Биомедицинская химия, 2004, том 50, вып.3, с.304-308

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 618.34: 577.11+ 618.4/5

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕРАЦИИ ОКСИДА АЗОТА НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ И ПРОЦЕССЫ СИНТЕЗА ПРОСТАГЛАНДИНОВ В ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧКАХ ПРИ СПОНТАННОЙ РОДОВОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И СЛАБОСТИ РОДОВЫХ СИЛ

И.И. Крукиер, Т.Н. Погорелова, А.В. Орлов

Ростовский НИИ акушерства и педиатрии МЗ РФ, 344012, Ростов-на-Дону, ул. Мечникова 43; факс: (863-2) 32-57-63 эл. почта: biochem@rniiap.ru;

Обследовано 62 женщины со сроком гестации 38-40 недель, 37 из которых родоразрешены через естественные родовые пути и 25 - путем экстренного кесарева сечения в связи со слабостью родовой деятельности. В плодных оболочках изучены продукция оксида азота, содержание интерлейкина-1β, и интерлейкина-6, арахидоновой кислоты и активность фосфолипазы A_2, лимитирующей скорость синтеза простагландинов. Установлено, что при слабости родовых сил в плодных оболочках имеет место повышение генерации оксида азота, снижение уровня интерлейкинов, арахидоновой кислоты, активности фосфолипазы A_2. Модуляция продукции оксида азота плодными оболочками с помощью ее ингибиторов и активаторов позволила уточнить роль этого радикала в регуляции цитокинового ответа и начальных стадий синтеза простагландинов.

Ключевые слова: оксид азота, интерлейкины, синтез простагландинов, плодные оболочки, слабость родовых сил.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время не вызывает сомнения, что плодные оболочки - это не просто резервуар для амниотической жидкости, а ткань, участвующая в параплацентарном обмене между организмами матери и плода и регуляции родовой деятельности [1, 2].

Уточнение биохимических механизмов нарушения процессов родовозбуждения, в частности, развития слабости родовых сил, с позиций современных научных знаний требует дальнейших исследований, способствующих, в конечном итоге, разработке новых подходов к лечению данной патологии. Сократительная активность миометрия контролируется сочетанным действием различных биоактивных веществ, выступающих в качестве ее ингибиторов или активаторов [3]. Нарушение продукции этих компонентов может обусловить изменение контрактильной способности матки.

В последние годы большое внимание уделяется релаксирующему эффекту оксида азота (NO) на гладкомышечные клетки, который реализуется через активацию растворимой гуанилатциклазы [4-6]. В то же время другие пути влияния NO на процессы развития родовой деятельности остаются недостаточно выясненными, в частности, возможность регуляции синтеза простагландинов в плодных оболочках.

Ранее проведенные нами исследования позволили установить важную роль модификации простагландинсинтезирующих систем плодных оболочек в нарушении процессов родовозбуждения [7,8]. Однако первичные механизмы, инициирующие нарушение сложной цепи реакций, участвующих в регуляции родовой деятельности, еще окончательно не выяснены. В этой связи, представляет интерес изучение продукции в плодных оболочках интерлейкинов, усиливающих синтез простагландинов и, в свою очередь, связанных с процессами генерации NO [9-11].

В данной работе были прослежены взаимосвязи между образованием в плодных оболочках NO, содержанием интерлейкина - 1β (ИЛ-1β), интерлейкина 6 (ИЛ-6), арахидоновой кислоты и активностью фосфолипазы A_2. Этот фермент, как известно, лимитирует скорость каскада арахидоновой кислоты и, следовательно, в значительной степени определяет интенсивность продукции простагландинов.

МЕТОДИКА. Исследования проведены на культуре клеток и гомогенатах плодных оболочек (амниона) полученных от 62 женщин со сроком гестации 38-40 недель, 37 из которых родоразрешены через естественные родовые пути (1 группа), 25 - путем кесарева сечения в экстренном порядке в связи со слабостью родовой деятельности (2 группа). Регистрацию сократительной активности миометрия осуществляли с использованием фетального монитора "Oxford" (Англия).

