

Кравцова Н.В.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ОКСИДА АЗОТА И ЦИТОКИНОВ В СИСТЕМЕ МАТЬ-ПЛАЦЕНТА-ПЛОД В УСЛОВИЯХ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

N. V. Kravtsova

DYNAMIC CHANGES OF NITRIC OXIDE AND CYTOKINE IN THE MOTHER-PLACENTA-FETUS IN PERINATAL HYPOXIA

УДК: 618.33

Степень нарушения метаболических процессов в плаценте является важным показателем перинатального риска. Статья рассматривает динамику изменений оксида азота и цитокинов в системе мать-плацента-плод в условиях перинатальной гипоксии.

The degree of disruption of metabolic processes in the placenta is an important indicator of perinatal risk. The article examines the dynamics of changes of nitric oxide and cytokines in the maternal-placenta-fetus in perinatal hypoxia.

Степень нарушения метаболических процессов в плаценте является важным показателем перинатального риска [1, 2]. Длительные расстройства децидуальной перфузии, нарушение плацентации и плодового сосудистого кровообращения играют основную роль в развитии фетоплацентарной недостаточности и, как следствие, пренатальной (внутриутробной) гипоксии плода. Характер структурного формирования фетоплацентарной системы определяет ее функциональное состояние, которое во многом зависит от интенсивности метаболических процессов, обеспечивающих оптимальный синтез биологически активных веществ. Прежде всего речь идет об оксиде азота (NO), установление важной роли которого позволило по-новому подойти к пониманию молекулярных механизмов регуляции ряда биохимических процессов в клетке [3]. Многие авторы отмечают влияние оксида азота при синдроме задержки роста плода (СЗРП) в результате плацентарной недостаточности и внутриутробной гипоксии [4, 5]. Получены результаты об относительно высоком содержании метаболитов NO в плодных оболочках. Учитывая многочисленные эффекты этой молекулы на биохимические и физиологические процессы в клетках, Круикер и соавторы [6] изучили интенсивность продукции NO плодными оболочками при слабости родовой деятельности и сопоставили ее с уровнем интерлейкинов. Эти исследования показали высокий уровень корреляции между интерлейкином-1(ИЛ-1), интерлейкином-6 (ИЛ-6) и NO. Выявленная закономерность позволяет высказать предположение о возможности участия NO плодных оболочек в регуляции уровня компонентов цитокиновой системы [7]. Эти данные подтверждают роль оксида азота в качестве, по крайней мере, одной из сигнальных молекул,

ответственных за регуляцию выработки интерлейкинов. Поэтому нам представлялось интересным изучить динамику изменений уровня оксида азота и продукции цитокинов при беременности в условиях пренатальной гипоксии плода.

Цель исследования: Определить характер и последовательность изменений уровня оксида азота, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в системе мать-плацента-плод в условиях пренатальной гипоксии.

Материалы и методы: Для изучения характера и последовательности изменений уровня NO и его возможного влияния на продукцию провоспалительных (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α) и противовоспалительных (ИЛ-4, ИФР-1) в системе мать-плацента-плод при беременности, осложненной пренатальной гипоксией различной степени тяжести была исследована сыворотка крови беременных в III триместре, плаценты рожениц и пуповинная кровь новорожденных. Клинический материал был разделен на две группы: I группа (контроль) – с физиологически протекавшей беременностью (30); II группа (основная) – беременные с осложненным внутриутробной гипоксией плода течением беременности (90).

Диагноз антенатальной гипоксии устанавливали согласно данным кардиотокограммы плода, доплерографического исследования и подтверждали путем исследования содержания карбоксигемоглобина в крови беременной и показателей кислотно-основного состояния крови. В контрольной группе показатель состояния плода (ПСП) < 1,0 ($0,84 \pm 0,05$). Во II группе согласно данным показателя состояния плода (ПСП) по кардиотокограмме (КТГ) наблюдалась различная степень тяжести внутриутробной гипоксии: 1) легкая гипоксия (30) ПСП от 1,01 до 2,0 ($1,4 \pm 0,16$); 2) гипоксия средней степени тяжести (30) ПСП от 2,01 до 3,0 ($2,35 \pm 0,15$); 3) гипоксия тяжелой степени (30) ПСП > 3,01 ($3,2 \pm 0,07$).

Эндогенный уровень оксида азота (II) определяли спектрофотометрически по методу Пуховской С.Г. и соавторов (2005) [8]. Методика основана на определении избытка кислорода после его взаимодействия с NO. Для определения кислорода использовали щелочные растворы

диоксида тиомочевинны (ДОТМ), так как их разложение в аэробных условиях сопровождается образованием дитионита, концентрация которого пропорциональна концентрации кислорода в растворе. Оптическую плотность образующегося дитионита измеряют при 315 нм.

Определение лактоферрина (ЛФ), инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), интерлейкина-1 (ИЛ-1), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-6 (ИЛ-6), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) проводилось иммуноферментным методом с использованием готовых наборов реактивов фирмы «Вектор-Бест» (Россия). Обсчет результатов исследования проведен на диагностической системе «Anthos-2010» (Австрия), с компьютерным обеспечением.

