



УДК 577.152.27:591.41:591.39:613.842

ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ – ПОТОМКОВ «КУРЯЩИХ» РОДИТЕЛЕЙ

Т.В. ГОРБАЧ
Г.И. ГУБИНА-ВАКУЛИК
В.Ю. ЮНУСОВ

*Харьковский национальный
медицинский университет,
Украина*

e-mail : V-gorbach@yandex.ru

В экспериментах на крысах линии Вистар изучено влияние пассивного табакокурения родителей на показатели функции эндотелия новорожденных крысят. Установлено, что «курение» приводит к развитию эндотелиальной дисфункции в аорте и бедренной артерии, степень нарушений наиболее выражена в случае «табакокурения» обоих родителей, наименее выражена при «табакокурении» только самца. Степень эндотелиальной дисфункции в аорте выше у потомков-самок, а в бедренной артерии у потомков-самцов.

Ключевые слова: крысы, пассивное табакокурение, сосуды, эндотелий, эндотелин, оксид азота.

Курение – одна из самых распространенных вредных привычек среди молодых людей. Практически во всех странах мира имеет место выраженный рост числа курящих, особенно среди молодежи. Несмотря на общеизвестный вред, который сигареты наносят будущему ребенку, процент курящих только увеличивается [1]. Процент курящих женщин, которые полностью бросают курить во время беременности довольно мал – 20-23%. Примерно столько же уменьшает суточное количество выкуренных сигарет при беременности [2]. В США, например, курят не менее 1/3 всех женщин в возрасте старше 15 лет, 52-55% курящих до беременности продолжают курить во время беременности. В Великобритании 43% беременных курят. В Украине 48% женщин курят на протяжении всей беременности [1]. Поэтому изучение влияния табакокурения на плод – актуальный вопрос. В настоящее время, благодаря трудам многих ученых, выяснено, что токсические компоненты табачного дыма проходят через плаценту, концентрация их в организме плода выше, чем у матери, т.к. плод получает их не только из крови матери, но и заглатывает с амниотической жидкостью [3]. Установлено, что мишенью для токсических компонентов табачного дыма, в первую очередь, являются легкие, сердце, сосуды. Доказано, что при табакокурении беременных отмечается уменьшение роста и веса плода, что связано с многочисленными нарушениями функций плаценты. Ребенок у курящих женщин может родиться с дефектом сердца или головного мозга из-за постоянного внутриутробного кислородного голодания [4, 5]. Смертность детей от курящих беременных на 20% выше, чаще отмечается отставание в умственном и физическом развитии [6]. Имеются данные о том, что курение во время беременности отрицательно влияет на периферическое кровообращение у женщин и способствует уменьшению респираторных движений у плода [6]. В научной литературе практически нет сведений о влиянии курения родителей на сосуды плода.

Целью нашей работы явилась оценка функционального состояния эндотелия на основе анализа содержания вазоконстрикторных (эндотелина) и вазодилататорных (стабильные метаболиты NO) соединений в сыворотке крови и сосудах новорожденных крысят – потомков крыс при моделировании табакокурения.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на крысах линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария. Крысы разделены на 4 группы: 1) контрольная; 2) «курили» только самки; 3) «курили» только самцы; 4) «курили» самцы и самки. Моделирование табакокурения осуществлялось путем помещения крыс в специально сконструированные камеры, достаточные по объему для свободного перемещения, в которые распределялся табачный дым от сигарет «Прилуки», т.е. осуществлялось пассивное табакокурение. Животных выдерживали в камере на протяжении 15 минут ежедневно. Самки подвергались воздействию табачного дыма 1 месяц до беременности и на протяжении всей беременности, самцы – 1 месяц до спаривания. Животные контрольной группы такого же возраста помещались в камеры аналогичных размеров (но без табачного дыма) на такое же время. Новорожденные крысята выводились из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Осуществлялся забор крови, выделялись аорта и фрагмент бедренной артерии. Содержание животных и манипуляции с ними проводили в соответствии с положениями Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Сосуды после извлечения перфузировали охлажденным физиологическим раствором, замораживали в жидком азоте, измельчали до порошкообразного состояния, гомогенизировали во 2М трис-СН1 буфере (рН 7,4) на холоду. В сыворотке крови и сосудах определяли содержание эндотелина-1 иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов фирмы



DRG (Германия) и S- нитрозотиолов (стабильных метаболитов NO) спектрофлуориметрическим методом [7]. В сосудах определяли активность эндотелиальной и индуцибельной NO-синтаз спектрофотометрическим методом [7]. Полученные результаты обработаны общепринятыми методами вариационной статистики (по критерию t Стьюдента) с использованием программного обеспечения «Windows Wista», электронных таблиц Exel [8].

