

ВЛИЯНИЕ АРГИНИНА НА ПРОЦЕСС ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ СПАЕК БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ У САМОК КРЫС

Одесский национальный медицинский университет

Реферат. А. Г. Волянская. **ВЛИЯНИЕ АРГИНИНА НА ПРОЦЕСС ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ СПАЕК БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ У САМОК КРЫС.** Проведено исследование влияния аргинина на процесс формирования посттравматических спаек брюшной полости у самок крыс в условиях экспериментальной модели посттравматического формирования перитонеальных спаек. Формирование перитонеальных спаек вызывали внутрибрюшинным однократным введением водной суспензии талька. Установлено, что назначение L-аргинин гидрохлорида крысам, подвергавшимся воздействию талька, приводит к усилению в тканях матки воспаления и фиброза. Также происходит существенная активация процессов неоангиогенеза, сопровождающаяся появлением атипичных для матки форм кровеносных сосудов.

Ключевые слова: спаечный процесс, белые крысы, матка, L-аргинина гидрохлорид

Реферат. А. Г. Волянська. **ВПЛИВ АРГІНІНУ НА ПРОЦЕС ФОРМУВАННЯ ПОСТТРАВМАТИЧНИХ СПАЙОК ЧЕРЕВНОЇ ПОРОЖНИНИ У САМОК ЩУРІВ.** Проведено дослідження впливу аргініну на процес формування посттравматичних спайок черевної порожнини у самок щурів за умов експериментальної моделі посттравматичного формування перитонеальних спайок. Формування перитонеальних спайок спричинювали внутрішньочеревинним однократним введенням водної суспензії тальку. Встановлено, що призначення щурам L-аргініну гідрохлориду приводить до посилення в тканинах матки запалення та фіброзу. Також має місце значна активація процесів неоангіогенезу, що супроводжується появленям атипичних для матки форм кровоносних судин.

Ключові слова: спайковий процес, білі щури, матка, L-аргініну гідрохлорид

Summary. A. Volyanska. **IMPACT ON THE PROCESS ARGININE POST-TRAUMATIC INTRA-ABDOMINAL ADHESIONS IN FEMALE RATS.** The aim of work was to research of the influence of L-arginine hydrochloride on the formation of post-traumatic intra-abdominal adhesions in female rats in an experimental model of post-traumatic peritoneal adhesions. The experimental formation of peritoneal adhesions was caused by intraperitoneal introduction of the single dose of talc aqueous suspension. It was found that administration of L-arginine hydrochloride leads to an increase of inflammation and fibrosis in uterine tissues in an experimental model of post-traumatic peritoneal adhesions. Activation of neo-angiogenesis, accompanied by the appearance of atypical forms of uterine blood vessels was also significant.

Keywords: adhesion process, the white rat, uterus, L-arginine hydrochloride

Уровень внутриклеточной продукции оксида азота (NO) оказывает влияние на формирование определенного фенотипа перитонеальных фибробластов, способных индуцировать постхирургические спайки [14]. Назначение крысам доноров или неспецифических ингибиторов синтеза NO в условиях модели гинекологических операций способствует угнетению спаечного процесса [6]. Результаты экспериментальных исследований позволяют предположить, что процесс формирования постхирургических спаек у женщин протекает на фоне отчетливого понижения в крови уровня субстрата NO-синтазных комплексов – L-аргинина, что приводит к снижению продукции молекулы оксида азота и усилению образования активных форм кислорода [14], которые, в свою очередь, являются мощными стимуляторами спаечного процесса [3]. Во-вторых, индуцибельная изоформа NO-синтазы, как основной источник NO на фоне снижения экспрессии и энзиматической активности конститутивных изоформ NO-синтаз играет важную роль при спаечном процессе [7]. В-третьих, ишемия, которая является одним из основных пусковых механизмов нарушения репаративных процессов в тканях, подвергавшихся хирургическому вмешательству [3], стимулирует рост экспрессии индуцибельной NO-синтазы и нарушение внутриорганного метаболизма L-аргинина [7, 14]. Таким образом, параметры метаболизма аргинина и уровней продукции NO являются важными показателями степени риска возникновения постхирургических спаек. В литературе имеются единичные данные о перспективности терапевтического использования L-аргинина, а информация о возможных цитопротекторных свойствах блокаторов NO-синтаз носит достаточно противоречивый характер.

