



Оригинальное исследование
УДК 616-092.9: 612.663.52
<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-1-8>

ЛИНЕЙНАЯ СКОРОСТЬ КРОВОТОКА И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В МАТОЧНОЙ АРТЕРИИ У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ

Людмила Николаевна Рогова¹, Данил Сергеевич Липов^{2✉}, Наталья Владимировна Шестернина³, Анастасия Андреевна Полякова⁴

^{1,2,3,4}Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

¹rogova.ln@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1046-0329>

^{2✉}danillipov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2086-0369>

³chemordakova.nat@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3261-3851>

⁴nastasya.polyakova.2001@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7562-3849>

Аннотация. Эксперимент проводился на 30 крысах линии Wistar. Животных поделили на 2 группы: 1 группа – 20 крыс, на которых моделировали перитонит методом Дзюбенко Н.Ю. (1999), путем интраперитонеального введения 1 мл 7% аутокаловой взвеси с 1 каплей скипидара. Вторая группа – контрольная, были использованы 10 интактных животных. Через 24 часа у крыс обеих групп под хлоралгидратом (400 мг/кг массы) определили линейную скорость кровотока в маточной артерии на высокочастотном ультразвуковом доплерографе, без применения фармакологически активных веществ и с использованием АХ (ацетилхолин, 0,01 мг/кг, Acrosorganics, США), и L-NAME (10 мг/кг, Acrosorganics, США). После чего рассчитывалась реакция кровотока на вышеуказанные вещества и активность эндотелиальной NO-синтазы. Установлено, что при перитоните происходит достоверное снижение линейной скорости кровотока в маточной артерии с развитием ишемии, которая в свою очередь может влиять на показатели фертильности. При этом наблюдается незначительное усиление активности эндотелиальной нитрооксидсинтазы, которой явно недостаточно для компенсации ишемии, что может свидетельствовать о преобладании вазоконстрикторных механизмов на фоне сохранения синтеза и высвобождения NO в маточных артериях при перитоните.

Ключевые слова: бесплодие, маточная артерия, перитонит, доплерография

Для цитирования: Линейная скорость кровотока и функциональная активность эндотелиальной NO-синтазы в маточной артерии у крыс при экспериментальном перитоните / Л.Н. Рогова, Д.С. Липов, Н.В. Шестернина и др. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2023. – № 1. – С. 48-52. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-1-8>.

LINEAR BLOOD FLOW VELOCITY AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF ENDOTHELIAL NO-SYNTHASE IN THE UTERINE ARTERY IN RATS WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS

Lyudmila N. Rogova¹, Danil S. Lipov^{2✉}, Natalia V. Shesternina³, Anastasia A. Polyakova⁴

^{1,2,3,4}Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

¹rogova.ln@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1046-0329>

^{2✉}danillipov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2086-0369>

³chemordakova.nat@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3261-3851>

⁴nastasya.polyakova.2001@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7562-3849>

Abstract. The experiment was carried out on 30 Wistar rats. The animals were divided into 2 groups: group 1 – 20 rats, on which peritonitis was modeled by the method of Dzyubenko N. Yu. (1999), by intraperitoneal administration of 1 ml of 7% autocalic suspension with 1 drop of turpentine. The second group was a control group, 10 intact animals were used. After 24 hours in rats of both groups under chloral hydrate (400 mg/kg weight) the linear velocity of blood flow in the uterine artery was determined on a high-frequency ultrasound Dopplerograph, without the use of pharmacologically active substances and using ACH (acetylcholine, 0,01 mg/kg, Acrosorganics, USA), and L-NAME (10 mg/kg, Acrosorganics, USA). After that, the blood flow reaction to the above substances and the activity of endothelial NO-synthase were calculated. It was found that with peritonitis, there is a significant decrease in the linear velocity of



blood flow in the uterine artery with the development of ischemia, which in turn can affect fertility indicators. At the same time, there is a slight increase in the activity of endothelial nitroxide synthase, which is clearly insufficient to compensate for ischemia, which may indicate the predominance of vasoconstrictor mechanisms against the background of preservation of synthesis and release of NO in uterine arteries in peritonitis.

Keywords: infertility, uterine artery, peritonitis, dopplerography

For citation: Linear blood flow velocity and functional activity of endothelial NO-synthase in the uterine artery in rats with experimental peritonitis / L.N. Rogova, D.S. Lipov, N.V. Shesternina, et al. // Far Eastern medical journal. – 2023. – № 1. – P. 48-52. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-1-8>.

