

## Вопросы общей патологии

УДК 616-092.9:57.044:616-06

### **ЗАВИСИМОСТЬ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (VEGF-C) ОТ УРОВНЯ ОКСИДА АЗОТА И АКТИВНОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ НОРМАЛЬНОЙ БЕРЕМЕННОСТИ У БЕЛЫХ КРЫС**

**А. С. Иванова**<sup>1\*</sup>, доктор медицинских наук,

**С. Б. Назаров**<sup>1,2</sup>, доктор медицинских наук

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, 153012, Россия, г. Иваново, Шереметевский просп., д. 8

<sup>2</sup> ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова» Минздрава России, 153045, Россия, г. Иваново, ул. Победы, д. 20

#### **РЕЗЮМЕ**

**Цель** – изучить зависимость концентрации эндотелиального фактора роста сосудов от уровня оксида азота и активности свободнорадикальных процессов при нормальной беременности у белых крыс.

**Материал и методы.** Животные были разделены на 5 групп: 1-я группа – интактные небеременные крысы-самки; 2-я группа – интактные беременные крысы; 3-я группа – беременные крысы, получавшие вместо питьевой воды 0,2%-ный раствор нитрита натрия; 4-я группа – беременные крысы, получавшие неселективный ингибитор синтеза оксида азота – метиловый эфир L-аргинина внутримышечно в дозе 10 мг/кг ежедневно; 5-я группа – беременные крысы, получавшие внутримышечные инъекции альфа-токоферола в дозе 150 мг/кг два раза в неделю.

**Результаты и выводы.** При нормальной беременности у крыс сочетание увеличения концентрации оксида азота и активности свободнорадикальных процессов (при воздействии нитрита натрия, 3-я группа), либо их снижения (при влиянии альфа-токоферола, 5-я группа) сопровождается повышением продукции эндотелиального фактора роста сосудов. При воздействии метилового эфира L-аргинина (4-я группа) уменьшение уровня оксида азота на фоне активации свободнорадикальных процессов не сопровождается достоверными изменениями уровня эндотелиального фактора роста.

**Ключевые слова:** эндотелиальный фактор роста, оксид азота, свободнорадикальные процессы, альфа-токоферол, беременность.

\* Ответственный за переписку (corresponding author): [asivanova@mail.ru](mailto:asivanova@mail.ru)

Физиологическая беременность характеризуется многочисленными изменениями показателей организма, в том числе усилением образования оксида азота. Последний интенсифицирует маточный и фетоплацентарный кровоток, снижает сосудистое сопротивление, угнетает сократительную активность матки и увеличивает продолжительность гестации [11, 14]. Но при повышении уровня оксида азота активируются свободнорадикальные процессы, образуются токсичные соединения. Нарушение механизмов образования оксида азота и увеличение концентрации свободных радикалов являются важными факторами патогенеза эклампсии, плацентарной недостаточности, задержки развития плода, эмбрио- и фетопатий [12]. На ранних этапах онтогенеза способности антиоксидантной системы

очень ограничены, и развивающийся эмбрион и плод очень чувствительны к высокой концентрации свободнорадикальных продуктов. Поэтому в настоящее время в патогенетическую терапию при патологии беременности включают донаторы оксида азота и антиоксиданты [1, 17].

Формирование плаценты и ее васкуляризация регулируются ангиогенными и антиангиогенными факторами, среди которых можно выделить сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) – белок, который продуцируется множеством клеток различных типов. Он обеспечивает рост, миграцию эндотелиоцитов, выживание незрелых кровеносных сосудов, препятствуя апоптозу [2]. VEGF чрезвычайно важен в ходе эмбриогенеза для формирования адекватной функционирующей сосудистой системы [6]. Данные о влиянии

оксида азота и свободных радикалов, а следовательно, донаторов оксида азота и антиоксидантов, на продукцию эндотелиального фактора роста противоречивы.

