушение проводящей функции

артерий – фактор риска патологии сердечно-сосудистой системы [11]. Механические свойства кровеносных сосудов обуславливаются, главным образом, свойствами средней сосудистой оболочки, состоящей из коллагена, эластина и гладких мышечных волокон. Сложные взаимодействия между эластическими, коллагеновыми и гладкомышечными волокнами определяют особенности изменения формы и напряжения артериальной стенки и комбинацию этих величин [11]. Сосудистая эластичность определяется взаимодействием между устойчивыми и динамическими изменениями структурных и клеточных элементов сосудистых стенок. Эти сосудистые изменения находятся под влиянием гемодинамики и «внешних» факторов, таких как гормоны, липиды, оксид азота, уровень глюкозы. При низких величинах напряжений или растяжений нагрузка ложится преимущественно на эластический матрикс, при высоких – на коллагеновые волокна, при средних – зависимость «растяжение» – «расслабление» определяется степенью вовлечения коллагеновых волокон [7]. Поэтому при оценке степени эластичности сосудов, которая приобрела в последнее время клинично-прикладное значение, важным показателем является содержание эластина и коллагена в сосудах. Установлено, что увеличение соотношения коллаген/эластин приводит к повышению сосудистой жесткости [6]. Синтез коллагена и эластина регулируется металлопротеиназами, эндотелином, альдостероном, ангиотензином-2, оксидом азота, продуктами перекисного окисления липидов [12]. Причины, приводящие к ухудшению выработки эластина в тканях, разнообразны – образ жизни, экологические факторы, старение, алкоголь, курение [8]. Снижение синтеза эластина приводит к увеличению жесткости сосудов, что является причиной нарушения кровоснабжения тканей и, как следствие, развития метаболических нарушений. Содержание эластина и коллагена в сосудах плода при разных вариантах табакокурения родителей не изучалось.

Цель исследования. Изучить содержание эластина, коллагена и продуктов перекисного оки-

сления липидов (как фактора, влияющего на их синтез) в бедренной артерии новорожденных крысят при пассивном табакокурении их родителей.

Материал и методы. Эксперименты проведены на 3-месячных крысах линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария. При проведении экспериментов придерживались правил обращения с животными в соответствии с международными принципами Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» «Общих этических принципов экспериментов на животных», Устава Украинской ассоциации по биоэтике, норм GLP (1992) и типового положения по вопросам этики, регламентированного приказом МОЗ Украины от 23 сентября 2009 г. по № 690. Крысы были разделены на группы: контрольная (К), «курили» только самки (М), «курили» самки и самцы (МО), 4) «курили» только самцы (О). Моделирование пассивного табакокурения осуществлялось путем помещения крыс в специально сконструированные камеры, достаточные по объему для свободного перемещения, в которые распределялся табачный дым от сигарет «Прилуки». Животные выдерживались в камере на протяжении 15 минут ежедневно: самки – за месяц до беременности и на протяжении вынашивания, самцы – 1 месяц до спаривания. Контрольная группа животных такого же возраста помещалась в камеру ежедневно на 15 минут, но без распределения табачного дыма, согласно схеме для животных опытных групп. Новорожденные крысята выводились из эксперимента путем декапитации. Брели образцы крови. Извлекали аорту и фрагмент бедренной артерии. Сосуды отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором, замораживали жидким азотом, измельчали до порошкообразной консистенции, готовили гомогенаты в 0,32 М трис-НС1 буфере. В сыворотке крови определялось содержание молекул средней массы (МСМ), ТБК-активных продуктов спектрофотометрическими методами [2, 3, 9]. В гомогенатах сосудов определяли содержание эластина- иммуноферментным методом с помощью наборов реактивов фирмы Bender-med System (Австрия), коллагена – спектрофотометрическим методом (по оксипролину) [4].

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью пакета программ «Statistica v. 6.1.478» и «Origin 6.0», используя критерии Стьюдента-Фишера.