Биохимические исследования были проведены на 10% гомогенатах амниона. Активность синтазы оксида азота (NOS) измеряли по увеличению продукции оксида азота из L-аргинина в присутствии NADPH [12]. Содержание NO оценивали с помощью ЭПР-спектроскопии мононитрозильных комплексов с двухвалентным железом и диэтилдитиокарбоматом, обладающих характерными парамагнитными свойствами [13]. Сигналы ЭПР регистрировали на радиоспектрометре Цейсс - ER-9 (Германия). Активность фосфолипазы A_2 определяли по увеличению содержания свободных жирных кислот [14], используя в качестве субстрата фосфатидилхолин ("Sigma", США). Содержание арахидоновой кислоты определяли с помощью газожидкостного анализа на хроматографе "Хром-5" с дуальной системой пламенно-ионизационных детекторов на стеклянной колонке 2,4x3,0 мм, заполненной 10% Silar 10 C на "Chromosorb P/Naw" 100-120 мм (“Serva", Германия) с программированием температуры. Температура детектора была 250°C, инжектора - 230°C. Скорость газа-носителя гелия, водорода и воздуха составляла соответственно 30, 28 и 500 мл/мин. Идентификацию осуществляли по стандартному метиловому эфиру арахидоновой кислоты ("Sigma", США).

Клеточную культуру амниона получали по ранее описанному методу [15]. В культуре клеток определяли содержание ИЛ-1β и ИЛ-6 иммуноферментным методом с помощью наборов фирмы "Cytimmune" (США).

Статистическую обработку данных проводили, используя лицензионный пакет программ Statistica (версия 5,1; Statsoft, Inc.). Полученные результаты оценивали как статистически значимые при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полученные результаты (табл. 1) свидетельствуют о том, что в культуре клеток плодных оболочек женщин 1-ой группы содержание обоих исследованных интерлейкинов значительно выше аналогичных величин 2-ой группы (ИЛ-1 β в 2 раза, ИЛ-6 в 2,5 раза, $p<0,01$). Эти данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о повышении количества указанных интерлейкинов в околоплодных водах при спонтанных родах [16], а также с экспериментальными материалами об усилении их продукции в гестационных тканях при развитии родовой деятельности [17]. Аналогичные изменения установлены нами для арахидоновой кислоты, уровень которой в плодных оболочках при слабости родовых сил снижен в 2,4 раза ($p<0,01$) по сравнению с таковым у женщин со спонтанной родовой деятельностью.

Таблица 1. Содержание оксида азота, интерлейкинов, арахидоновой кислоты, активность нитрооксидсинтазы и фосфолипазы A_2 в плодных оболочках при спонтанной родовой деятельности (1 группа) и слабости родовых сил (2 группа)

Показатели	I группа	II группа
Оксид азота (нмоль/г)	1,55±1,19	2,54±0,27*
Синтаза оксида азота (нмоль/г/ч)	0,32±0,04	0,49±0,06*
Интерлейкин 1β (пг/мг белка)	2,90±0,50	1,40±0,30*
Интерлейкин 6(пг/мг белка)	20,80±4,50	8,30±1,60*
Фосфолипаза A_2 (ммоль/г/ч)	0,93±0,15	0,41±0,08*
Арахидоновая кислота (% от суммы жирных к-т)	5,20±0,81	2,14±0,42*

Примечания: * - достоверные отличия между показателями 1 и 2 групп ($p<0,05$).

Сниженной во 2-ой группе женщин оказалась и активность фосфолипазы A_2, что, очевидно, является важной причиной уменьшения продукции простагландинов в этих условиях. Сопоставление активности фосфолипазы A_2 и содержания арахидоновой кислоты с уровнем интерлейкинов выявило прямую корреляционную связь между ними ($r=0,74$ - $0,78$). Поскольку арахидоновая кислота - исходный субстрат в синтезе эйказаноидов, можно полагать, что подобные коррелятивные связи наблюдаются также между уровнем ИЛ-6, ИЛ-1β и продукцией простагландинов.

