

УДК 616.13/.14-018.74-091.8-092.9:613.84

**Г.И. Губина-Вакулик, Т.В. Горбач,
В.Ю. Юнусов, Е.М. Лукьянова, Н.Г. Колоусова**

Эндотелий кровеносных сосудов новорожденных потомков курящих родителей

Харьковский национальный медицинский университет, Украина

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA.2016.6(78):56-59; doi 10.15574/SP.2016.78.56

Цель: оценить влияние табакокурения родителей на эндотелий кровеносных сосудов потомков, используя экспериментальное моделирование табакокурения родителей.

Материалы и методы. Сформированы «семейные пары»: 1) «курили» только самки-матери до спаривания 1 мес. и во время вынашивания, в специальной камере с табачным дымом в течение 15 мин. ежедневно 2) «курили» только самцы-отцы 1 мес. до спаривания; 3) «курили» самцы и самки, т.е. оба родителя; 4) контрольная группа крыс — интактные. В каждой группе исследовано 15 новорожденных особей: гр.М, гр.О, гр.МО, гр.К. В сыворотке крови определяли содержание эндотелина-1, эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов фирмы DRG (ФРГ) и S-нитрозотиолов (стабильных метаболитов NO) спектрофлуориметрическим методом. На срезах ткани головного мозга поставлена иммуногистохимическая реакция на 8 фактор свертывающей системы крови. Использованы антитела фирмы Cell Marque (США) с их пероксидазной визуализацией. В пределах фотоснимка микропрепарата (ув.400х) определена длина стенок капилляров, а также абсолютная и относительная длина участков деэндотелизации капилляров.

Результаты. Концентрация в крови эндотелина-1 в основных группах увеличена, а S-нитрозотиолов — уменьшена, соотношение Э/S-NO во всех основных группах достоверно увеличено в ряду: К<О<М<МО. Содержание VEGF в крови в основных группах также уменьшено (кроме самок гр.О). Иммуногистохимически установлено, что протяженность деэндотелизированной стенки капилляров в основных группах увеличена (более 50%, тогда как в гр.К — около 20%).

Выводы. В эксперименте обнаружено повышение вазоконстрикторного потенциала эндотелия, снижение резистентности эндотелия к действию повреждающих факторов и снижение регенераторных возможностей эндотелия.

Ключевые слова: табакокурение родителей, новорожденные, эндотелий, экспериментальная модель.

Введение

По данным ВОЗ, в Украине насчитывается почти 9 млн курильщиков. Распространенность курения среди мужчин в Украине — более 50%, среди женщин — 20% и выше [1]. Негативное действие табакокурения на организм в целом и кровеносные сосуды в частности подтверждено многочисленными научными исследованиями. Внутритрубные последствия табакокурения в основном изучаются касательно влияния на плод материнского курения. Доказано, что компоненты табачного дыма проникают через плаценту, кожу и ЖКТ плода из амниотической жидкости [5]. Выявлено, что выкуривание одной сигареты беременной женщиной сопровождается спазмом маточных сосудов продолжительностью 20–30 минут, что приводит к ослаблению маточно-плацентарного кровотока [3].

Негативное действие табакокурения на кровеносные сосуды подтверждено известными научными исследованиями. При проведении УЗИ установлено, что активное табакокурение во взрослом периоде жизни сопровождается утолщением интима-медиа сонной артерии [4]. По данным О.О. Кваши с соавт. [2], среди курящих мужчин в два раза чаще возникает стенокардия, повышается риск коронарной смерти. Публикации по проблеме влияния табакокурения родителей на сосуды потомства единичны. В частности, при УЗИ аорты 5-летних детей, чьи родители (не только мать, но и отец) были курильщиками, выявлено утолщение и повышение жесткости стенки аорты [5]. Курение родителей, как и другие перинатальные действующие факторы, может оказать прямое негативное действие не только на компоненты сосудистой стенки плода, но эпигенетически изменить экспрессию генов, отвечающих за их функционирование в течение всей жизни потомка [6,7].