Результаты и обсуждение. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в сыворотке крови у всех потомков от «курящих» родителей значительно увеличивается содержание эндотелина-1 (табл.1), максимальные изменения отмечаются – при «курении» обоих родителей (группа №4), где содержание эндотелина в среднем увеличивается в 2,8 раза; минимальные изменения в случае «курения» только самцов.

Таблица 1

Содержание эндотелина и S-нитрозотиолов (S-NO) в сыворотке крови новорожденных крысят-потомков «курящих» крыс

Группы животных	Эндотелин-1, пкг/мл	S-NO, мкмоль/л	Эндотелин/-NO
Контрольная, n=15	2,31±0,14	0,45±0,02	5,13±0,28
Группа № 2, n=15	4,56±0,21 p<0,01	0,27±0,02 p<0,01	16,88±1,13 p<0,001
Группа № 3, n=15	3,74±0,14 p<0,02	0,39±0,03 P>0,05	9,58±0,71 p<0,01
Группа № 4, n=15	5,84±0,32 p<0,001	0,16±0,01 p<0,001	36,5±2,64 p<0,001

Аналогичный характер изменений отмечается и в содержании S- нитрозотионов: максимальные изменения (снижение в 1,5 раза) выявлено у потомков от обоих «курящих» родителей (группа №4), в случае «курения» только самцов (группа №3) содержание S-NO практически не отличается от уровня у потомков от животных контрольной группы (табл.1). Однако, соотношение эндотелин/S-NO увеличено у потомков всех «курящих» групп животных, по сравнению с потомками крыс контрольной группы, что свидетельствует о наличии эндотельальной дисфункции у новорожденных крысят при всех вариантах «табакокурения» родителей. Результаты изучения содержания эндотелина-1 в сосудах новорожденных крысят представлены в таблице2.

Таблица 2

Содержание эндотелина – 1 в сосудах новорожденных крысят (в нг/г ткани)

Группы крыс	Аорта		Бедренная артерия	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Контрольная, n=15	64,11±2,16	52,13±3,24	28,17±1,22	20,69±1,42
Группа №2, n=15	84,28±7,42 p<0,001	63,52±1,05 p<0,02	42,12±1,62 p<0,01	38,14±2,05 p<0,001
Группа №3, n=15	70,69±2,14 p<0,05	55,26±2,84 p>0,05	26,52±1,33 p>0,05	21,13±1,00 p>0,05
Группа №4, n=15	104,28±3,00 p<0,001	68,39±3,11 p<0,01	49,21±1,78 p<0,001	41,16±2,68 p<0,001

Как видно из приведенных в таблице данных, в аорте максимальные изменения в содержании эндотелина у потомков обоих полов происходит в группе №4 («курение» обоих родителей), у самок – увеличение в 1,6 раза, у самцов – в 1,2 раза. Минимальные изменения изучаемого показателя отмечаются у крысят-потомков «курящих» самцов – концентрация такая же как в контрольной группе. Аналогичная направленность изменений установлена в бедренной артерии, однако, в этом сосуде у потомков обоих полов животных группы №3 изменений в содержании эндотелина не выявлено.

Анализ содержания S-нитрозотиолов в сосудах новорожденных крысят показал, что в аорте у потомков женского пола изменения разнонаправленны: у потомков группы №2 достоверных изменений (по сравнению с контрольной группой) не выявлено; группы №3 – достоверно увеличено, группы №4 – достоверно снижено). Расчет соотношений эндотелин /S-NO в аорте у потомков женского пола показал, что в контрольной группе оно равно 7,34±0,42; в группе №2 – 9,11±0,51; в группе №3 -6,07±0,64; в группе №4 -14,28±1,02; достоверные отличия, по сравнению с контрольной группой, выявлены только у крысят групп №2 и 4. Следовательно, эндотелиальная дисфункция в аорте (с доминированием вазоконстрикторного эффекта) имеет место у потомков-самок группы №2 и группы №4 и отсутствует в группе №3 . Максимальные нарушения функции эндотелия аорты у новорожденных крысят отмечаются в случае «курения» обоих родителей.