При нарушении гемоциркуляции могут запускаться патологические процессы, влияющие как на работу отдельных органов, так и на состояние организма в целом. Для сохранения вида особенно важна постоянная поддержка адекватного кровотока в органах репродуктивной системы. Известно, что гемодинамика в маточных и овариальных сосудах у женщин постоянно изменяется в зависимости от менструального цикла. На показатели кровотока влияют уровень эстрогенов, прогестерона, цитокины (интерлейкин (IL)-1 эпидермальный фактор роста, сосудистый эндотелиальный фактор роста и др.) В тоже время установлено, что ряд гинекологических заболеваний приводит к достоверному изменению скорости и интенсивности маточного и яичникового кровотока, что в свою очередь может сказываться на репродуктивном потенциале женщины. Так, например, при ряде воспалительных заболеваниях органов малого таза (эндометрит, аднексит) на ранних стадиях происходит усиление кровотока в маточной артерии, при аденомиозе наблюдается обратная картина – ухудшение кровотока в сосудистом бассейне матки [1]. Известно, что ухудшение маточной гемо-

динамики может напрямую сказываться на вероятности имплантации эмбриона и наступлению беременности у женщины, что в свою очередь может стать одной из причин нарушения репродуктивной функции [2].

Однако, до сих пор остаются не до конца изученными механизмы влияния ряда экстрагенитальных заболеваний на гемоциркуляцию в сосудах репродуктивных органов у женщин [3]. В этом контексте особое внимание заслуживают воспалительно-деструктивные процессы в брюшной полости из-за особенности кровоснабжения органов малого таза и непосредственной близости женских репродуктивных органов к очагу процесса.

Целью настоящего исследования было определение особенностей линейной скорости кровотока в маточной артерии, посредством доплерографии у крыс с экспериментальным перитонитом на фоне проведения фармакологических проб с вазоактивными веществами: ацетилхолином-хлоридом (АХ) и метиловым эфиром L-нитроаргинина (L-NAME); а также определение функциональной активности эндотелиальной NO-синтазы (e-NOS).

Материалы и методы

Исследование проведено на 30 крысах-самках линии Wistar массой 300-400 г, поделенных на 2 группы. Животные содержались в стандартных условиях вивария согласно правилам GLP при проведении доклинических исследований в РФ (Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»). Экспериментальное исследование было одобрено Экспертным советом по биомедицинской этике (локальным этическим комитетом) ФГБОУ ВО ВолГМУ МЗ РФ (справка № 2021/053 от 27.05.2021). Ежедневно в течение 7 дней всем крысам брались влагалищные смывы 0,3 мл физиологического раствора с дальнейшим их окрашиванием 0,5% раствором метиленового синего и микроскопированием (микроскоп «Биомед», увеличение 200) для определения стадии эстрального цикла. Последующее исследование маточного кровотока у всех крыс осуществлялось в стадию диэструса.

В первую группу вошли 20 крыс со смоделированным перитонитом путем интраперитонеального введения 1 мл 7% аутокаловой взвеси в физиологическом растворе с 1 каплей скипидара [4]. Вторая группа – контрольная, куда вошли, содержавшиеся в вива-

рии наряду с первой группой животные, на которых не моделировали патологию (10 крыс). Обе группы животных имели свободный доступ к питьевой воде. Через 24 часа животных выводили из эксперимента предварительно наркотизировав хлоралгидратом из расчета 400 мг/кг массы. Через катетеризированную подключичную вену вводились фармакологически активные вещества для определения вазодилатирующей функции эндотелия.

В качестве фармакологически активных веществ использовали АХ (ацетилхолин хлорид, 0,01 мг/кг), Acrosorganics, США), стимулирующий локальное высвобождение NO эндотелием, и L-NAME (метиловый эфир L-нитроаргинина, 10 мг/кг, Acrosorganics, США), ингибирующий эндотелиальную e-NOS) [5]. Линейную скорость кровотока измеряли на маточной артерии у разных особей с помощью высокочастотного ультразвукового доплерографа (Минимакс-Допплер-К, Санкт-Петербург).