Цель работы – изучить зависимость концентрации эндотелиального фактора роста сосудов от уровня оксида азота и активности свободнорадикальных процессов при нормальной беременности у белых крыс.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на 55 белых беспородных крысах-самках. Выбор крыс как объекта исследований обусловлен тем, что у них, как и у человека, гемохориальный тип плаценты, это 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) интактные небеременные крысы-самки; 2) интактные беременные крысы; 3) беременные крысы, получавшие вместо питьевой воды донатор оксида азота 0,2%-ный раствор нитрита натрия с 1-го дня беременности [15] (моделировали увеличение уровня оксида азота в организме); 4) беременные крысы, получавшие неселективный ингибитор синтеза оксида азота метиловый эфир L-аргинина (L-NAME) внутримышечно в дозе 10 мг/кг ежедневно с 1-го дня беременности [8] (моделировали снижение уровня оксида азота в организме); 5) беременные крысы, получавшие альфа-токоферол внутримышечно в дозе 150 мг/кг два раза в неделю с 1-го дня беременности [10] (моделировали увеличение уровня антиоксидантов в организме).

На 20-й день беременности в сыворотке крови животных оценивали следующие показатели: концентрацию суммарных нитратов и нитритов ( $\text{NO}_x$ ), васкулоэндотелиального фактора, свободных радикалов и состояние антиоксидантной системы. Уровень  $\text{NO}_x$  измеряли путем восстановления нитратов до нитритов в присутствии хлорида ванадия по методике K. M. Miranda et al. [13]. Концентрацию васкулоэндотелиального фактора (VEGF-C) в крови определяли методом ИФА с применением набора BioVendor (Чехия). Активность свободнорадикальных процессов оценивали хемилюминесцентным методом на биолюминометре БХЛ-06М по светосумме свечения (S) и максимальной интенсивности сигнала (Im), состояние антиоксидантной защиты – по коэффициенту k.

Статистическую значимость различий данных, подчиняющихся нормальному распределению, оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Если характер распределения отличался от нормального, то сравнение средних величин проводили с помощью T-критерия Уилкоксона и U-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На 20-й день при нормальной беременности у животных в сыворотке крови статистически значимо повышается концентрация  $\text{NO}_x$ , усиливаются свободнорадикальные процессы, возрастает уровень VEGF-C (табл.).

При введении донатора оксида азота уровень  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови значительно возрастает по сравнению с таковым у интактных беременных крыс; усиливаются свободнорадикальные процессы, одновременно повышается концентрация VEGF-C (табл.).

При введении L-NAME в сыворотке крови статистически значимо снижается концентрация  $\text{NO}_x$ ; интенсивность свободнорадикальных процессов становится максимально высокой. Уровень VEGF-C не имеет статистически значимых различий со значениями 2-й группы (см. табл.).

Введение альфа-токоферола беременным крысам снижает концентрацию  $\text{NO}_x$ , интенсивность свободнорадикальных процессов и повышает антиоксидантную активность сыворотки крови. Концентрация эндотелиального фактора роста в этих условиях достоверно возрастает (см. табл.).

При нормальной беременности оксид азота активно синтезируется из L-аргинина в сосудах матки и плаценте за счет интенсивного образования эндотелиальной NO-синтазы [14]. При физиологической беременности наблюдается уменьшение поступления L-аргинина в эндотелий сосудов матери. NO-синтаза при дефиците этой аминокислоты образует свободнорадикальные соединения [7]. Усиление перекисных процессов сопровождается снижением активности многих ферментов антиоксидантной защиты [18]. В результате увеличивается образование стойкого высокоактивного свободнорадикального соединения пероксинитрита. Повышение уровня VEGF-C, вероятно, связано с активным процессом ангиогенеза в плаценте и у плода на момент исследования.

При введении донатора оксида азота ведущим механизмом увеличения эндотелиального фактора роста может быть возникновение гемической гипоксии в материнском организме. При этом про-

Таблица. Биохимические показатели крови у крыс

Показатели	Группы				
	Интактные крысы		Беременные крысы, получавшие		
	небеременные n = 15	беременные, n = 10	донатор оксида азота, n = 10	ингибитор синтеза оксида азота, n = 10	альфа-токоферол, n = 10
	1	2	3	4	5
NO <sub>x</sub> , мкМ	144,5 ± 6,30*	242,7 ± 23,86	364,9 ± 45,26*	178,2 ± 8,10*	148,0 ± 8,38*
S, имп./с	7,66 ± 0,84*	12,5 ± 0,98	15,6 ± 1,13*	20,9 ± 1,22*	8,72 ± 1,02*
Imax, имп./с	1,53 ± 0,06*	1,91 ± 0,08	2,00 ± 0,08	2,44 ± 0,09*	1,89 ± 0,11
k	0,23 ± 0,02*	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,01*	0,12 ± 0,00*	0,24 ± 0,02*
VEGF, пг/мл	74,4 ± 8,44*	100,7 ± 7,26	139,7 ± 10,54*	110,9 ± 4,27	121,3 ± 4,14*

Примечание: \* – различия со 2-й группой статистически значимы (p < 0,05).