Результаты исследования и их обсуждение. Как указывалось выше, на синтез коллагена и эластина в тканях влияет ряд факторов, среди которых важная роль отводится компонентам внешней среды. В условиях нашего эксперимента такими факторами являются токсические компоненты табачного дыма и продукты их метаболизма, попадающие в организм плода из материнской крови. Никотин, тиоцианит, бензопрен и другие компоненты табачного дыма легко проникают через плаценту, концентрация их у плода чаще всего выше, чем у матери, так как плод получает никотин и другие компоненты не только из крови матери, а легко всасывает их через кожу и ЖКТ из амниотической жидкости [10]. Как известно, степень токсической нагрузки на организм характеризует уровень молекул средней массы (МСМ) в сыворотке крови. Определение их содержания в крови новорожденных крысят показало, что у крысят всех опытных групп (кроме группы 4) достоверно повышена концентрация МСМ, по сравнению с уровнем у крысят контрольной группы (табл. 1), что свидетельствует о высокой степени токсической нагрузки. Известно, что все токсические соединения активируют в организме человека и животных продукцию реактивных форм кислорода и, вследствие этого, – процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Так как известен факт влияния продуктов ПОЛ на синтез коллагена и эластина, нам представлялось необходимым изучение содержания продуктов ПОЛ (малонового альдегида и диеновых конъюгатов) в сыворотке крови новорожденных крысят. Данные исследования приведены в таблице 1.

Как видно из полученных нами данных, у потомков крыс, подвергавшихся пассивному табакокурению, значительно повышено содержание продуктов ПОЛ, по сравнению с их уровнем у крысят контрольной группы. Отсутствуют изменения только у потомков группы «О», где «курили» только самцы, что, по-видимому, связа-

Таблица 1

Содержание молекул средней массы и продуктов ПОЛ в сыворотке крови новорожденных крысят – потомков «курящих» родителей

Группы Крысят	Молекулы средней массы (у.е)		Малоновый альдегид (мкмоль/л)		Диеновые конъюгаты (мкмоль/л)	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы
К, n=15	0,087±0,004	0,077±0,003	1,68±0,09	2,11±0,11	44,27±1,12	49,68±1,77
М, n=15	0,321±0,011 p<0,001	0,344±0,016 p<0,001	4,27±0,17 p<0,001	5,78±0,27 p<0,001	82,68±3,11 p<0,001	86,79± p<0,001
О, n=15	0,092±0,004 p>0,05	0,082±0,002 p>0,05	2,03±0,18 p>0,05	2,46±0,19 p>0,05	45,07±2,00 p>0,05	52,08±2,49 p>0,05
МО, n=15	0,389±0,019 p<0,001	0,411±0,025 p<0,001	4,79±0,22 p<0,001	6,34±0,28 p<0,001	88,32±3,22 p<0,001	94,48±3,64 p<0,001

Примечание. p – достоверность отличия показателя с контрольной группой

Таблица 2

Содержание коллагена и эластина в аорте новорожденных крысят в норме и при разных вариантах «табакокурения» родителей

Группы крысят	Коллаген (мг /г массы)		Эластин (мг /г массы)	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Контрольная	250,68±11,24	278,32±13,25	419,37±12,65	466,51±10,62
Группа № 2	241,34±16,21 P>0,05	266,45±18,02 p>0,05	352,22±14,33 p<0,05	369,78±13,44 p<0,05
Группа №3	255,37±13,07 p>0,05	260,41±10,71 p>0,05	359,82±10,07 p<0,05	484,66±20,31 p>0,05
Группа № 4	239,77±14,52 p>0,05	265,34±11,55 p>0,05	345,72±4,38 p<0,05	352,07±10,21 p<0,05

Примечание. p – достоверность отличия показателя с контрольной группой

Таблица 3

Содержание коллагена и эластина в бедренной артерии новорожденных крысят в норме и при «табакокурении» родителей