По результатам эксперимента оценивали реакции маточного кровотока (РМК) на вышеуказанные биологически активные вещества, путем определения максимального прироста показателя линейной скорости



при введении АХ (РМК (АХ)) и максимального снижения показателя линейной скорости при введении L-NAME (РМК (L-NAME)) относительно исходных значений показателя гемодикуляции, который рассчитывали по формуле [6, 7, 8]: $РМК (АХ) = \frac{ЛС_{макс.}}{ЛС_{исх.}} * 100\%$, (где $ЛС_{макс.}$ – максимальное значение линейной скорости кровотока; $ЛС_{исх.}$ – исходное значение линейной скорости кровотока). При проведении первой пробы с АХ у всех животных отмечалось увеличение линейной скорости кровотока в абсолютных значениях с 1-й минуты, достигавшее максимальных значений на 2-4 минуте, и затем возвращалась на исходный уровень. Максимальное значение показателя фиксировалось и заносилось в результат.

$РМК (L-NAME) = \frac{ЛС_{мин.}}{ЛС_{исх.}} * 100\%$, (где $ЛС_{мин.}$ – минимальное значение линейной скорости кровотока; $ЛС_{исх.}$ – исходное значение линейной скорости кровотока).

Степень прироста линейной скорости в маточной артерии в ответ на введение АХ в сравнении с последующим в течение 15-25 минут снижением скорости в ответ на введение L-NAME отражает функциональную активность эндотелиальной NO-синтазы (ФАЭ), которая выражена в способности ее к выработке вазо-

дилатора NO. Данный показатель рассчитывался по формуле [6, 7, 8]:

$$ФАЭ = (РМК (АХ) / РМК (L-NAME)) * 100\%.$$

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 2.8.4 (разработчик – ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (М) и стандартных отклонений (SD), границ 95% доверительного интервала (95% ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Ме) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 – Q3). Сравнение двух групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, при условии равенства дисперсий выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента, при неравных дисперсиях выполнялось с помощью t-критерия Уэлча. Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

В экспериментальной группе из 20 животных, на которых моделировали перитонит, 4 крысы погибли до оценки линейной скорости кровотока в маточной артерии. Очевидная причина смерти – инфекционно-септический шок; через сутки наиболее вероятно развитие стадии устойчиво-обратимого, переходящего в необратимый шок с проявлениями ишемии.

Проведенное исследование показало, что в исходном состоянии до проведения фармакологических проб линейная скорость кровотока в маточной артерии у крыс с экспериментальным перитонитом была достоверно ниже (на 48,33%), чем линейная скорость у контрольных животных (табл. 1). Отметим также, что диаметр маточной артерии у экспериментальных животных при визуальном сравнении был на 1-1,2 мм меньше, чем в контрольной группе. Это, очевидно, связано с реакцией сосудистого русла на действие шокогенного фактора. Известно, что в периваскулярной ткани вдоль микрососудов содержится значительное число тучных клеток, первоначальная реакция которых на действие экстремального фактора – увеличение секреции гистамина путем экзоцитоза. Затем происходит дегрануляция тучных клеток с высвобождением большого числа биологически активных веществ, которые участвуют в регуляции сосудистого тонуса, проницаемости стенок микрососудов, реологических свойств крови и др. Наряду с этим, возрастает высвобождение катехоламинов из адренергических нервных окончаний. Типовой реакцией на шокогенный фактор является усиление синтеза катехоламинов мозговым слоем надпочечников и развитие гиперкатехолемии. Под воздействием этих факторов, происходит десенсибилизация β-адренорецепторов,

активация α-адренорецепторов сосудов, что ведет к увеличению сосудистого сопротивления, спазму артериол, шунтированию кровотока, и, как следствие, развитию нейрогенной формы ангиоспастической ишемии с целью централизации кровообращения.

После введения АХ у обеих групп животных регистрировалось увеличение скорости кровотока с последующим возвращением к исходному значению, причем в контрольной группе животных абсолютная скорость была выше, чем в экспериментальной (на 54,39%) (табл. 1). При подсчете РМК на АХ процент прироста линейной скорости кровотока увеличивался на 24,45% у контрольных животных, в экспериментальной группе у крыс с перитонитом – на 33,65%, $p \geq 0,1$. Сравнительный анализ полученных результатов показывает, что вазодилатирующий эффект на введение ацетилхолина наиболее выражен у экспериментальных животных (табл. 2).