Учитывая то, что единственным субстратом, обеспечивающим функционирование цикла оксида азота, является аминокислота L-аргинин, целью данной работы было исследование особенностей течения спаечного процесса у самок крыс на фоне продолжительного назначения L-аргинина гидрохлорида.

Материалы и методы. Исследования были выполнены на самках беспородных белых крыс с массой тела 180-200 г. На протяжении всего эксперимента животные получали стандартный рацион питания при свободном доступе к питьевой воде. В качестве экспериментальной модели спаечного процесса было выбрано внутрибрюшинное введение водной суспензии талька [1]. Животных путем случайного отбора разделили на 2 группы. В первую группу (n=10) были отобраны животные, подвергавшиеся воздействию талька - индуктора спаечного процесса (группа сравнения). Водную суспензию талька (20% в весовом соотношении) готовили на воде для инъекций и вводили шприцем в область малого таза на протяжении 7-и суток. Крысам второй группы (n=10), кроме введения талька, назначали аргинина гидрохлорид. Аргинин вводили ежедневно в виде водного раствора внутривентрикулярно в количестве 3 мг на 100 г массы тела. Через 7 суток крыс выводили из эксперимента путем декапитации под легкой эфирной анестезией и собирали пробы тканей матки для дальнейших патоморфологических исследований. Полученные образцы ткани фиксировали в 10% растворе формалина. Далее материал обрабатывали по общепринятой методике с последующей заливкой в парафин. Срезы тканей толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления в срезах коллагеновых волокон соединительной ткани использовалась окраска по Ван-Гизон [2].

Результаты исследований

При гистологическом исследовании тканей животных, забитых через 7 суток после начала эксперимента, определяется периваскулярный и межмышечный отек, выраженный более в I группе.

У животных II группы, получавших аргинина гидрохлорид, в тканях органов (матке, маточной связке, кишке) выражена диффузная лимфоплазмочитарная инфильтрация, наблюдаются массивные кровоизлияния по типу геморрагического пропитывания. Лейкоцитарная инфильтрация обнаруживается в стенках влагалища, эндометрии, у некоторых животных - в миометрии, связке матки и параметральной клетчатке. В одном из наблюдений в эндометрии обнаруживается участок выраженной лимфогистиоцитарной инфильтрации, напоминающий формирующийся лимфоидный фолликул. Лейкоцитарные инфильтраты проникают в миометрий в виде мелких фокусов, рассеянных во всей мышечной оболочке. В базальном слое эндометрия визуализируются лакунарно расширенные, имеющие прямой ход, кровеносные сосуды, очаги отложения гемосидерина и признаки активного ангиогенеза (Рис. 1). В миометрии и стенках влагалища наблюдаются вновь образованные сосуды, ориентирующиеся группами субэпителиально (Рис. 2).