Результаты исследования: В результате проведенного обследования было выявлено достоверное ($p < 0,05-0,001$) повышение показателей оксида азота в изучаемых средах от пациенток с осложненной гипоксией плода течением беременности по сравнению с данными контрольной группы.

При исследовании уровня NO в сыворотке крови беременных отмечалось нарастание данного показателя по мере усугубления степени гипоксии. Так при внутриутробной гипоксии легкой степени отмечалось достоверное повышение оксида азота на 20,6%, при гипоксии средней степени – на 42,1%, а при тяжелой гипоксии – на 92,5% относительно данных, полученных при физиологической беременности ($p < 0,01-0,001$).

Аналогичная тенденция отмечается и в плаценте. Для изучения характера изменений уровня NO в системе мать-плацента-плод было проведено исследование экстрактов ткани плаценты (часть, предлежащая к хориальной пластине, и часть, предлежащая к базальной децидуальной пластине) от рожениц с неосложненным и осложненным внутриутробной гипоксией плода течением беременности.

Исследования уровня NO в материнской (часть плаценты предлежащая к эндометрию) и плодовой частях плаценты (часть предлежащая к хориону) показало равномерное повышение его содержания по мере нарастания степени тяжести внутриутробной гипоксии ($p < 0,01-0,001$). Причем содержание NO в плодовой части плаценты контрольной группы было несколько выше (5,3%), чем в материнской части. При гипоксии легкой и средней степени содержание NO в обеих частях плаценты повышалось примерно одинаково, относительно показателей контрольных групп, а в условиях тяжелой гипоксии отмечалось повышение NO в материнской и плодовых частях на 66% и 79,6% соответственно, причем в части прилежащей

к хориону уровень NO был выше на 13,9%, чем части прилежащей к эндометрию.

При исследовании уровня NO в пуповинной крови отмечалось повышение данного показателя по мере усугубления степени пренатальной гипоксии. При гипоксии легкой степени отмечалась тенденция к увеличению уровня оксида азота на 16,2%. Достоверное повышение было выявлено при гипоксии средней степени – на 63%, а при тяжелой гипоксии уровень NO возрастал более чем в 2 раза относительно данных, полученных при физиологической беременности ($p < 0,01-0,001$). В результате проведенного исследования была выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем оксида азота и карбокси-гемоглобина ($r = 0,65$; $p < 0,05$), то есть степенью гипоксии.

Для исследования влияния пренатальной гипоксии на характер изменений иммунологического статуса беременной было проведено определение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови беременных.

Полученные результаты свидетельствуют о существенном повышении секреции провоспалительного цитокина ФНО- α по мере нарастания внутриутробной гипоксии плода. Так при гипоксии тяжелой степени уровень ФНО- α был в 7 раз выше показателей контрольной группы. Также повышением на усиление гипоксического фактора отвечал провоспалительный цитокин ИЛ-1 β . Его максимальная концентрация в сыворотке крови беременных также отмечалась при тяжелой гипоксии плода и была на 82,3% выше показателей при физиологической беременности ($p < 0,05$).

Количество противовоспалительного цитокина ИЛ-4 и ИФР-1, напротив снижается при внутриутробной гипоксии, но по мере нарастания степени тяжести патологии меняется не так резко. Минимальные значения ИЛ-4 и ИФР-1 (на 62,6% и 53,7% соответственно ниже контроля) отмечены при тяжелой гипоксии. Характер динамики ИЛ-6 отличался от других цитокинов, так как показывал снижение уровня на 40% при легкой степени гипоксии. При дальнейшем нарастании тяжести пренатального состояния плода уровень ИЛ-6 начинал повышаться, и при тяжелой гипоксии был всего на 9,2% выше показателей контрольной группы.

Динамика изменений цитокинов при гипоксии различной степени тяжести сохранялась и в плаценте. Уровни всех исследованных цитокинов были выше в части плаценты предлежащей к хориальной пластине. Данное соотношение сохранялось и в условиях пренатальной гипоксии различной степени тяжести. При рассмотрении динамики изменений изучаемых показателей

следует отметить, что уровни ФНО- α и ИЛ-1 β увеличивались по мере нарастания гипоксии с максимальным повышением при тяжелой степени патологии более чем в 2-3 раза относительно контрольной группы ($p < 0,001$). Причем уровень ФНО- α сильнее увеличивался в части плаценты предлежащей к эндометрию (в 3,9 раза против 2,6 в части предлежащей к хориальной пластине), а ИЛ-1 β повышался более равномерно (в 2,9 раза в части предлежащей к эндометрию и в 3,0 раза в части плаценты предлежащей к хориальной пластине).

Показатели ИЛ-4 и ИФР-1 снижались в группах исследования с пренатальной гипоксией. Максимальная степень изменений также наблюдалась при тяжелой степени пренатальной гипоксии, где происходило снижение уровней ИЛ-4 и ИФР-1 на 51,9% и 48,1% соответственно в части плаценты предлежащей к эндометрию и на 52,6% и 59% в части плаценты предлежащей к хориону относительно данных контрольной группы ($p < 0,001$).