При проведении пробы с L-NAME, заключающейся в ингибировании нитроксидсинтаз, через 15-20 минут после введения происходило плавное падение линейной скорости кровотока до минимальных значений. В этот период имела место максимальная вазоконстрикция, проявляющаяся падением линейной скорости кровотока до 7,33 см/с (табл. 1). Такое значительное падение линейной скорости кровотока является, очевидно, следствием накопления в крови большого уровня вазоконстрикторов типа катехоламинов и значительной роли оксида азота в регуляции сосудистого тонуса, вазодилатационная функция которого в этой ситуации инактивируется. Стоит отметить, что при перитоните, как при любом воспалительном процессе, помимо эндотелиальной NO-синтазы



имеет место активация индуцибельной NO-синтазы и в связи с тем, что L-NAME является неселективным блокатором нитрооксидсинтаз, в проводимом эксперименте, очевидно, происходит суммация эффекта блокировки как eNOS, так и iNOS.

Функциональная активность эндотелиальной NO-синтазы в маточной артерии при перитоните, оцениваемой на фоне функциональных проб с АХ и L-NAME, имела тенденцию к преобладанию над показателем в контроле, но это изменение незначимо (табл. 1). Спазм маточной артерии в исходном состо-

янии и еще более резкое уменьшение линейной скорости кровотока на фоне L-NAME свидетельствует о выраженном констрикторном влиянии на маточный кровоток при перитоните.

Видимо при воспалительно-деструктивных процессах в брюшной полости, одновременно активируются констрикторные механизмы и происходит незначительное усиление активности эндотелиальной нитрооксидсинтазы, которой явно недостаточно для компенсации ишемии, что в свою очередь, может приводить к нарушению репродуктивной функции.

Таблица 1 – линейная скорость кровотока в исходном состоянии, на фоне применения АХ, L-name (см/сек) у крыс контрольной группы и с экспериментальным перитонитом

Название групп	Исходная скорость кровотока (см в с) ¹	Скорость кровотока после АХ (см в с) ¹	Скорость кровотока после L-name (см в с) ¹	Функциональная активность e-NOS (%) ²
Контрольная группа	33±2,68 (n=10)	39,55±7,93 (n=10) P _{исход – после АХ} <0,001*	16,68±4,16 (n=10) P _{исход – после L-name} <0,001*	242,90 [209,16–256,09] (n=10)
Экспериментальная группа	15,95±1,23 (n=16) P _{контрольная-экспериментальная группа} <0,001*	21,51±5,11 (n=16) P _{1 контрольная-экспериментальная группа} =0,001*; P _{2 исход – после АХ} <0,001*	7,33±2,73 (n=16) P _{1 контрольная-экспериментальная группа} =0,021*; P _{2 исход – после L-name} <0,001*	282,00 [220,05–404,30] (n=16) P _{контрольная-экспериментальная группа} =0,171

Примечание. * – различия показателей статистически значимы (p<0,05), 1 – используемый метод: t-критерий Стьюдента; 2 – используемый метод: U-критерий Манна – Уитни.

Таблица 2 – Степень изменения скорости кровотока на фоне, применения АХ, L-name (см/сек) у крыс контрольной группы и с экспериментальным перитонитом

Название групп	РМК на АХ в % от исходного уровня кровотока	РМК на L-name в % от исходного уровня кровотока
Контрольная группа	124,45 [114,14–127,21] (n=10)	52,57 [51,15–57,99] (n=10)
Экспериментальная группа	133,65 [112,36–141,57] (n=16) P _{контрольная-экспериментальная группа} =0,268	46,99 [30,80–53,37] (n=16) P _{контрольная-экспериментальная группа} =0,140

Примечание. Используемый метод: U-критерий Манна – Уитни.

Выводы

1. У крыс с перитонитом линейная скорость кровотока в маточной артерии по отношению к контрольной группе значимо меньше.

2. ФАЭ в маточной артерии при перитоните, оцененная на фоне функциональных проб с АХ и L-NAME, достоверно не отличалась от ФАЭ в контрольной группе.

3. При воспалительно-деструктивных процессах в брюшной полости в маточных артериях преобладают вазоконстрикторные механизмы, ангиоспастическая ишемия, что потенциально может влиять на показатель фертильности.