Цель исследования: оценить влияние табакокурения родителей на метаболические и морфологические свойства эндотелия кровеносных сосудов потомков, используя экспериментальное моделирование табакокурения родителей

Материал и методы исследования

В эксперимент взяты молодые половозрелые (3 месяца) крысы линии Вистар, содержащиеся в стандартных условиях вивария, с соблюдением положений Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» и соответствующих документов Украины.

Сформированы «семейные пары»: 1) «курили» только самки-матери; 2) «курили» только самцы-отцы; 3) «курили» самцы и самки, т.е. оба родителя; 4) контрольная группа крыс — интактные. В специальной камере со стеклянной стенкой распределялся табачный дым 1/2 тлеющей сигареты «Прилуки». «Курящие» животные выдерживались в камере на протяжении 15 минут ежедневно в течение месяца до зачатия (самки и самцы) и на протяжении беременности самок.

В каждой группе исследовано 15 новорожденных особей: гр.М, гр.О, гр.МО, гр.К. Крысята выводились из эксперимента путем декапитации, при этом проводился забор крови для биохимического исследования и ткани головного мозга (участок теменной доли правого полушария) для морфологического исследования капиллярной сети.

В сыворотке крови определяли содержание эндотелина-1, эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) иммуноферментными методами с помощью наборов реагентов фирмы DRG (Германия) и S-нитрозотиолов (стабильных метаболитов NO) спектрофлуориметрическим методом. На срезах ткани головного мозга поставлена иммуногистохимическая реакция на 8 фактор свертывающей системы крови, поскольку этот белок синтезируется только в эндотелиоцитах и хорошо обозначает контур капилляров. Использованы антитела фирмы Cell Marque (США) с их пероксидазной визуализацией. В пределах фотоснимка микропрепарата (ув. 400х) определена длина стенок капилляров, а также абсолютная и относительная длина участков деэндотелизации капилляров. Иммуногистохимические исследования проводили на микроскопе

Таблица 1

Содержание эндотелина и S-нитрозотилов (S-NO) в сыворотке крови новорожденных крысят-потомков

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

Примечание: p – уровень значимости различия с показателем гр.К.

Таблица 2

Морфометрическое исследование длины стенки капилляров (мкм) участка коры головного мозга новорожденных крысят (S=1500 мкм²)

Группа	Общая абсолютная длина стенок капилляров	Абсолютная длина стенки капилляров, меченых антителами к 8 фактору	Абсолютная длина стенки капилляров, не меченых антителами к 8 фактору	Относительная длина стенки капилляров, не меченых антителами к 8 фактору
Контроль	1104,5±21,3	887,42±12,7	216,6±9,14	0,20±0,01
М	488,0±10,2 p<0,001	197,18±7,1 p<0,001	291±4,7 p<0,001	0,59±0,02 p<0,001
О	665,3±11,7 p<0,001	250,97±3,97 p<0,001	414,33±9,8 p<0,001	0,62±0,03 p<0,001
МО	876,6±12,4 p<0,001	389,9±12,5 p<0,001	486,7±14,7 p<0,001	0,55±0,02 p<0,001

Примечание: p – уровень значимости различия с показателем гр.К.

Axiostar-plus (Zeiss) с помощью программного обеспечения «ВидеоТест» (Санкт-Петербург, РФ).

Цифровые данные обработаны с использованием вариационного анализа в электронных таблицах Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе содержания эндотелина-1 (Э) и S-нитрозотилов (S-NO) в сыворотке крови новорожденных крысят – потомков «курящих» крыс (табл.1) видно, что у новорожденных крысят основных групп наблюдается увеличение содержания в крови эндотелина-1 и уменьшение содержания S-нитрозотилов. Исходя из функционального значения каждого из этих метаболитов, а именно вазоконстрикторного значения эндотелина-1 и вазодилаторного значения NO (предшественника S-нитрозотилов), конечным показателем изменения функционального состояния эндотелия может быть соотношение Э/S-NO: во всех основных группах это

соотношение достоверно увеличено: К<О<М<МО, сформировано дисфункциональное состояние эндотелия с доминированием вазоконстрикторного потенциала.