В бедренной артерии новорожденных крысят женского пола при всех вариантах «табакокурения» родителей достоверно снижено содержание Sнитрозотиолов, максимальное изменение показателя выражено в группе №4 (снижение в 1,6 раза) (табл.3).



Таблица 3

Содержание S-нитрозотиолов (в мкмоль/г ткани) в сосудах новорожденных крысят

Группы крыс	Аорта		Бедренная артерия	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Контрольная, n=15	8,74±0,42	11,22±1,00	5,34±0,37	6,84±0,45
Группа №2, n=15	9,25±0,63 p>0,05	20,63±1,78 p<0,0001	4,02±0,77 p<0,01	7,11±0,51 p>0,05
Группа №3, n=15	11,65±1,0 P<0,001	11,55±0,79 p>0,05	4,25±0,24 p>0,01	8,25±0,23 p<0,01
Группа №4, n=15	7,34±0,32 p<0,05	9,35±0,44 p<0,05	3,41±0,22 p<0,02	5,00±0,27 p<0,01

Расчет коэффициента эндотелин/S-NO показал, что в бедренной артерии самок контрольной группы коэффициент равен 5,28±0,31; группы №2 -10,48±1,00; группы №3 -6,24±0,37; группы №4 -14,43±1,08; достоверные отличия имеют место у крысят групп № 2 и 4. Очевидно, что эндотелиальная дисфункция имеет место у потомков-самок в случае, «табакокурения» только крыс-матерей и обоих родителей, степень нарушений максимальной в случае «курения» обоих родителей.

В аорте у потомков-самцов максимальные изменения в содержании S- нитрозотиолов обнаружено в группе №2 («курение» только самки) – увеличение в 1,8 раза; у потомков группы №4 достоверно снижено, а в группе №3 – не отличается от контрольной группы (табл.3). Содержание эндотелина-1 у потомков мужского пола достоверно увеличено при «курении» только самок-матерей и обоих родителей (табл. 2). Коэффициент эндотелин/S-NO в аорте потомков-самцов контрольной группы -4,65±0,38; группы №2 -3,08±0,24; группы №3 -5,23±0,47; группы №4 -7,12, достоверные отличия в группах № 2 и 4. Очевидно, эндотелиальная дисфункция имеет место только в аорте потомков группы №4. Следует отметить, что у потомков-самцов (в отличие от самок) (в группе №2 «курят» только самки-матери) отмечается преобладание вазодилаторных соединений.

В бедренной артерии новорожденных крысят-самцов выявлен разнонаправленный характер изменений в содержании S-NO: в группе №2 – не отличается от контрольной группы; в группе №3 – достоверно повышено; в группе №4 – достоверно снижено (табл. № 3). Содержание эндотелина -1 достоверно увеличено у потомков-самцов групп №2 и №4 (табл.2). Анализ соотношений эндотелин/S-NO показал, что у потомков самцов контрольной группы в бедренной артерии оно равно 3,02±0,24; в группе №2 – 5,06±0,39; в группе №3 -2,56±0,22; в группе №4 – 11,41±1,00; достоверные отличия коэффициента от его величины в контрольной группе выявлены у потомков групп № 2 и 4. Очевидно, что максимально выражена дисфункция эндотелия у потомков-самцов в случае «табакокурения» обоих родителей. Следует отметить преобладание вазодилаторных компонентов в бедренной артерии потомков-самцов группы №3, т.е. «табакокурение» только самцов.

Как видно из полученных результатов, как в бедренной артерии, так и в аорте потомков обоих полов максимальные изменения в функциональном состоянии эндотелия (дисфункции) выявлено в случае «курения» обоих родителей. Следует отметить, что при «курении» только самцов у потомков-самок отмечаются минимальные изменения в функциональном состоянии эндотелия, а у потомков-самцов нарушения практически отсутствуют.