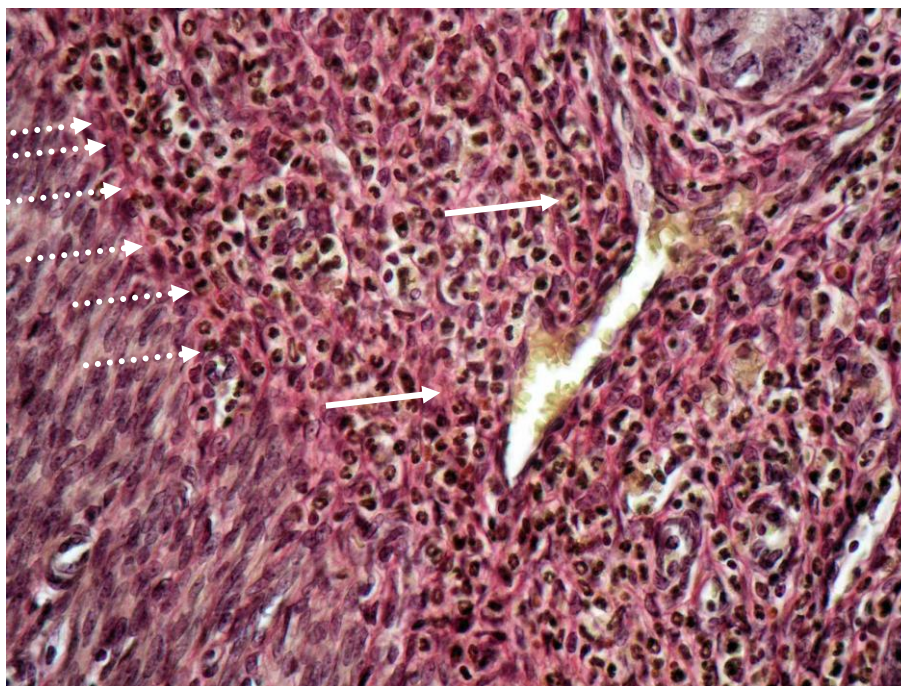


Рис. 1. Микрофотография. Лакунарно расширенные, имеющие прямой ход, кровеносные сосуды базального слоя эндометрия животных (показано стрелками), лейкоцитарная инфильтрация (показано пунктирными стрелками). Окраска по Ван-Гизон. Ув. 200.

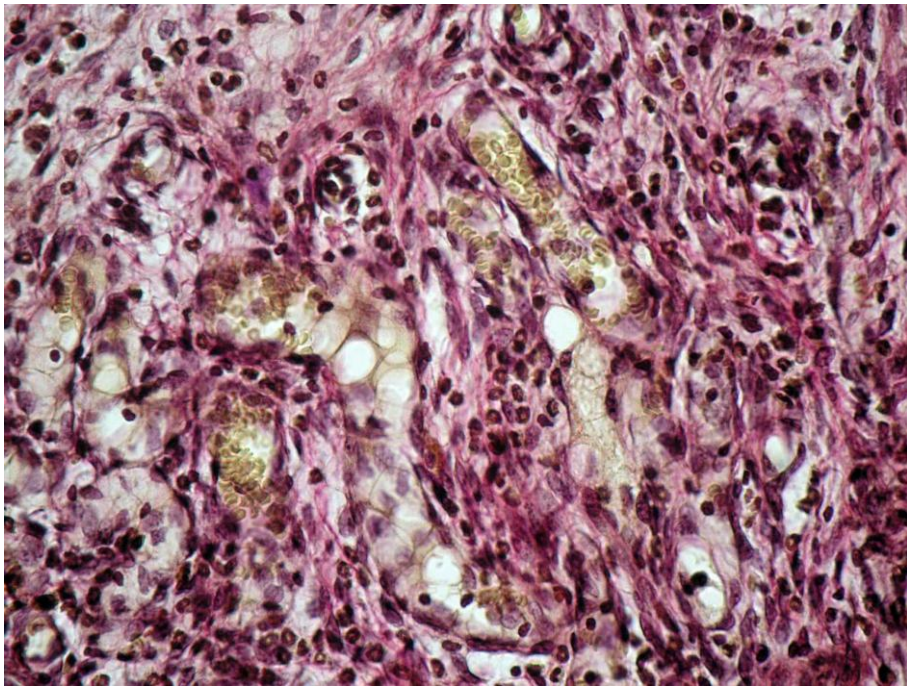


Рис. 2. Микрофотография. Образование новых кровеносных сосудов в стенках влагалища. Окраска по-ван-Гизон. Ув. 200.

В одном наблюдении маточная связка оказалась плотно сращена с жировой клетчаткой фиброзной спайкой (Рис. 3). Спайка сформирована жировой и соединительной тканью, содержит хорошо развитую сосудистую сеть и лимфатические протоки.

Отмечается умеренная коллагенизация отдельных участков миометрия, хаотичное и разнонаправленное расположение сформированных фибрилл коллагена, что особенно выражено на границе с базальным слоем эндометрия (Рис. 4.). За счет развития соединительной ткани глубокий мышечный слой влагалища разделяется на обособленные пучки мышечных волокон. Следует подчеркнуть, что сосуды, в том числе и лимфатические, также подвергаются коллагенизации.