исходит активация метаболических путей, увеличивается образование индуцируемого гипоксией фактора 1-альфа и снижается образование ангиогенных веществ [6]. Также стимулирует образование VEGF снижение концентрации глюкозы в тканях, что наблюдается при дефиците кислорода [2]. Третьим путем активации синтеза сосудисто-эндотелиального фактора роста является увеличение свободнорадикальных процессов при избытке оксида азота [19].

При введении L-NAME снижение в сыворотке крови NO связано с блокадой синтеза оксида азота и образования эндотелиальной NO-синтазы. Известно, что вещества, конкурентно ингибирующие NO-синтазу, преобразуют этот фермент в генератор супероксида, что в дальнейшем способствует дисфункции сосудов и может играть значимую роль в патогенезе патологии беременности, выступая в качестве источника окислительного стресса сосудов [3]. В то же время антиоксидантная активность крови уменьшается. Уровень VEGF-C достоверно не отличается от значений 2-й группы. Известно, что метилированные аналоги L-аргинина способны оказывать отрицательное влияние на ангиогенез при беременности, они снижают экспрессию и активность VEGF [5].

Введение альфа-токоферола, по данным литературы, препятствует аккумуляции нитритов и снижает активность индуцибельной NO-синтазы макрофагов [9]. В крови у животных значительно уменьшается количество свободных радикалов, антиоксидантная активность возрастает за счет антиоксидантного эффекта альфа-токоферола. Концентрация эндотелиального фактора роста в этих условиях достоверно возрастает. Механизмом может быть повышение продукции эндотелиальной NO-синтазы и индуцируемых гипоксией факторов 1 и 2 под влиянием альфа-токоферола [4].

## ВЫВОДЫ

1. При нормальной беременности у крыс сочетание увеличения концентрации оксида азота и активности свободнорадикальных процессов (при воздействии нитрита натрия), либо их снижения (при влиянии альфа-токоферола) сопровождается повышением продукции эндотелиального ростового фактора сосудов.
2. Уменьшение уровня оксида азота на фоне активации свободнорадикальных процессов (при воздействии метилового эфира L-аргинина) не сопровождается изменениями в синтезе васкулоэндотелиального фактора.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние NO-индуцирующей терапии на исходы беременностей у пациенток с хронической фетоплацентарной недостаточностью / И. О. Буштырева [и др.] // Перинатальные инфекции: лечить или нет? : сб. трудов. – Ростов-н/Д, 2006. – С. 53.
2. Спринджук, М. В. Ангиогенез / М. В. Спринджук // Морфология. – 2010. – Т. 4, № 2. – С. 4–13.
3. Boger, R. H. The role of nitric oxide synthase inhibition by asymmetric dimethylarginine in the pathophysiology of preeclampsia / R. H. Boger // Gynecol. Obstet. Invest. – 2010. – Vol. 69, № 1. – P. 1–13.
4. Dayuan, L. Different Isoforms of Tocopherols Enhance Nitric Oxide Synthase Phosphorylation and Inhibit Human Platelet Aggregation and Lipid Peroxidation: Implications in Therapy with Vitamin E / L. Dayuan, T. Saldeen, F. Romeo, J. L. Mehta // Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics. – 2001. – Vol. 6, № 2. – P. 155–161.
5. Fliser, D. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): the silent transition from an 'uraemic toxin' to a global cardiovascular risk molecule / D. Fliser // Eur. J. Clin. Invest. – 2005. – Vol. 35, № 2. – P. 71–79.