Известно, что содержание NO, а следовательно и S-NO, определяется активностью NO-синтаз (индуцибельной и эндотелиальной). Поэтому для нас представляло интерес изучение активности этих ферментов в сосудах экспериментальных крыс. Проведенные исследования показали, что в аорте новорожденных крысят-самок активность эндотелиальной NO-синтазы снижена у потомков группы №2 и группы №4 (табл.4) и соответствует уровню контрольной группы у потомков группы №3.

Таблица 4

Активность эндотелиальной NO – синтазы в сосудах новорожденных крысят (нмоль/г белка)

Группы крыс	Аорта		Бедренная артерия	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Контрольная, n=15	105,64±6,11	120,45±9,83	83,16±6,24	92,87±6,13
Группа №2, n=15	90,25±3,14 p<0,01	166,34±7,45 p<0,001	69,44±2,03 p<0,01	105,48±5,49 p<0,05
Группа №3, n=15	100,34±5,42 p>0,05	115,23±4,48 p>0,05	79,05±3,24p>0,05	115,38±3,11 p<0,02
Группа №4, n=15	91,68±7,25 p<0,05	102,12±8,14 p<0,02	65,28±3,61p<0,001	78,45±6,24 p<0,02

Иной характер изменений индуцибельной NO-синтазы у новорожденных крысят женского пола: в группе №2 и особенно у группы №3 – увеличивается, в группе №4 – соответствует контрольной группе потомков (табл.5).



Таблица 5

Активность индуцибельной NO-синтазы в сосудах новорожденных крысят (нмоль/г белка)

Группы крыс	Аорта		Бедренная артерия	
	Самки	Самцы	САмки	Самцы
Контрольная, n=15	28,44±1,22	16,28±1,34	10,65±1,00	6,32±0,31
Группа №2, n=15	33,81±1,59 p<0,02	15,83±1,02 p>0,05	8,44±0,67 p<0,02	6,12±0,57 p>0,05
Группа №3, n=15	40,34±2,05 p<0,01	16,77±1,07 p>0,05	15,59±0,93 p<0,01	7,82±0,84 p<0,05
Группа №4, n=15	29,31±1,08 p>0,05	17,05±1,39 p>0,05	12,83±1,11 p<0,05	7,48±0,42 p<0,05

У потомков-самцов в аорте активность эндотелиальной NO-синтазы снижена при «табакокурении» обоих родителей, повышена – в случае «курения» только самок, соответствует контрольной группе при «курении» только самцов. Активность индуцибельной NO-синтазы в аорте у потомков-самцов всех опытных групп соответствует уровню в контрольной группе (табл.4).

В бедренной артерии потомков – самок активность эндотелиальной NO-синтазы в случае «курения» только самок и обоих родителей достоверно снижена, при «табакокурении» только самцов – соответствует уровню в контрольной группе (табл.4). Активность индуцибельной NO-синтазы в бедренной артерии потомков-самок достоверно повышена в случае «курения» только самцов и обоих родителей, снижена -в случае «курения» только самок (табл.5).

У потомков-самцов в бедренной артерии активность эндотелиальной NO-синтазы повышена в случае табакокурения только самок и только самцов и снижена при табакокурении обоих родителей. Активность индуцибельной NO-синтазы в бедренной артерии потомков-самцов повышена в случае «курения» только самцов и обоих родителей, при «курении» только самок активность фермента соответствует уровню в контрольной группе.