Группы крысят	Коллаген (мг /г массы)		Эластин (мг /г массы)	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы
К, n=15	117,48±11,22	130,45±14,45	295,39±12,21	316,65±10,77
М, n=15	106,71±10,12 p>0,05	115,56±16,28 p>0,05	215,11±11,02 p<0,02	221,08±12,42 p<0,02
О, n=15	119,34±15,08 p>0,05	138,22±17,11 p>0,05	265,47±15,52 p<0,05	337,70±25,07 p>0,05
МО, n=15	109,43±14,66 p>0,05	117,58±11,35 p>0,05	202,57±13,54 p<0,02	200,41±11,71 p<0,02

Примечание. p – достоверность отличия показателя с контрольной группой

но с отсутствием токсических компонентов табачного дыма в организме матери и, соответственно, плода. Однако, обращает на себя внимание факт, что все анализируемые показатели (содержание МСМ и продуктов ПОЛ) у потомков группы «О» все-таки имеют тенденцию к повышению, по сравнению с группой «К». Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что максимальное увеличение содержания продуктов ПОЛ отмечается у потомков обоего пола группы «МО»: концентрация малонового альдегида у самок увеличена в 2,9 раза, у самцов – в три раза, концентрация диеновых конъюгатов у потомков обоего пола повышена примерно в два раза. Более низкая степень повышения промежуточных продуктов ПОЛ (по сравнению с конечным продуктом МА), по-видимому, связана с высокой скоростью окисления. Конечно, активация процессов ПОЛ может быть вызвана стрессом при рождении и выявленная разница в изучаемых показателях объясняется разным уровнем стресс-стойкости. Однако степень повышения содержания продуктов ПОЛ соответствует степени изменений концентраций МСМ, т.е. величине токсической нагрузки на организм. В то же время и разная степень устойчивости к стрессу может формироваться под влиянием компонентов табачного дыма, действующих в процессе эмбриогенеза. Подтвержде-

нием этому является отсутствие достоверных изменений как в содержании МСМ, так и в концентрации продуктов ПОЛ у потомков обоего пола в группе № 3.

Как уже отмечалось, продукты ПОЛ влияют на синтез коллагена и эластина как непосредственно, так и через активацию синтеза провоспалительных цитокинов. Синтез коллагена и эластина регулируется матриксными металлопротеиназами (ММП), которые активируются под влиянием реактивных форм кислорода, гидроперекисей липидов, провоспалительных цитокинов [8]. ММП разрушают внутриклеточный матрикс, создавая менее эффективный коллаген и поврежденные молекулы эластина. Ранее проведенные нами исследования показали, что у новорожденных крысят – потомков «курящих» крыс увеличено содержание эндотелина-1, что приводит к повышению содержания (экспрессии гена) и активности индуцибельной NO-синтазы, ответственной за повышение содержания реактивных форм кислорода. Следовательно, ряд факторов может повлиять на эластичность сосудов крысят-потомков «курящих» родителей. Проведенные нами исследования показали, что в аорте и бедренной артерии крысят обоего пола при всех вариантах «табакокурения» их родителей снижено содержание эластина, по сравнению с его уров-

нем у крысят контрольной группы, за исключением потомков мужского пола группы 3 (табл. 2, 3).

Как видно из приведенных данных, у новорожденных крысят обоего пола всех опытных групп содержание коллагена соответствует его уровню в контрольной группе. Однако, соотношение коллаген/эластин увеличено (за счет снижения эластина) у крысят обоего пола всех опытных групп (кроме самцов группы № 3), что свидетельствует об увеличении жесткости сосудов у потомков при табакокурении родителей. Наиболее высокая степень изменений отмечается при «курении» обоих родителей (группа МО): соотношение коллаген/эластин у самок – $0,72 \pm 0,04$ против $0,60 \pm 0,03$ в контрольной группе, у самцов – $0,75 \pm 0,04$ против $0,59 \pm 0,02$. Такая же направленность изменений выявлена при изучении содержания коллагена и эластина в бедренной артерии новорожденных крысят (табл. 3).

Как видно из приведенных в таблице 3 данных, у новорожденных крысят – потомков «курящих» родителей достоверно снижено содержание эластина (кроме самцов группы О), по сравнению с контрольной группой, при содержании коллагена, соответствующем уровню в контрольной группе. Как видно из приведенных данных, наибольшая степень изменения эластичности сосудов (т.е. снижение концентрации эластина) отмечается у потомков женского пола при «курении» обоих родителей, наименьшая – при «курении» только самца (изменения выявлены только у потомков женского пола).