6. Fujita, D. Role of extracellular signal-regulated kinase and AKT cascades in regulating hypoxia-induced angiogenic factors produced by a trophoblast-derived cell line / D. Fujita, A. Tanabe, T. Sekijima // *Journal of Endocrinology*. – 2010. – Vol. 206. – P. 131–140.
7. Goodrum, L. A. Arginine flux and nitric oxide production during human pregnancy and postpartum / L. A. Goodrum, G. R. Saade, M. A. Belfort et al. // *J. Soc. Gynecol. Investig.* – 2003. – Vol. 10, № 7. – P. 400–405.
8. Huang, H.-S. Chronic L-arginine administration increases oxidative and nitrosative stress in rat hyperoxaluric kidneys and excessive crystal deposition / H.-S. Huang, M.-Ch. Ma, J. Chen // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. 388–396.
9. Jiang, Q. Gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells / Q. Jiang, I. Elson-Schwab, C. Courtemanche, B. N. Ames // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 97 (21). – P. 11494–11499.
10. Kilic, F. S. The effects of vitamin E in ovalbumin-sensitized guinea pigs / F. S. Kilic, K. Erol // *Methods Find. Ex. Clin. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 25, № 1. – P. 27–31.
11. Leo, C. H., Jelinic, M., Ng, H. H. Vascular actions of relaxin: nitric oxide and beyond / C. H. Leo, M. Jelinic, H. H. Ng // *Br. J. Pharmacol.* – 2016. – № 9 [Epub ahead of print].
12. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia / K. Matsubara, T. Higaki, Y. Matsubara, A. Nawa // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16, № 3. – P. 4600–4614.
13. Miranda, K. M. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite / K. M. Miranda, M. J. Espay, D. A. Wink // *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. – 2001. – Vol. 5, № 1. – P. 62–71.
14. Nelson, S. H. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy / S. H. Nelson, O. S. Steinsland, Y. Wang // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 87. – P. 406–411.
15. Evaluation of the developmental toxicity of sodium nitrite in Long-Evans rats / A. C. Roth, G. F. Herkert, J. P. Bercz, M. K. Smith // *Fundam. Appl. Toxicol.* – 1987. – Vol. 9, № 4. – P. 668–677.
16. Schindler, R. Flavonoids and Vitamin E Reduce the Release of the Angiogenic Peptide Vascular Endothelial Growth Factor from Human Tumor Cells / R. Schindler, R. Mentlein // *J. Nutr.* – 2006. – Vol. 136, № 6. – P. 1477–1482.
17. Traber, M. G. Vitamin E inadequacy in humans: causes and consequences / M. G. Traber // *Adv. Nutr.* – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. 503–514.
18. Walsh, S. W. Secretion of lipid peroxides by the human placenta / S. W. Walsh, Y. Wang // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1993. – Vol. 169. – P. 1462–1466.
19. Retinoic acid stimulation of VEGF secretion from human endometrial stromal cells is mediated by production of reactive oxygen species / J. Wu [et al.] // *The Journal of Physiology*. – 2011. – Vol. 589. – P. 863–875.

#### CORRELATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR CONCENTRATION, NITROGEN OXIDE LEVEL AND FREE RADICAL PROCESSES ACTIVITY IN PHYSIOLOGICAL PREGNANCY IN WHITE RATS

A. S. Ivanova, S. B. Nazarov

##### ABSTRACT

**Objective** – to study the correlation of vascular endothelial growth factor concentration, nitrogen oxide level and free radical processes in physiological pregnancy in rats.

**Material and methods.** Animals examined were divided into 5 groups: 1 group – intact non-pregnant female rats; 2 group – intact pregnant rats; 3 group – pregnant rats which were given 0,2% sodium nitrite solution instead of fresh water; 4 group – pregnant rats which were given non-selective inhibitor of nitrogen oxide synthesis – L-arginine methyl ether - intramuscularly in the dose of 10 mg/kg per day; 5 group – pregnant rats which were given intramuscular injections of alpha-tocopherol in the dose of 150 mg/kg twice a week.

**Results and conclusions.** In physiological pregnancy in rats the combination of nitrogen oxide concentration increase and free radical processes activity (in sodium nitrite exposition, 3 group) or their decrease (in alpha-tocopherol influence, 5 group) were accompanied by the heightening production of vascular endothelial growth factor. Under exposition to L-arginine methyl ether (4 group) the diminishment of nitrogen oxide level on the background of free radical processes activation was nor accompanied by trustworthy level alterations in vascular endothelial growth factor.

**Key words:** vascular endothelial growth factor, nitrogen oxide, free radical processes, alpha-tocopherol, pregnancy.