Используя морфологические методы исследования, удалось установить не только факт меньшего развития капиллярной сети головного мозга у крысят-потомков основных групп, но и еще одно особое свойство эндотелия кровеносных сосудов у потомков курящих родителей – его сниженную устойчивость к действию повреждающих факторов, а именно к действию гипоксии/аноксии при выводе животных из эксперимента.

Во всех основных группах общая длина капиллярных стенок на микропрепарате была значительно меньше, чем в гр.К, особенно в гр.М (рис. 1,2, табл. 2).

Стенка капилляров представлена участками, где меченый 8 фактор определяется (сохранившийся эндотелий) и отсутствует (эндотелий десквамирован). Протяженность

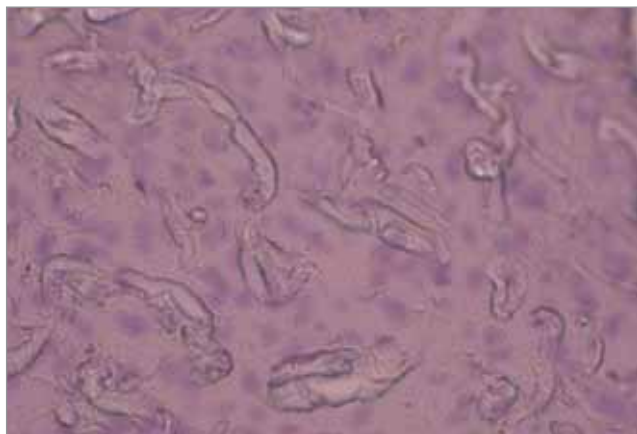


Рис. 1. Капиллярная сеть в коре головного мозга контрольного животного. Иммуногистохимическая реакция на 8 фактор свертывающей системы крови. Ув.400.

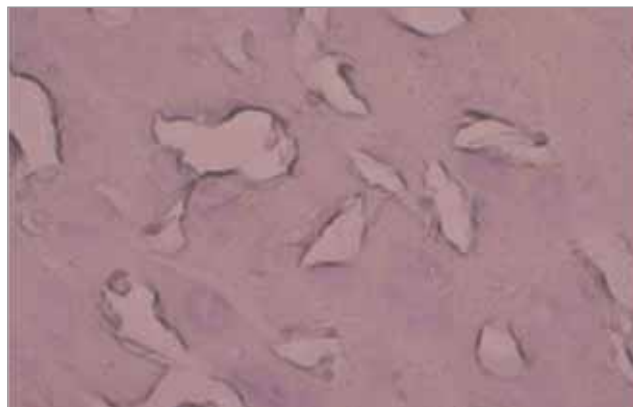


Рис. 2. Расширение просвета капилляров в коре головного мозга крысенка гр. МО. Выраженная деэндотелизация. Иммуногистохимическая реакция на 8 фактор свертывающей системы крови. Ув.400.

Таблица 3

Концентрация VEGF в сыворотке крови (нг/мл) у новорожденных крысят-потомков

Пол	Гр.К	Гр.М	Гр.О	Гр.МО
Самки	12,64±1,07	7,16±0,45 p<0,001	13,11±1,07 p>0,05	6,08±0,34 p<0,001
Самцы	10,48±1,00	5,02±0,47 p<0,001	8,32±0,45 p<0,05	3,16±0,22 p<0,001

Примечание: p – уровень значимости различия с показателем гр.К.

деэндотелизированной стенки капилляров в основных группах увеличена, а с сохранившимся эндотелием — уменьшена. Если в гр.К пятая часть длины капиллярной стенки деэндотелизирована, то в основных группах — это более половины длины капиллярной стенки.