Данные нашего эксперимента показали, что «курение» родителей отражается только на синтезе эластина. Эластин – белок, похожий по строению с коллагеном. Общее для эластина и коллагена – большое содержание глицина и пролина. В эластине значительно больше валина и аланина и меньше глутаминовой кислоты и аргинина, чем в коллагене. В эластине большое количество аминокислотных остатков с неполярными боковыми группами, только в эластине есть десмозин и изодесмозин. По-видимому, снижение синтеза только эластина связано с дефицитом аминокислот, входящих в его состав. Известно, что токсические вещества табачного дыма влияют на способность плаценты пропускать питательные вещества в плод, никотин подавляет не только захват плацентарных аминокислот, но и их транспорт плоду (это происходит вследствие влияния на плацентарную холинэргическую систему) [11]. Можно предположить, что транспорт валина, аланина, аминокислот с неполярными боковыми группами нарушен в большей степени, чем других аминокислот, что, при увеличении экспрессии гена коллагена под влиянием регуляторных факторов, приводит к снижению синтеза эластина.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что компоненты табачного дыма, проникая через плаценту, оказывают токсическое действие на плод, о чем свидетельствует досто-

верное увеличение молекул средней массы в сыворотке крови новорожденных крысят. Следствием эндогенной интоксикации является активация ПОЛ (повышение ТБК-активных продуктов в сыворотке крови новорожденных крысят). В результате активации ПОЛ снижается синтез эластина и повышается коэффициент коллаген/эластин как в бедренной артерии, так и в аорте новорожденных крысят. Следует отметить, что изменения в большей степени выражены при пассивном табакокурении обоих крыс-родителей. В аорте снижение синтеза эластина более выражено у самок, в бедренной артерии – у самцов. Выявленные нами нарушения в соотношении коллаген/эластин свидетельствуют о повышении жесткости сосудов у новорожденных крысят-потомков «курильщиков», по сравнению с крысятами опытной группы. Полученные нами данные согласуются с литературными сведениями об исследованиях голландских врачей, обнаруживших при проведении УЗИ у 5-летних детей, матери которых курили во время беременности, утолщение и повышение жесткости сонных артерий.

Выводы

1. Пассивное «табакокурение» крыс приводит к увеличению содержания молекул средней массы, продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови новорожденных потомков, что свидетельствует о высокой токсической нагрузке во внутриутробном периоде.

2. Пассивное «табакокурение» крыс-родителей приводит к снижению содержания эластина как в аорте, так и в бедренной артерии потомков, что может стать причиной повышенной жесткости сосудов, особенно в случае «курения» обоих родителей.

Перспективы дальнейших исследований.

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о том, что эластичность сосудов у потомков крыс-«курильщиков» может быть значительно уменьшена из-за значительного снижения синтеза эластина. Однако, нами проведено исследование на новорожденных крысятах, в дальнейшем онтогенезе могут включиться регуляторные механизмы, существенным образом влияющие на биосинтезы. Поэтому представляется необходимым провести аналогичные исследования на взрослых (3-месячных) и старых крысах – потомках курильщиков.

Литература

1. Беляев С.Г. Антенатальная охрана плода в условиях табакокурения супружеской пары: в помощь практическому врачу / С.Г. Беляев // Укр. мед. альманах. – 2009. – Т. 12, № 2. – С. 34-36.
2. Габрилян Н.И. Определение средних молекул скрининг-методом / Спектрофотометрическое определение содержания ГПЛ в плазме крови / Б.В. Гаврилов, М.Н. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-36.
3. Замарева Т.В. Метод определения коллагеновых белков по оксипролину. В кн.: Современные в биохимии / Под ред. академ. АМН СССР В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 262-264.