Список источников

- Ананченко М.Н., Чуян Е.Н. Кожная микроциркуляция в условиях функциональной нагрузки у испытуемых с различными типологическими особенностями под влиянием низкоинтенсивного миллиметрового излучения // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2011. – № 2 (63). – С. 30-49.
- Андреева И.В., Виноградов А.А., Жесткова Т.М., Калина Н.В., Симаков Р.Ю., Симакова Е.С., Григорьев А.С., Святывода Р.В. Современные возможности изучения гемодинамики в экспериментальных исследованиях // Дальневосточный медицинский журнал. – 2019. – № 2. – С. 54-58.
- Арутюнян А.Ф., Гайдуков С.Н., Кустаров В.Н. Современные аспекты патогенетически обоснованной терапии аденомиоза // Педиатр. – 2016. – № 3.
- Быченко М.А., Перфилова В.Н., Латыпова Г.М., Катаев В.А. Эндотелиопротекторное и антиагрегантное действие густого экстракта из травы первоцвета весеннего в условиях экспериментальной хронической



сердечной недостаточности // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2018. – № 3 (67). – С. 37-41.

5. Девятова Е.А., Цатурова К.А., Вартанян Э.В. Оценка вероятности успеха имплантации при экстракорпоральном оплодотворении // Доктор.Ру. – 2016. – № 7 (124).
6. Фастова И.А., Губанова Е.И. Синдром острого повреждения легких при экспериментальном перитоните // ВНМТ. – 2012. – № 2. – С. 114-117.
7. Cuisset T. Usefulness of index of microcirculatory resistance to detect microvascular dysfunction as a potential mechanism of stress-induced cardiomyopathy (Tako-tsubo syndrome) / T. Cuisset, J. Quilici, M. Pankert, et al. // Int. J. Cardiol. – 2011. – Vol. 153, № 3. – P. 51-53.
8. Mishra V.V., Agarwal R., Sharma U., Aggarwal R., Choudhary S., Bandwal P. Endometrial and Subendometrial Vascularity by Three-Dimensional (3D) Power Doppler and Its Correlation with Pregnancy Outcome in Frozen Embryo Transfer (FET) Cycles. J of Obstetrics and Gynaecology of India. – 2016. – № 66 (Suppl 1). – P. 521-527. DOI: 10.1007/s13224-016-0871-5.

References

1. Ananchenko M.N., Chuyan E.N. Skin microcirculation under functional load conditions in subjects with various typological features under the influence of low-intensity millimeter radiation // Educational notes of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry. – 2011. – № 2 (63). – P. 30-49.
2. Andreeva I.V., Vinogradov A.A., Zhestkova T.M., Kalina N.V., Simakov R. Yu., Simakova E.S., Grigoriev A.S., Svyatovoda R.V. Modern possibilities of studying hemodynamics in experimental studies // Far Eastern Medical Journal. – 2019. – № 2. – P. 54-58.
3. Arutyunyan A.F., Gaidukov S.N., Kustarov V.N. Modern aspects of pathogenetically based therapy of adenomyosis // Pediatrician. – 2016. – № 3.
4. Bychenkova M.A., Perfilova V.N., Latypova G.M., Kataev V.A. Endothelioprotective and antiplatelet effect of thick extract from spring primrose grass in conditions of experimental chronic heart failure // Bulletin of Volgograd State Medical University. – 2018. – № 3 (67). – P. 37-41.
5. Devyatova E.A., Tsaturova K.A., Vartanyan E.V. Evaluation of the probability of success of implantation in in vitro fertilization // <url>. – 2016. – № 7 (124).
6. Fastova I.A., Gubanova E.I. Acute lung change syndrome in experimental peritonitis // VNMT. – 2012. – № 2. – P. 114-117.
7. Cuisset T. Usefulness of index of microcirculator resistance to detect microvascular dysfunction as a potential mechanism of stress-induced cardiomyopathy (Taco-tsub syndrome) / T. Cuisset, J. Quilici, M. Pankert, et al. // Int. J. Cardiol. – 2011. – Vol. 153, № 3. – P. 51-53.
8. Mishra B.B., Agarwal R., Sharma Y., Aggarwal R., Choudhary S., Bandwal P. Endometrial Andryo Transfer (Fet) Cycles Three-Dimensional (3d) Power Doppler and its Correlation with Pregnancy Outcome Frozen Embryo Transfer (Fet) Cycles // J. of Obstetrics and Gynaecology of India. – 2016. – № 66 (Suppl 1): 521-527. to: 10.1007 / c13224-016-0871-5.

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

The authors declare no conflicts of interests.

Статья принята к публикации 10.12.2022.

The article was accepted for publication 10.12.2022.