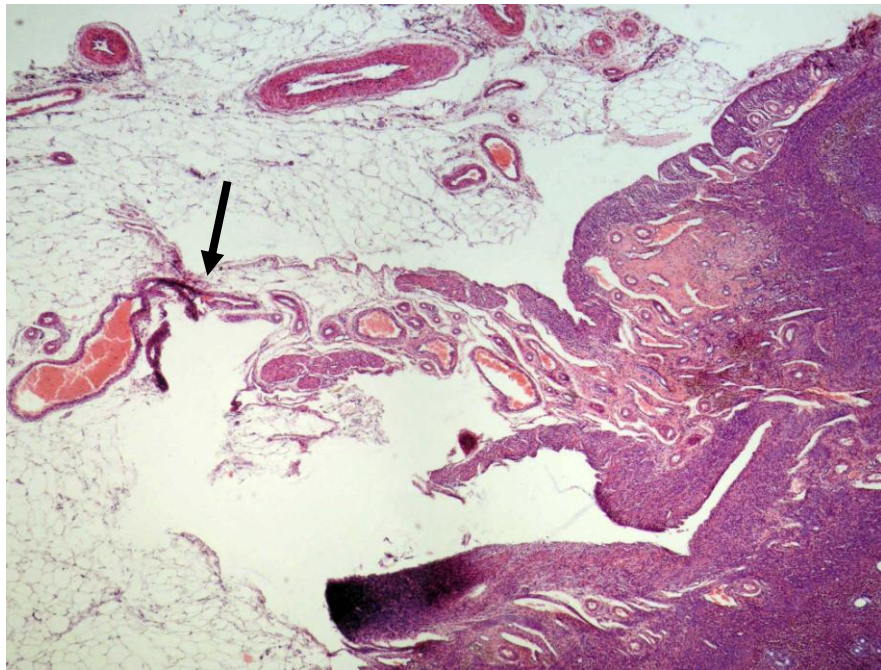


Рис. 3. Микрофотография. Фиброзная спайка (показана стрелкой) имеет хорошо развитую сосудистую сеть, жировую, соединительную ткань и лимфатические протоки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 40.

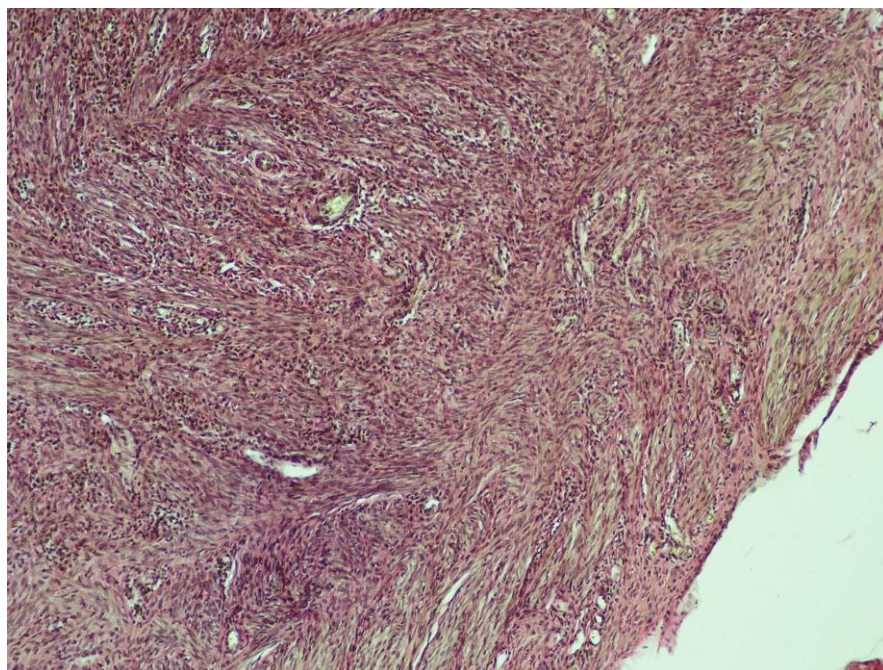


Рис. 4. Микрофотография. Коллагенизация миометрия. Окраска по-ван-Гизон. Ув. 100.