4. Зербино Д.Д. Системная патология сосудов в молодом возрасте: новая этиологическая теория – ксенобиотики как основной стимул поражения сосудов / Д.Д. Зербино // Укр. кардиол. ж. – 2008. – № 8. – С. 27-32.
5. Кочкина М.С. Измерение жесткости артерий и ее клиническое значение / М.С. Кочкина, Д.А. Затецгулов, Б.А. Сидоренко // Кардиология. – 2005. – № 1. – С. 63-71.
6. Морман Д. Физиология сердечно-сосудистой системы / Пер. с англ., под ред. Р.В. Болдырева / Д. Морман, Л. Хеллер. – СПб.: Питер, 2000. – 350 с.
7. Неинвазивная диагностика нарушения эластических свойств артериальных сосудов / О.А. Миронова, И.Ф. Берестень, О.Р. Пестовская, Е.Я. Богданова // Электронный журнал ANGIOLOGIA.ru. – № 1, 2011.
8. Федорова Т.К. Реакция с ТБК для определения МДА крови методом флюориметрии / Т.К. Федорова, Т.С. Коршунова, Э.Г. Ларская // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 25-28.
9. Хоценко А.А. Влияние табакокурения матерей на функциональное состояние эндотелия у детей / А.А. Хоценко // Медицина сьогодні і завтра. – 2008. – № 4. – С. 99-101
10. Heal S. Smoking during pregnancy may damage children's blood vessels / S. Heal // Pregnancy. – 2011. – Vol. 2. – P. 65-72.
11. Susan J. Ziemann. Mechanisms, Pathophysiology and Therapy of Arterial stiffness / Susan J. Ziemann, Vajtech Melenovsky, A. David // Arteriosclerosis, Thrombosis, and vascular Biology. – 2005. – Vol. 25. – P. 932-943.

РІВЕНЬ ІНТОКСИКАЦІЇ ОРГАНІЗМУ ТА ЕЛАСТИЧНІСТЬ СУДИН НОВОНАРОДЖЕНИХ ЩУРЯТ – НАЩАДКІВ ЩУРІВ, ЯКІ ПІДЛЯГАЛИ ДІЇ ТЮТЮНОВОГО ДИМУ

Т.В. Горбач, В.Ю. Юнусов, С.М. Мартинова

Резюме. У роботі вивчено вплив різних варіантів пасивного «тютюнокуріння» щурів-батьків на показники перекисного окиснювання ліпідів у сироватці крові і вміст колагену й еластину в судинах. Установлено, що при «тютюнокурінні» батьків зростає концентрація ТБК-активних продуктів і молекул середньої маси в сироватці крові немовлят щурів, що свідчить про токсичну дію компонентів тютюнового диму на плід. Виявлено значне зниження еластину й збільшення коефіцієнта колаген/еластин в аорті й стегновій артерії щурят, найбільш виражені зміни відзначаються у випадку «тютюнокуріння» обох батьків.

Ключові слова: щури, «тютюнокуріння», судини, еластин, колаген, перекисне окиснення ліпідів.

ORGANISM'S INTOXICATION RATE AND ELASTICITY OF VESSELS IN NEWBORN RATS – OFFSPRINGS OF THE RATS, WHICH WERE EXPOSED TO THE ACTION OF TOBACCO SMOKE

T.V. Gorbach, V.Yu. Yunusov, S.N. Martynova

Abstract. The influence of passive tobacco smoking various variants by rats-parents on indices of lipid peroxidation in blood serum and content of collagen and elastin in vessels was studied. It was established that passive tobacco smoking of rats-parents led to elevation of TBA-active products and middle weight molecules in blood serum of newborn rats. It indicated the toxic action of tobacco smoke components on the fetus. The significant decrease in elastin amount and increase of collagen/elastin ratio in aorta and femoral artery of newborn rats were observed. The most noticeable changes were found in cases when both parents were „tobacco smokers”.

Key words: rats, tobacco smoking, blood vessels, elastin, collagen, lipid peroxidation.

National Medical University (Kharkiv)

Рецензент – доц. Н.П. Григор'єва

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 4 (72). – P. 20-24

Надійшла до редакції 25.07.2014 року