Данные проведенных нами экспериментальных исследований показали, что пассивное табакокурение животных-родителей приводит к изменению соотношений вазоконстрикторных и вазодилататорных факторов, т.е. к развитию эндотелиальной дисфункции как в аорте, так и в бедренной артерии потомков. В аорте у потомков обоего пола максимальные проявления дисфункции отмечаются при «табакокурении» обоих родителей, у потомков –самок также существенные нарушения функции эндотелия имеют место в группе №2 (пассивное «курение» только самок-матерей). Следует отметить, что повышение содержания эндотелина-1 в аорте обнаружено как у потомков-самцов так и у потомков-самок всех групп, однако у потомков группы №3 коэффициент эндотелин/S-NO практически не отличается от уровня контрольной группы за счет адекватного увеличения концентрации нитрозотиолов, у потомков же группы №2 и группы №4 степень изменений в содержании S-нитрозотиолов ниже, чем эндотелина (хотя направленность изменений одинакова). Следует отметить, что в аорте потомков-самок всех опытных групп уровень S-NO обеспечивается за счет активации индуцибельной NO-синтазы при заметном снижении активности эндотелиальной NO-синтазы. У потомков-самцов всех опытных групп активность индуцибельной NO-синтазы соответствует уровню в контрольной группе, концентрация NO поддерживается, в основном, за счет изменений эндотелиальной NO-синтазы, что свидетельствует о менее выраженном повреждении эндотелия аорты. В бедренной артерии потомков обоих полов всех опытных групп содержание S-NO обеспечивается за счет активации индуцибельной NO-синтазы, максимальные изменения в соотношении эндотелин/S-NO у потомков обоих полов отмечается при «табакокурении» обоих родителей (группа №4). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, о том, что степень нарушения функции эндотелия в бедренной артерии выше у потомков-самцов, в аорте – у потомков-самок. Проведенные нами эксперименты выявили нарушение функции эндотелия у новорожденных крысят-потомков «курящих» родителей. Представляется интересным изучение функционального состояния эндотелия и сократительной способности сосудов в дальнейшем, т.е. в процессе онтогенеза. Проведение такого исследования, возможно, позволит установить связь «табакокурения» родителей с развитием вегетососудистой дистонии по гипертоническому или гипотоническому типу, гипертонической болезни, атеросклероза и других сосудистых заболеваний у потомков и признать табакокурение родителей риск – фактором сосудистых заболеваний у потомков.

Выводы:

1. Моделирование табакокурения крыс-родителей приводит к развитию эндотелиальной дисфункции у новорожденных потомков, наиболее выражены изменения в состоянии эндотелия у потомков обоих полов в случае «табакокурения» обоих родителей.
2. Степень эндотелиальной дисфункции в аорте выше у потомков женского пола, а в бедренной артерии – у потомков мужского пола в случае «табакокурения» обоих родителей.



3. Наименьшая степень нарушения функции эндотелия у потомков обоих полов имеет место при пассивном табакокурении только самцов (отцов).

Литература

1. Левченко Л.А. Курение при беременности // Неонатология.-2009.- №3.- С. 18 – 22.
2. Коханевич Е.В. Актуальные вопросы акушерства, гинекологии и репродуктологии.- М. Триада.- Харьков, 2006.- 480 с.
3. Гуменюк Е.Г. Физиология беременности / Е.Г.Гуменюк, О.К.Погодин, Т.А.Власова // Петрозаводск:ООО «Интел Тек», 2004.- 170 с.
4. Основы перинатологии/ под ред. Шабалова Н.П., Цвелева Ю.В.. 3-е изд.- М.: МЕДпресс-информ, 2004.-640 с.
5. Милованов А.П. Внутриутробное развитие человека/ А.П.Милованов, С.В.Савельев.-М.: МДВ, 2006.- 384 с.
6. Акушерство / под ред. Айламазяна Э.К., Кулакова В.И., Радунского В.Е.,Савеловой Г.М. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.- 1200 с.
7. Ковалева О.М. Диагностика эндотелиальной функции-оценка вазоактивного пула оксида азота / Ковалева О.М., Т.В.Горбач, Г.В.Демиденко.- К., 2009.- 19 с.
8. Насядедов А.Д. SPSS-15: профессиональный статистический анализ данных. СПб:Питер, 2008.- 116 с.

INDICES OF ENDOTHELIAL FUNCTION IN NEWBORN RATS OF «SMOKING» PARENTS

T.V.GORBATCH
G.I.GUBINA-VACULIK
W.Y. YUNUSOV

*Kharkov National
State University*

*e-mail:
V-gorbach@yandex.ru*

The influence of passive «smoking» of parents on the indices of endothelial function in newborn rats was studied in the experiment. It was established that «smoking» led to the development of endothelial dysfunction in aorta and femoral artery. The stage of impairment was the highest in case of both parents «smoking». The most insignificant changes were observed in «smoking» of only male parent. The stage of endothelial dysfunction in the aorta was higher in female offspring and in femoral artery was higher in male offspring.

Keywords: rat passive smoking, blood vessels, endothelial, endothelin, nitric oxide.