Что касается генерации оксида азота плодными оболочками, то она, напротив, была увеличена у женщин со слабостью родовой деятельности. Так, активность NO-синтазы и количество оксида азота у них выше, чем в 1-ой группе соответственно на 53% ($p<0,05$) и 64% ($p<0,01$), причем эти показатели находятся в обратной зависимости от содержания интерлейкинов. Коэффициенты корреляции между уровнем ИЛ-1β, ИЛ-6 и количеством NO составили -0,81 и -0,85 соответственно. Выявленная закономерность позволяет высказать предположение о возможности участия NO плодных оболочек в регуляции уровня компонентов цитокиновой системы.

С целью проверки этого положения нами проведены исследования *in vitro* на клеточной культуре плодных оболочек с введением N^{ω}-нитро-l-аргинина (L-NNA), являющегося классическим ингибитором NO-синтазы и нитропруссида натрия - донора NO [18]. К аликвотной части культуры клеток плодных оболочек женщин обеих групп добавляли вышеуказанные соединения (в виде 0,1% раствора) и через 60 минут оценивали продукцию оксида азота, ИЛ-1β и ИЛ-6. Другую часть клеточной культуры исследовали аналогичным образом, добавляя вместо ингибитора или индуктора генерации NO физиологический раствор.

Как видно из таблицы 2, при добавлении к культуре клеток плодных оболочек женщин первой группы L-NNA одновременно со значительным снижением продукции NO отмечалось увеличение уровня ИЛ-1β и ИЛ-6 на 71-73% ($p<0,05$). Повышение количества NO после добавления донора оксида азота сопровождалось соответственным снижением генерации обоих интерлейкинов более чем в 2 раза ($p<0,01$). Аналогичные направленность и степень изменений обнаружены и во второй группе женщин, что свидетельствует об общности биохимических взаимосвязей, независимо от базисного фона метаболитов.

Эти данные подтверждают роль оксида азота в качестве, по крайней мере, одной из сигнальных молекуд, ответственных за регуляцию выработки интерлейкинов и опосредованно влияющих на продукцию простагландинов. В то же время не исключено и прямое влияние оксида азота на активность ферментов, участвующих в синтезе простагландинов. В настоящей работе мы не имели возможности изучить активность циклооксигеназы, с геминовой группой которой может связываться оксид азота, лимитируя тем самым ее действие [19]. Однако установленный нами факт снижения активности фосфолипазы A_2 и уровня арахидоновой кислоты в плодных оболочках при слабости родовых сил на фоне

Таблица 2. Влияние модуляторов активности синтазы оксида азота на продукцию оксида азота и интерлейкинов в плодных оболочках

Интенсивность продукции	Культура клеток плодных оболочек					
	1 группа			2 группа		
	0,9% NaCl	L-NNA	Нитропруссид Na	0,9% NaCl	L-NNA	Нитропруссид Na
NO (нмоль/г)	1,76± 0,24	0,71± 0,08*	3,27± 0,39*	2,87± 0,31	1,29± 0,15*	5,08± 0,62*
ИЛ-1β (пг/мг белка)	3,40± 0,60	5,90± 0,80*	1,40± 0,20*	1,70± 0,30	2,90± 0,40*	0,80± 0,10*
ИЛ-6 (пг/мг белка)	22,4± 4,1	38,3± 4,70*	10,1± 1,80*	9,1± 1,50	15,6± 0,57*	4,1± 1,80*

Примечания: * -достоверные отличия между показателями в отсутствие и в присутствии модуляторов продукции оксида азота ($p<0,05$).

повышения содержания NO может свидетельствовать об ингибировании последним синтеза простагландинов.

Таким образом, приведенные данные позволяют заключить, что продукция оксида азота плодными оболочками, очевидно, влияет на процессы родовой деятельности, прежде всего, модулируя цитокиновую регуляцию синтеза простагландинов, хотя не исключена и прямая связь между продукцией NO и интенсивностью каскада арахидоновой кислоты.