В группе сравнения выраженность лимфоплазмоцитарной инфильтрации оказалась значительно ниже, лейкоцитарная инфильтрация и признаков активного ангиогенеза не определялись.

Обсуждение результатов. Приступая к обсуждению полученных данных, следует обратить внимание на результаты, полученные во II группе крыс, получавших в течение 7 суток аргинин. Предполагалось, что введение крысам субстрата, необходимого для синтеза оксида азота в системе NO-синтаз создаст более благоприятные, чем в группе сравнения, условия для течения репаративных процессов. Истощение эндогенного пула аминокислоты и невозможная утрата NO-синтазами кофактора тетрагидриобиптерина является одной из причин снижения синтеза NO, ведущего к усилению спаечного процесса [14]. Результаты исследований показали, что обогащение рациона питания животных аргинином не оказывает благоприятного влияния на течение репаративных процессов в матке крыс. Напротив, в группе крыс, получавших аргинин, имеет место существенное ухудшение исследуемых показателей, что выражается в усилении лимфоплазмоцитарной и появлении лейкоцитарной инфильтрации, появлении признаков ангиогенеза, формировании спаек. Возможно, причина такой парадоксальной реакции на экзогенный аргинин заключается в особенностях экспрессии различных изоформ NO-синтаз в ранний период после проведения хирургического вмешательства [7]. Возможно происходит усиление экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) на фоне снижения уровня конститутивных изоформ фермента – eNOS и nNOS. Следовательно, на данном этапе течения репаративных процессов iNOS является главным потребителем субстрата – аргинина. Кроме того, фибробласты поддерживают оптимальную концентрацию NO в тканях, как в норме, так и при ишемии, сопутствующей травматическому повреждению органа [7, 14], а тканевых макрофагов участвуют в поддержании внутриорганной продукции NO [11]. При этом, гипоксия тканей способствует резкой активации iNOS-зависимого синтеза оксида азота перитонеальными макрофагами, дополнительно усиливающейся под влиянием некоторых провоспалительных цитокинов. Признавая наличие положительных эффектов усиления локальной продукции молекулы NO, направленной на уменьшение адгезии лейкоцитов и тромбоцитов к эндотелию, а также устранение спазма кровеносных сосудов, необходимо учитывать, что NO – свободный радикал, избыточная продукция которого негативно отражается на состоянии энергетического обмена клетки [8]. Кроме того, резкая стимуляция энзиматической активности iNOS приводит к пропорциональному росту концентрации метаболитов NO во внеклеточной жидкости, в том числе, обладающих прямым цитотоксическим эффектом. Также в условиях ишемии NO активирует катаболизм фактора индуцируемого гипоксией (HIF-1альфа) [10], нарушая механизмы запуска HIF-1альфа-зависимых генетических программ, направленных на адаптацию клеток к условиям дефицита кислорода и избыточной продукции активных форм кислорода [9, 13] .

Анализируя динамику структурных изменений тканей в обеих группах животных, следует признать, что назначение аргинина существенно усиливает признаки воспаления, неоангиогенеза и не препятствует формированию спаек. Это доказывает тот факт, что в тканях экспериментальных животных группы тальк+аргинин обнаруживаются сформированные спайки брюшной полости, а выраженность признаков воспаления и ангиогенеза большая, чем в I группе животных, получивших только тальк. Не вызывает сомнения роль гипоксии в процессах перестройки внутриорганного метаболизма аргинина и мощности синтеза оксида азота. Выработка ряда гуморальных факторов, интенсивность секреции которых резко возрастает в условиях гипоксии, являются мощными индукторами неоангиогенеза [9]. Однако,