Именно отсутствие эндотелиоцитов на базальной мембране и приводит к обнаруженному расширению просвета капилляров, т.к. стенка капилляра теряет жесткость (фото 1,2).

Если в основных группах имеет место снижение устойчивости эндотелия к действию повреждающих факторов, то сформирована ли адекватная активация его пролиферации с целью регенерации? Об этом можно судить по концентрации VEGF в сыворотке крови (табл. 3).

Регенерация эндотелия в основных группах, очевидно, замедлена, т.к. содержание VEGF в сыворотке крови снижено у потомков обоих полов в гр.М и гр.МО. У самцов гр.О снижение содержания VEGF минимально, а у самок — соответствует контролю. Таким образом, можно предположить, что в основных группах отсутствует стимуляция деления эндотелиоцитов, адекватная степени их повреждения. Т.е. дефекты эндотелиального покрова сосудистой сети, возникшие по разным причинам, у потомков курящих

родителей будут «закрываться» новым эндотелием медленнее, что может обусловить повышенную проницаемость капилляров (в том числе и для лекарств), непрочность гемато-тканевых барьеров.

Исследования на клиническом уровне проблемы эндотелия у потомков курящих родителей позволят усовершенствовать дозировку лекарств, в т.ч. анестетиков, разработать профилактику негативных последствий действия этого родительского фактора на эндотелий кровеносных сосудов потомства, как в перинатальный период, так и в течение всего постнатального онтогенеза.

Выводы

Экспериментально показано, что курение родителей до спаривания и затем матери во время вынашивания потомства приводит к нарушению метаболического и морфологического состояния эндотелия кровеносных сосудов новорожденных потомков. Обнаружено повышение вазоконстрикторного потенциала эндотелия, снижение резистентности эндотелия к действию повреждающих факторов и снижение регенераторных возможностей эндотелия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляев С. Г. Антенатальная охрана плода в условиях табакокурения супружеской пары: в помощь практическому врачу / С. Г. Беляев // Укр. мед. альм. — 2009. — Т. 12, № 2. — С. 34—36.
2. Кваша О. О. Рекомендації з профілактики і лікування тютюнопаління / О. О. Кваша, І. М. Горбась, І. П. Смирнова // Здоров'я України. — 2010. — № 2. — С. 34—36.
3. Курение при беременности / А. А. Левченко, П. Е. Устинова, П. А. Линчевский [и др.] // Неонатология. — 2009. — №3. — С. 18—21.
4. Bots M. L. Intima media thickness as a surrogate marker for generalised atherosclerosis / M. L. Bots, D. E. Grobbee // Cardiovasc Drugs Ther. — 2002. — Vol.16 (4). — P. 341—51.
5. Parental smoking and vascular damage in the ir 5-year-old children / C. C. Geerts, M. L. Bots, C. K. van der Ent [et al.] // Pediatrics. — 2012. — Vol. 121 (1). — P. 45—54.
6. Perinatal programming of renal function / Dotsch J., Alejandre-Alcazar M., Janoschek R. [et al.] // Curr Opin Pediatr. — 2016. — Vol. 28 (2). — P. 188—94.
7. Singhal A. The role of infant nutrition in the global epidemic of non-communicable disease / A. Singhal // Proc Nutr Soc. — 2016. — Vol. 75 (2). — P. 162—8.

Ендотелій кровеносних судин новонароджених нащадків батьків-курців

Г.І. Губіна-Вакулік, Т.В. Горбач, В.Ю. Юнусов, Є.М. Лук'янова, Н.Г. Колоусова

Харківський національний медичний університет, Україна

Мета: оцінити вплив тютюнопаління батьків на ендотелій кровеносних судин нащадків, використовуючи експериментальне моделювання тютюнопаління батьків.

Матеріали і методи. Сформовано «сімейні пари»: 1) «курили» тільки самиці-матері до спарування 1 міс. і під час виношування у спеціальній камері з тютюновим димом протягом 15 хв щодня 2) «курили» тільки самці-батьки 1 міс. до спарування; 3) «курили» самці і самиці, тобто обоє батьків; 4) контрольна група щурів — інтактні. У кожній групі досліджено 15 новонароджених особин: гр.М, гр.Б, гр.МБ, гр.К. У сироватці крові визначали вміст ендотеліну-1, ендотеліального фактора росту судин (VEGF) імуноферментними методами за допомогою наборів реагентів фірми DRG (Німеччина) і S-нітрозотіолів (стабільних метаболітів NO) спектрофлюориметричним методом. На зрізах тканини головного мозку поставлена імуногістохімічна реакція на 8 фактор згортання крові. Використано антитіла фірми Cell Marque (США) з їх пероксидазно візуалізацією. У межах фотознімку мікропрепарату (зб.400х) визначена довжина стінок капілярів, а також абсолютна і відносна довжина ділянок деендотелізації капілярів.

Результати. Концентрація в крові ендотеліну-1 в основних групах збільшена, а S-нітрозотіолів — зменшена, співвідношення E / S-NO у всіх основних групах достовірно збільшено у ряді: К<Б<М<МБ. Вміст VEGF у крові в основних групах також зменшений (крім самиць гр.Б). Імуногістохімічно встановлено, що протяжність деендотелізованої стінки капілярів в основних групах збільшена (більше 50%, тоді як і гр.К — близько 20%).

Висновки. В експерименті виявлено підвищення вазоконстрикторного потенціалу ендотелію, зниження резистентності ендотелію до дії уражуючих факторів і зниження регенераторних можливостей ендотелію.

Ключові слова: новонароджені, ендотелій, тютюнопаління батьків, експериментальна модель.

Vascular endothelium of newborn descendants with smoking parents**G.I. Gubina-Vakulyk, T.V. Gorbach, V.Yu. Yunusov, E.M. Lukyanova, N.G. Kolousova**

Kharkiv National Medical University, Ukraine

The aim of the investigation: to evaluate the influence of smoking parents on the endothelium of blood vessels of descendants, using experimental modeling of smoking parents.**Material and methods.** Formed «couples»: in a special chamber with tobacco smoke for 15 minutes every day: 1) «smoked» only females-mother before mating 1 month and during gestation; 2) «smoke» is only males-fathers 1 month before mating; 3) «smoked» males and females, ie, both parents; 4) a control group of rats — intact. In each group 15 newborn animals were studied: gr.M, gr.F, gr.MF, gr.C.

In the blood serum endothelin-1, vascular endothelial growth factor (VEGF) by immunoassay methods using ELISA kits of DRG firm reagents (Germany), and S-nitrosothiols (stable NO metabolites) by spectrofluorimetric method were studied. In sections of brain tissue immunohistochemical reaction to 8 coagulation factor was supplied. We used antibodies firms Cell Marque (USA) with its visualization by peroxidase. Within photograph microscope slide (400x) the length of the capillary walls, as well as absolute and relative length of the deendotelized capillaries walls were determined.

Results. Blood concentrations of endothelin-1 in the main groups are increased, and S-nitrosothiols — are reduced, the ratio E / S-NO in all main groups are increased significantly: K<F<M<MF. Concentrations of VEGF in the blood serum of the main groups are reduced (except females of gr.F). Immunohistochemistry were revealed that the length of deendotelized capillary walls in the main groups is increased (more than 50%, whereas s gr.C — about 20%).**Conclusion.** In the experiment, we found increased endothelial vasoconstrictor potential, decreased endothelial resistance to damaging factors and the reduction of the regenerative capacity of endothelium.**Key words:** newborn, endothelium, smoking parents, experimental modeling.**Сведения об авторах:****Губина-Вакулик Г.И.** — д.м.н., проф. каф. патанатомии Харьковского национального медицинского университета. Адрес: Харьков, пр. Науки, 4; тел. (072) 707-73-33.**Горбач Т.В.** — к.биол.н., доц. каф. биохимии Харьковского национального медицинского университета. Адрес: Харьков, пр. Науки, 4.**Юнусов В.Ю.** — детский хирург, соискатель каф. патанатомии Харьковского национального медицинского университета.