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику Ростовского противочумного института Асеевой Л.Е. за помощь в получении культуры клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Радзинский В.Е., Кондратьева Е.Н., Милованов А.П.* (1993) Патология околоплодной среды, Здоров'я. Киев.
2. *Орлов В.И., Погорелова Т.Н., Длужевская Т.С., Мелконова К.Ю., Крукиер И.И.* (1998) Околоплодные воды (химический состав и биологические функции), РГУ. Ростов-на-Дону.
3. *Romero R.L., M.* (1988) Clin. Obstet.Gynecol., **31**, 553-559.
4. *Bassenge E., Huckstorf C.* (1991) Acta. Cardiol., **46**, 419-424.
5. *Beasley D., Mc Guiggin M.* (1994) J. Exp. Med., **179**, 71-74.
6. *Mc Larty A.L., Mc Cregor C.G., Miller V.M.* (1993) Amer. J Phisiol., **264**, 999-1003.
7. *Orlov V.I., Pogorelova T.N., Melkonova K.Y.* (1991) XIII World Congress of Gynec. and Obst. (FIGO), **4**, 331.
8. *Orlov V.I., Pogorelova T.N., Melkonova K.Y.* (1996) J. Perinat. Med., **24**, 495-500.
9. *Corbett J.A., Wang J. L., Sweetland M.A. et.al.* (1992) J. Clin. Unvest., **90**, 2384-2391.
10. *Corbett J.A., Kwon G., Turk J., Mc Daniel M.l.* (1993) Biochemistry, **32**, 767-770.
11. *Xenos E., Stevens R., Gores P et.al.* (1993) Transplant. Proc., **25**, 994-995.
12. *Цапин А.И., Степаничев М.Ю., Либе Л.М., Гуляева Н.В.* (1994) Бюлл. экспер. биол., N 1, 39-41.
13. *Vanin A.F., Mordvintcev P.I., Kleschnev A.L.* (1984) Studia. Biophys., **107**, 35-142.

14. *Lewis G.P.,Piper P.J., Vigo C.* (1979) Brit. J. Pharm. **66**, 500-501.
15. *Fortunato S. J., Menon R., Swan K.F., Menon R. C.* (1996) Amer. J. Obstet. Gynec., **174**, 1855-1861.
16. *Lahan N., Brennecke S., Bendtzen K. et. al.* (1994) Eur. J. Endocrinol., **131**, 607-614.
17. *Pasetto N., Piccione E., Zicari A., Fontana L.* (1993) Placenta, **14**, 361-364.
18. *Furfine E.S., Harmon M.F., Paith J., Garvey E.* (1993) Biochemistry, **32**, 8512-8517.
19. *Kanner J., Harel S., Granir R.* (1992) Lipids, **27**, 46-49.

Поступила 26.06.2003

THE INFLUENCE OF NITRIC OXIDE GENERATION ON THE PRODUCTION OF INTERLEUKINS AND PROCESSES OF PROSTAGLANDINS SYNTHESIS IN FETAL MEMBRANES IN SPONTANEOUS PARTURITION AND UTERINE INERTIA.

I.I. Krukier, T.N. Pogorelova, A.V. Orlov

Rostov Institute for Obstetrics and Gynecology,
Mechnikova 43, fax: (863-2) 32-57-63; e-mail: biochem@rniiap.ru

62 women in 38-40 weeks gestation were examined, 37 of them had normal delivery, whereas others (25) with uterine inertia, had delivery by Cesarean section. In the fetal membranes preparations nitric oxide production, interleukins -1β and -6, arachidonic acid content and phospholipase A_2 activity (limiting the rate of prostaglandin biosynthesis) were examined. In the case of uterine inertia increase of nitric oxide generation, decrease of interleukins and arachidonic acid levels and phospholipase A_2 activity was found. Modulation of nitric oxide production with inhibitors and activators allowed to emphasize the role of NO in regulation of cytokine response and control of initial stages of prostaglandins synthesis.

Key words: nitric oxide, interleukins, prostaglandins synthesis, fetal membranes, uterine inertia.