Количество ИЛ-6 изменялось неравномерно. Так при легкой степени гипоксии уровень ИЛ-6 снижался в и в «материнской» и в «плодовой» частях плаценты на 20% и 27,6% соответственно относительно данных контрольной группы. Затем отмечалось постепенное повышение по мере нарастания гипоксии в обеих частях плаценты. И при тяжелой степени пренатальной гипоксии уровень ИЛ-6 был выше показателей контрольной группы на 68,5% в части плаценты предлежащей к эндометрию и на 72,4% в части плаценты предлежащей к хориальной пластине.

Для выявления возможных взаимосвязей в продукции различных цитокинов нами был проведен корреляционный анализ изученных показателей. Установлена прямая корреляционная зависимость между содержанием ФНО- α и ИЛ-1 β в сыворотке крови беременных ($r = 0,81$; $p < 0,01$) и в предлежащей к эндометрию части плаценты ($r = 0,64$; $p < 0,05$), и обратная корреляционная зависимость между ФНО- α и противовоспалительным ИЛ-4 в сыворотке крови беременных ($r = -0,82$; $p < 0,001$) и в предлежащей к эндометрию части плаценты ($r = -0,6$; $p < 0,05$).

Характер изменений уровня цитокинов в пуповинной крови новорожденных соответствовал таковому в сыворотке крови беременных. Отмечалось существенное повышение уровня ФНО- α и ИЛ-1 β по мере нарастания степени тяжести пренатальной гипоксии с максимальным уровнем при тяжелой степени процесса в 2,2 и 4,6 раза превышающим показатели контроля ($p < 0,001$). Количество ИФР-1 и ИЛ-4, напротив снижалось в 2,3 и в 3 раза ($p < 0,001$). Показатели ИЛ-6 изменялись не однозначно. При легкой и средней степени пренатальной гипоксии уровень ИЛ-6

достоверно снижался на 17,49% и 51,2% ($p < 0,05$; $0,001$) относительно данных контрольной группы. При тяжелой степени пренатальной гипоксии отмечалась тенденция к повышению уровня ИЛ-6, но его уровень оставался ниже показателя контроля на 12%.

Выявленная динамика продукции NO и цитокинов в условиях пренатальной гипоксии плода направлена, очевидно, прежде всего на оптимальную регуляцию функционирования плаценты. Повышение уровня оксида азота оказывающего эффект вазодилатации способствует улучшению кровоснабжения плаценты, от которой зависит трофическое и кислородное снабжение плода, и вносит несомненный вклад в характер регуляторных процессов и компенсаторных механизмов, определяющих исход гестации. В случае преобладания цитокинов первого типа (провоспалительных) имеет место ограничение внедрения трофобласта, приводящее к внутриутробной задержке развития плода, преэклампсии, преждевременным родам и даже к потере беременности. В то же время чрезмерная продукция цитокинов второго типа (противовоспалительных) при резко сниженном содержании цитокинов первого типа может приводить к неограниченной инвазии, приводящей к приращению плаценты или к персистентной трофобластной болезни. Поэтому особое значение для физиологического течения беременности имеет баланс цитокинов. Полученные результаты позволяют говорить о том, что внутриутробная гипоксия, сопровождается неконтролируемым цитокиновым каскадом, ведущим к нарушению микроциркуляции и развитию патологии плаценты, что усугубляет страдание плода.

Литература:

1. Крукиер И.И. Продукция NO и окислительная деструкция белков в плаценте при физиологической беременности и плацентарной недостаточности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. -2003. -N 10.- С. 418-420.
2. Крукиер И.И. Процессы радикалообразования в плаценте при плацентарной недостаточности // Российский Вестник акушеров-гинекологов.- 2004.- №4. - С.6-8.
3. Крукиер И.И. Динамика цитокинов в разные сроки развития плаценты при физиологической и осложненной беременности // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.- 2005.- N1.- С. 18-21.
4. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях.// Вест. Рос. АМН. -2000.-№4.-С.3-9.
5. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в клинической патологии мозга.// Вестн. Рос. АМН.- 2000.- №4.- С. 5-10.
6. Мурашко Л. Е.Оксид азота в генезе преэклампсии.// Акуш. и гин.- №6.- 2009.- С. 25-29.

7. Крукиер И.И., Погорелова Т.Н., Орлов А.В. Влияние генерации оксида азота на продукцию интерлейкинов и процессы синтеза простагландинов в плодных оболочках при спонтанной родовой деятельности и слабости родовых сил.// Биомедицинская химия. - 2004. -Т. 50, вып.3. – С.304-308.
8. Пуховская С. Г., Гусева Л.Ж., Макаров С.В., Найденко Е.В. Новая методика спектрофотометрического определения оксида азота (II) в растворах.// Журнал аналитической химии.- «Наука» РАН.- том 60.- №1.- с. 27-29.

Рецензент: д.м.н., профессор Кочорбаев А.Н.