патофизиологические механизмы, осуществляющие координацию проангиогенного влияния гуморальных медиаторов воспаления и гипоксии во многом остаются малоизученными. Результаты исследований *in vitro*, позволяют утверждать, что, во-первых, присутствие в инкубационной среде таких провоспалительных цитокинов, как фактор некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа), оказывает дозозависимое влияние на течение процессов миграции и апоптоза эндотелиоцитов, находящихся в условиях продолжительной гипоксии. Во-вторых, формирование интегрального результата комбинированного влияния условий гипоксии и ФНО-альфа, возможно, осуществляется на уровне экспрессии матричных металлопротеиназ (ММР-2 и МТ1-ММР), детерминирующих интенсивность деградации внеклеточного матрикса эндотелиоцитов и их миграцию, а так же апоптоз клеток. На этапе острой фазы воспаления регистрируется локальное усиление продукции ряда физиологически активных веществ, выделяемых нейтрофилами, макрофагами и тучными клетками, способствующих ускорению деградации внеклеточного матрикса эндотелиоцитов, стимулирующих неоваскуляризацию [15]. Также важна роль NO-синтазного звена цикла оксида азота в механизмах неоваскуляризации, возможно, регулируемого через АТ2-субпопуляцию рецепторов к ангиотензину. Некоторые исследователи, обсуждая адаптивную роль продукции оксида азота, констатируют отчетливое положительное влияние секреции молекулы в пределах физиологических уровней, в то время, как избыточное усиление локальной продукции NO, регистрируемое на фоне стимуляции iNOS, является важным патогенетическим механизмом повреждения органа и кровеносных сосудов. Учитывая данные о дозозависимом характере влияния продукции NO на динамику репаративных процессов в поврежденных тканях, уместно напомнить, что мощность синтеза NO существенно различается для конститутивных и индукцибельной изоформ NO-синтаз. Возможно, интенсивность продукции молекулы оксида азота является параметром, объясняющим ключевую роль эндотелиальной NO-синтазы в процессах неоваскуляризации, тогда, как генетически детерминированное отсутствие у животных индукцибельной NO-синтазы не является сдерживающим фактором в стимуляции механизмов образования кровеносных сосудов [12]. Стимуляция iNOS сопровождается ростом метаболитов, которые, в свою очередь, могут вызывать усиление воспалительных реакций через активацию циклооксигеназы-2, а также фиброз органа, вызванный ускорением конверсии латентной формы трансформирующего фактора роста-бета в физиологически активную [4]. Актуальность для гинекологической практики приведенной выше последовательности патофизиологических механизмов, включающих в себя ишемию травмированной ткани, воспалительные реакции, стимуляцию фиброза тканей и неоваскуляризацию, не вызывает сомнений. Результаты собственных наблюдений, указывают, что рацион, обогащенный L-аргинином, повышает интенсивность образования спаек, усиливая, главным образом, воспалительные реакции и процессы неоваскуляризации, сопровождающиеся появлением атипичных форм кровеносных сосудов. Сопоставляя полученные результаты с данными литературы, можно предположить существование следующей цепи событий. Во-первых, на начальных этапах посттравматического формирования спаек происходит резкая стимуляция iNOS и снижение экспрессии и энзиматической активности конститутивных NO-синтаз. Во-вторых, активация iNOS, практически не регистрируемая в норме, влечет за собой рост внутриорганной активности циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), формируя мощный провоспалительный потенциал [7]. Избыток L-аргинина может служить дополнительным фактором, способствующим дальнейшему росту активности iNOS и ЦОГ-2, увеличивая их влияние на течение воспалительных реакций. В-третьих, в патогенезе заболеваний женской репродуктивной сферы дендритные клетки выполняют универсальную функцию связующего звена патофизиологических механизмов воспаления и образования новых кровеносных сосудов, обеспечивая, с одной стороны, формирование очагов хронического воспаления, а, с другой стороны, экспрессируя факторы, необходимые для инициации ангиогенеза [5]. В-четвертых, стремительный рост локальной экспрессии iNOS [7], а так же ЦОГ-2 [14], в сочетании с условиями гипоксии оказывают влияние на функциональную активность фибробластов, ускоряя постхирургическое спайкообразование. Кроме того, нельзя исключить, что избыточная локальная продукция метаболитов оксида азота, спровоцированная активацией iNOS, является самостоятельным патогенетическим фактором усиления спаечного процесса.

Выводы

1. Течение процесса формирования спаек у экспериментальных животных сопровождается воспалением, индукцией ангиогенеза и развитием фиброза матки.
2. Назначение L-аргинин гидрохлорида крысам, подвергавшимся воздействию талька, приводит к усилению в тканях матки воспаления и фиброза.
3. В группе животных, получавших L-аргинин гидрохлорид, происходит существенная активация процессов неоваскуляризации, сопровождающаяся появлением атипичных для матки форм кровеносных сосудов.