Адрес: Харьков, пр. Науки, 4; тел. (072) 707-73-33.

Лукьянова Е.М. — студентка 6 курса мед. ф-та Харьковского национального медицинского университета. Адрес: Харьков, пр. Науки, 4.**Колосува Н.Г.** — к.вет.н., ст.н.сотр. ЦНИЛ.

Статья поступила в редакцию 23.05.2016 г.

ДО УВАГИ АВТОРІВ!**АЛГОРИТМ РЕЄСТРАЦІЇ ORCID****Open Researcher and Contributor ID (ORCID) — міжнародний ідентифікатор науковця**

Створення єдиного реєстру науковців та дослідників на міжнародному рівні є найбільш прогресивною та своєчасною ініціативою світового наукового товариства. Ця ініціатива була реалізована через створення в 2012 році проекту Open Researcher and Contributor ID (ORCID). ORCID — це реєстр унікальних ідентифікаторів вчених та дослідників, авторів наукових праць та наукових організацій, який забезпечує ефективний зв'язок між науковцями та результатами їх дослідницької діяльності, вирішуючи при цьому проблему отримання повної і достовірної інформації про особу вченого в науковій комунікації.

Для того щоб зареєструватися в ORCID через посилання <https://orcid.org/> необхідно зайти у розділ «For researchers» і там натиснути на посилання «Register for an ORCID id».

В реєстраційній формі послідовно заповнюються обов'язкові поля: «First name», «Last name», «E-mail», «Re-enter E-mail», «Password» (Пароль), «Confirm password»

В перше поле вводиться ім'я, яке надане при народженні, по-батькові не вводиться. Персональна електронна адреса вводиться двічі для підтвердження. Вона буде використовуватися як Login або ім'я користувача. Якщо раніше вже була використана електронна адреса, яка пропонується для реєстрації, з'явиться попередження червоного кольору. **Неможливе створення нового профілю з тією ж самою електронною адресою.** Пароль повинен мати не менше 8 знаків, при цьому містити як цифри, так і літери або символи. Пароль, який визначається словами «Good» або «Strong» приймається системою.

Нижче визначається «Default privacy for new works», тобто налаштування конфіденційності або доступності до персональних даних, серед яких «Public», «Limited», «Private».

Далі визначається частота повідомлень, які надсилає ORCID на персональну електронну адресу, а саме, новини або події, які можуть представляти інтерес, зміни в обліковому записі, тощо: «Daily summery», «Weekly summery», «Quarterly summery», «Never». Необхідно поставити позначку в полі «I'm not a robot» (Я не робот).

Останньою дією процесу реєстрації є узгодження з політикою конфіденційності та умовами користування. Для реєстрації необхідно прийняти умови використання, натиснувши на позначку «I consent to the privacy policy and conditions of use, including public access and use of all my data that are marked Public».

Заповнивши поля реєстраційної форми, необхідно натиснути кнопку «Register», після цього відкривається сторінка профілю учасника в ORCID з особистим ідентифікатором ORCID ID. Номер ORCID ідентифікатора знаходиться в лівій панелі під ім'ям учасника ORCID.

Структура ідентифікатора ORCID являє собою номер з 16 цифр. Ідентифікатор ORCID — це URL, тому запис виглядає як <http://orcid.org/xxxx-xxxx-xxxxxxx>.

Наприклад: <http://orcid.org/0000-0001-7855-1679>.

Інформація про ідентифікатор ORCID необхідно додавати при подачі публікацій, документів на гранти і в інших науково-дослідницьких процесах, вносити його в різні пошукові системи, наукометричні бази даних та соціальні мережі.

Подальша робота в ORCID полягає в заповненні персонального профілю згідно із інформацією, яку необхідно надавати.