Список литературы

1. Бежин А. И. Выбор способа моделирования спаечной болезни / А. И. Бежин, В. А. Липатов, В. В. Григорян // Материалы второй Российской науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы экологии, экспериментальной и клинической медицины» под ред. Ф. С. Авдеева, И. А. Андреева, П. А. Яковлева, 26–27 апреля 2001 г. – г. Орел. – С. 52–53.

2. Горальский Л. П. Основы гистологической техники і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології / Л. П. Горальский, В. Т. Хомич, О. І. Кононський // Навчальний посібник. – Житомир : Полісся. – 2005. – С. 70–71.
3. Binda M.M. Reactive oxygen species and adhesion formation. Clinical implications in adhesion prevention / M.M. Binda, C.R. Molinas, P.R. Koninckx // *Human Reproduction*. - 2003. - Vol. 18, № 12. – P. 2503-2507.
4. Chronic inhibition of NOS-2 ameliorates renal injury, as well as COX-2 and TGF-β1 overexpression in 5/6 nephrectomized rats / P. Bautista-García, L.G. Sánchez-Lozada, M. Cristóbal-García [et al.] // *Nephrology Dialysis Transplantation*. - 2006. - Vol. 21, № 11. - P. 3074-3081.
5. Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis / O. Fainaru, A. Adini, O. Benny et al. // *The FASEB Journal*. - 2008. - Vol. 22. - P. 522-529.
6. Effects of Diazeniumdiolates (NONOates) and Methylene Blue on the Reduction of Postoperative Adhesion in Rats / M. Cetin, B. Duran, N. Demirkoprulu et al. // *Gynecol Obstet Invest.*-2004.-Vol. 57, № 4. - P. 186-190.
7. Hypoxia regulates iNOS expression in human normal peritoneal and adhesion fibroblasts through nuclear factor kappa B activation mechanism / Z. L. Jiang, N. M. Fletcher, M. P. Diamond [et al.] // *Fertility and Sterility* – 2009. – Vol. 91, № 2. – P. 616–621.
8. Hypoxic Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase via Hypoxia Inducible Factor-1 in Cardiac Myocytes / F. Jung, L.A. Palmer, N. Zhou, R.A. Johns // *Circulation Research*. - 2000. - Vol. 86. - P. 319-325.
9. Ke Q. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) / Q. Ke, M. Costa // *Mol. Pharmacol.* -2006.-Vol. 70. - P. 1469-1480.
10. Nitric Oxide Modulates Oxygen Sensing by Hypoxia-inducible Factor 1-dependent Induction of Prolyl Hydroxylase 2 / U. Berchner-Pfannschmidt, H. Yamac, B. Trinidad, J. Fandrey // *J. Biol. Chem.* - 2007. - Vol. 282, №3. - P. 1788-1796.
11. Physiological and hypoxic O₂ tensions rapidly regulate NO production by stimulated macrophages / M. A. Robinson, J. E. Baumgardner, V. P. Good, C. M. Otto // *American journal of physiology. Cell physiology*. – 2008. – Vol. 294. – P. C1079–C1087.
12. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability / D. Fukumura, T. Gohongi, A. Kadambi et al. // *PNAS*. - 2001. - Vol. 98, N 5. - P. 2604-2609.
13. Qutub A.A. Reactive Oxygen Species Regulate Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha Differentially in Cancer and Ischemia / A.A. Qutub, A.S. Popel // *Molecular and Cellular Biology*. - 2008. - Vol. 28, N 16. - P. 5106-5119.
14. Regulation of inducible nitric oxide synthase in post-operative adhesions / G. M. Saed, M. Zhao, M. P. Diamond, H. M. Abu-Soud // *Human Reproduction*. – 2006. –Vol. 21, № 6. – P. 1605–1611.
15. Ribatti D. Nonclassic Endogenous Novel Regulators of Angiogenesis / Ribatti D., Conconi M.T., Nussdorfer G.G. // *Pharmacol. Rev.* - 2007. - Vol. 59. - P. 185-205.
- 16.

Работа поступила в редакцию 28.05.2013 года.

Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования