

КИСЛОРОДНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ, ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ, ВАЗОАКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ЭНДОТЕЛИЯ У КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ ЭНДОТОКСИН И ТАУРИН

Т. С. Милош, Н. Е. Максимович¹

Установлен корригирующий эффект таурина (10 мг/кг, внутримышечно, 7 сут) в отношении нарушений кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния, вазоактивных свойств эндотелия сосудов у беременных крыс в период плацентации после внутримышечного введения липополисахарида *E. coli*.

Ключевые слова: эндотоксин; кислородтранспортная функция; прооксидантно-антиоксидантное состояние; эндотелий; таурин; крысы

ВВЕДЕНИЕ

Сохранение здоровья беременной женщины и обеспечение рождения здорового ребёнка — одна из важнейших задач акушерства. Инфекция во время беременности является актуальной проблемой, что определяется высоким уровнем мертворождаемости и ранней неонатальной смертности при данной патологии, а также большой встречаемостью инфекционно-воспалительных заболеваний беременных и родильниц.

По статистическим данным, показатель перинатальной смертности в Беларуси в 2009 г. составил 4,5‰ (мертворождаемость — 3,3‰), младенческой смертности — 4,7‰, причём доля инфекции среди перинатальных потерь занимает в Беларуси и России 2 – 3-е место [5]. Несмотря на ряд лечебно-профилактических мероприятий, показатель инфекционно-воспалительных заболеваний среди новорожденных за 10-летний период увеличился в 2 раза (с 15,3 до 31‰), а среднегодовые темпы роста составили 2‰ в год [1].

Имеются работы о влиянии липополисахарида (ЛПС) на состояние кислородтранспортной функции крови (КТФК) и прооксидантно-антиоксидантное равновесие у небеременных животных [2]. Ранее установлено наличие изменений прооксидантно-антиоксидантного состояния и КТФК у самок-крыс, получавших ЛПС (или эндотоксин) в период беременности, но эффективные способы их коррекции не разработаны. Не изучено состояние эндотелия и его роль в возникновении нарушений в системе «мать-плод», обусловленных действием бактериальных эндотоксинов. Известно, эндотелий — важный паракринный орган, непрерывно синтезирующий большое количество биологически активных веществ, необходимых для регуляции тонуса сосудов, их проницаемости, гемостаза, ангиогенеза и др. [8].

Согласно данным литературы, аминокислота таурин содержится в больших количествах в головном

мозге, участвуя в его развитии и функционировании, обладает антиоксидантными, детоксикационными, противовоспалительными, антиапоптотическими свойствами, активирует элиминацию ЛПС из организма, уменьшает образование NO и оксидантов в лейкоцитах [12, 15].

Цель исследования — установить характер изменений показателей кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния, вазоактивных свойств эндотелия кровеносных сосудов у крыс в условиях эндотоксинемии и действия таурина во время беременности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 74 беременных крысах массой 200 – 230 г, разделенных на 3 группы. Животных содержали в стандартных условиях, с полноценным пищевым рационом в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Контролировали температурный, световой и шумовой режимы. При выполнении экспериментов руководствовались принципами гуманного отношения к животным и положением комитета по биомедицинской этике УО «Гродненский государственный медицинский университет» по гуманному обращению с экспериментальными животными (приказ ректора от 27.12.2006 г. № 125).

Животным первой опытной группы ($n = 24$) в период плацентации (11-е сутки беременности) внутримышечно вводили эндотоксин граммотрицательных бактерий — ЛПС (*Escherichia coli Serotype O127:B8*, “Sigma”) в дозе 0,4 мг/кг. Крысам второй опытной группы ($n = 25$) наряду с ЛПС внутримышечно вводили аминокислоту таурин в дозе 10 мг/кг, растворенный в 0,5 мл стерильного изотонического раствора NaCl в течение 7 сут ежедневно, начиная с 11-го дня беременности. Крысы контрольной группы ($n = 25$) в аналогичные сроки беременности внутримышечно получали эквивалентное количество изотонического раствора NaCl.

Взятие биологического материала (кровь, плацента, грудная аорта) для исследований осуществляли в условиях наркоза (внутримышечно тиопентал натрия,

¹ Кафедра акушерства и гинекологии, кафедра патологической физиологии им. Д. А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80.

60 мг/кг). Кровь забирали из общей сонной артерии с добавлением гепарина (20 ЕД/мл). Плаценту для хранения замораживали в жидком азоте.

У крыс на 20-е сут беременности на микрогазоанализаторе “Synthesis-15” (Instrumentation Laboratory Company) определяли показатели КТФК артериальной и венозной крови: содержание гемоглобина, кислородную емкость крови (КЕ), количество оксигемоглобина, парциальное давление кислорода (pO_2), степень насыщения крови кислородом (SO_2), содержание кислорода (CO_2). Сродство гемоглобина к кислороду определяли по показателю $p50$ (pO_2 крови при 50 % насыщении ее кислородом) в венозной крови при стандартных условиях рН 7,4, pCO_2 40 мм рт. ст. и температуры 37 °С ($p50_{ст.}$) и при реальных значениях рН, pCO_2 и температуры ($p50_{реал.}$) [14].

Прооксидантно-антиоксидантное состояние оценивали по концентрации в плазме крови и плаценте продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновые конъюгаты (ДК), малоновый диальдегид (МДА) на основании концентрации его комплексов с тиобарбитуровой кислотой на спектрофотометре СФ-46 (Россия) [13], основания Шиффа (ОШ) определяли на спектрофлюориметре F-4010 “Hitachi” (Япония) [10] и показателей антиоксидантной защиты (АОЗ): ретинола и α -токоферола, используя способность соединений флуоресцировать в гексановой среде, на спектрофлюориметре F-4010 фирмы “Hitachi” (Япония) [7], каталазы в плаценте — путем регистрации продукта реакции перекиси водорода с молибденовокислым аммонием на спектрофотометре СФ-46 (Россия) [4].

Состояние эндотелия сосудов оценивали по эндотелий-зависимой дилатации колец аорты на основании определения диаметра колец аорты, предварительно

спазмированных норадреналином (10^{-6} моль) под влиянием ацетилхолина (10^{-5} моль), и эндотелий-независимой дилатации колец аорты под влиянием глицеролтринитрата (10^{-6} моль) [9]. Степень морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов изучали по количеству циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в 1 л плазмы крови [11].

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 6,0 [6]. После проверки данных на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка рассчитывали медиану, межквартильный интервал (25-й и 75-й процентиля). Различия между группами устанавливали с помощью критериев Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что изменения показателей КТФК свидетельствуют об ухудшении кислородного обеспечения организма крыс при беременности, осложненной инфекцией. У беременных самок-крыс, получавших ЛПС, выявлено снижение КЕ в 1,2 раза ($p < 0,001$), CO_2 артериальной крови — в 1,2 раза ($p < 0,05$) и венозной крови — в 1,7 раза ($p < 0,001$), SO_2 артериальной крови — в 1,8 раза ($p < 0,001$) и венозной крови — в 1,6 раза ($p < 0,001$), оксигемоглобин артериальной в 1,8 раза ($p < 0,001$) и венозной — в 1,5 раза ($p < 0,05$), pO_2 артериальной крови — в 2,3 раза ($p < 0,001$) и венозной — в 1,2 раза ($p < 0,05$), повышение $p_{v50_{реал.}}$ — на 12,3 мм рт. ст. ($p < 0,001$) и $p_{v50_{ст.}}$ — на 6,3 мм рт. ст. ($p < 0,001$), что указывает на сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо и уменьшение аффинитета гемоглобина к кислороду (табл. 1).

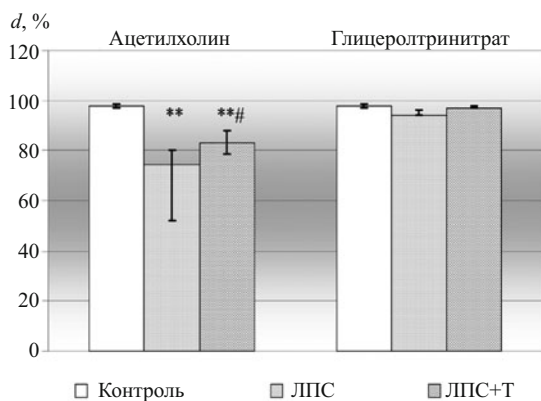
У беременных крыс отмечено увеличение активности ПОЛ на фоне уменьшения АОЗ: выявлено увели-

Таблица 1. Показатели кислородтранспортной функции артериальной и венозной крови беременных крыс после введения липополисахарида и таурина (10 мг/кг, внутримышечно, 7 сут) в период плацентации (Ме, Q25 – Q75)

Группа животных	Кровь	КЕ, об %	CO_2 , об %	SO_2 , %	pO_2 , мм рт. ст.	$p_{v50_{реал.}}$, мм рт. ст.	$p_{v50_{ст.}}$, мм рт. ст.	Hb, г/л	HbO ₂ , %
Контроль	артериальная (n = 9)	16,2 (16,0 ÷ 19,6)	18,3 (17,8 ÷ 18,5)	99,2 (99,0 ÷ 99,6)	100,0 (97,5 ÷ 105,0)	-	-	117,0 (116,0 ÷ 126,0)	96,6 (94,4 ÷ 97,5)
	венозная (n = 8)	-	13,8 (13,0 ÷ 14,1)	57,7 (55,9 ÷ 59,1)	42,0 (40,9 ÷ 43,2)	32,1 (31,4 ÷ 33,9)	29,2 (27,4 ÷ 31,4)	-	52,6 (46,5 ÷ 56,1)
ЛПС	артериальная (n = 11)	13,9 (8,5 ÷ 14,9)**	14,9 (12,6 ÷ 16,0)*	54,7 (45,2 ÷ 62,2)**	43,0 (29,3 ÷ 58,0)**	-	-	112,0 (107,0 ÷ 119,0)	53,8 (44,6 ÷ 76,2)**
	венозная (n = 11)	-	8,1 (7,7 ÷ 8,5)**	36,5 (33,0 ÷ 38,5)**	35,0 (30,0 ÷ 39,0)*	44,4 (41,6 ÷ 48,8)**	35,5 (33,1 ÷ 40,1)**	-	35,3 (32,7 ÷ 39,0)*
ЛПС + Т	артериальная (n = 9)	16,5 (15,3 ÷ 17,4)##	15,5 (15,3 ÷ 16,5)**	97,3 (98,3 ÷ 9,6)##	96,0 (82,0 ÷ 108,0)##	-	-	117,0 (116,0 ÷ 122,0)#	93,6 (93,1 ÷ 95,8)##
	венозная (n = 7)	-	12,1 (10,3 ÷ 12,4)##	63,0 (59,6 ÷ 69,6)##	46,0 (41,0 ÷ 49,5)#	35,9 (35,9 ÷ 36,0)*#	32,6 (31,9 ÷ 33,9)*#	-	48,5 (47,0 ÷ 54,4)#

Примечание. ЛПС — липополисахарид, Т — таурин, КЕ — кислородная ёмкость крови, CO_2 — содержание кислорода в крови в объёмных %, SO_2 — степень насыщения крови кислородом, pO_2 — парциальное давление кислорода, $p_{v50_{реал.}}$ — показатель полунасыщения крови кислородом при реальном рН венозной крови, $p_{v50_{ст.}}$ — показатель полунасыщения крови кислородом при стандартном рН венозной крови, Hb — содержание гемоглобина, HbO₂ — содержание оксигемоглобина.

Различия статистически значимы между показателями: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$ — опытной и контрольной групп, # — $p < 0,05$, ## — $p < 0,001$ — опытных групп.



Эндотелий-зависимые и эндотелий-независимые вазоактивные реакции колец аорты беременных крыс после введения липополисахарида (ЛПС) и таурина (Т) в период плацентации.

Ме (25-й; 75-й процентиля) — диаметр колец аорты крыс, предварительно спазмированных норадrenalином (10^{-6} моль), после добавления ацетилхолина (10^{-5} моль) и глицеролтринитрата (10^{-6} моль).

чение концентрации ДК в плазме крови крыс на 91 % ($p < 0,001$), в плаценте — на 67 % ($p < 0,001$), МДА в плазме крови — на 56 % ($p < 0,001$), в плаценте — в 3 раза ($p < 0,05$), ОШ в плазме крови — на 7,9 % ($p < 0,05$), в плаценте — на 45 % ($p < 0,001$) (табл. 2).

Наряду с этим установлено изменение концентрации показателей АОЗ: снижение концентрации ретинола в плазме крови — на 29 % ($p < 0,05$), в плаценте — на 39 % ($p < 0,001$), α -токоферол в плазме крови — на 6 % ($p < 0,001$) наряду с повышением активности каталазы в плаценте почти в 3 раза ($p < 0,001$).

Диаметр колец аорты, предварительно спазмированных норадrenalином (10^{-6} моль), после добавления эндотелий-зависимого дилататора ацетилхолина (10^{-5} моль) у крыс первой опытной группы оказался существенно меньше, чем в контроле (97,8

(96,9 ÷ 98,6) %, составив 74,3 (52,0 ÷ 80,0) % от исходного уровня ($p < 0,001$). При этом эндотелий-независимые вазодилаторные реакции у крыс, получавших эндотоксин, определяемые добавлением глицеролтринитрата (10^{-6} моль), нарушены не были ($p > 0,05$), рисунок.

Изучение степени десквамации эндотелия кровеносных сосудов, на основании количества ЦЭК, выявило наличие морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов у крыс, получавших в период беременности ЛПС. Количество ЦЭК в плазме крови крыс 1-й опытной группы составило 82,5 ($46,0 \div 115,0$) · $10^4/\text{л}$ ($n = 22$, $p < 0,001$), в то время как в контроле значение этого показателя составило 4,5 ($2,5 \div 5,0$) · $10^4/\text{л}$ ($n = 8$).

У крыс, получавших ЛПС и таурин в период плацентации, отмечали уменьшение выраженности патогенных эффектов ЭТ на показатели КТФК беременных крыс: повышение CO_2 в артериальной крови в 1,2 раза ($p < 0,001$) и в венозной крови — в 1,1 раза ($p < 0,05$), снижение $p_{50\text{реал}}$ в венозной крови до 35,9 ($35,9 \div 36,0$) мм рт. ст. ($p < 0,05$) и $p_{50\text{ст}}$ до 32,6 ($31,9 \div 33,9$) мм рт. ст. ($p < 0,05$), что отражает сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево и повышение аффинитета гемоглобина к кислороду, по сравнению с изменением показателей у крыс, получавших эндотоксин без таурина.

Использование таурина уменьшило активность окислительного стресса, что выражалось в снижении уровня ДК в плазме крови на 62 % ($p < 0,001$) и в плаценте — на 70 % ($p < 0,05$), МДА в плазме крови — на 18 % ($p < 0,05$), в плаценте — на 23 % ($p < 0,05$), ОШ в плазме крови на 4,9 % ($p < 0,05$), в плаценте — на 14,5 % ($p < 0,001$), в сравнении с первой опытной группой.

Таблица 2. Влияние таурина (10 мг/кг, внутримышечно, 7 сут) на содержание диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, оснований Шиффа, ретинола, α -токоферола в плазме крови беременных крыс после введения липополисахарида (Ме, Q25 ÷ Q75)

Показатель	Единицы	Объект исследования	Группы животных		
			Контроль	ЛПС	ЛПС + Т
ДК	$\Delta D_{233}/\text{мл}$	плазма	1,1 (0,9 ÷ 1,5)	2,1 (1,5 ÷ 2,3)**	0,8 (0,6 ÷ 1,2)##
	$\Delta D_{233}/\text{мг}$	плацента	7,2 (5,4 ÷ 8,0)	12,0 (11,0 ÷ 12,7)**	3,6 (3,4 ÷ 5,6)**#
МДА	мкмоль/л	плазма	1,8 (1,1 ÷ 2,0)	2,8 (2,2 ÷ 3,6)**	2,3 (2,0 ÷ 2,4)**#
	нмоль/г	плацента	4,2 (2,9 ÷ 9,2)	12,8 (12,0 ÷ 15,8)*	9,8 (8,4 ÷ 10,7)*#
ОШ	ЕД/мл	плазма	137,3 (129,6 ÷ 140,9)	148,1 (142,1 ÷ 156,7)*	140,8 (125,5 ÷ 145,7)#
	ЕД/мг	плацента	94,4 (79,9 ÷ 106,7)	137,2 (130,0 ÷ 142,0)**	117,3 (101,5 ÷ 119,3)##
Ретинол	мкмоль/л	плазма	5,2 (3,6 ÷ 6,3)	3,7 (3,1 ÷ 3,9)*	4,7 (4,4 ÷ 5,5)##
	мкмоль/г	плацента	82,0 (80,5 ÷ 87,7)	50,2 (49,8 ÷ 69,5)**	79,2 (66,6 ÷ 82,0)#
α -Токоферол	мкмоль/л	плазма	24,8 (24,3 ÷ 25,4)	23,2 (22,1 ÷ 23,8)**	24,8 (23,9 ÷ 25,2)##
	нмоль/г	плацента	127,0 (125,0 ÷ 131,3)	126,0 (122,5 ÷ 130,3)	249,9 (167,9 ÷ 286,7)*#
Каталаза	ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{с} \cdot \text{г}$ белка	плацента	0,5 (0,2 ÷ 0,6)	1,3 (1,2 ÷ 1,4)**	0,6 (0,6 ÷ 0,8)#

Примечание. ЛПС — липополисахарид, Т — таурин, ДК — диеновые конъюгаты, МДА — малоновый диальдегид, ОШ — основания Шиффа.

* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$ — различия статистически значимы между показателями опытной и контрольной групп.

— $p < 0,05$, ## — $p < 0,001$ — различия статистически значимы между показателями опытных групп.

Наряду с этим в группе крыс с введением ЛПС и таурина установлено повышение АОЗ: увеличение концентрации ретинола в плазме крови на 27 % ($p < 0,001$), в плаценте — на 58 % ($p < 0,05$), α -токоферол в плазме крови — на 6,9 % ($p < 0,001$), в плаценте — на 98 % ($p < 0,05$), а также снижение активности каталазы в плаценте на 54 % ($p < 0,05$), по сравнению с показателями в группе крыс, получавших ЛПС.

Характер изменений показателей ПОЛ и АОЗ в плазме крови и в плаценте крыс, получавших таурин, свидетельствует о способности этой аминокислоты уменьшать выраженность нарушений прооксидантно-антиоксидантного состояния, вызванных действием бактериального эндотоксина.

У крыс, получавших эндотоксин и таурин (70 мг/кг), наблюдали увеличение диаметра колец аорты под действием эндотелий зависимого действия ацетилхолина до 83 (78,5 \pm 88,0) % ($p < 0,05$), по сравнению с его значением в первой опытной группе, в контроле до 97,8 (96,9 \pm 98,6) % ($p < 0,001$), что отражает улучшение функционального состояния сосудистого эндотелия.

Таурин не влияет на эндотелий независимую дилатацию колец аорты. Диаметр колец аорты самок-крыс этой группы составил 97 (97,0 \pm 98,0) %, $p > 0,05$, что указывает на отсутствие нарушений гуанилатциклазного механизма вазодилатации в условиях введения ЛПС препарата и таурина. Также у крыс этой группы отмечено уменьшение выраженности десквамации эндотелия кровеносных сосудов, оцениваемой по количеству ЦЭК в плазме крови, на 76 % ($p < 0,001$), по сравнению с их количеством в плазме крови у крыс, получавших только ЛПС.

Проведенными исследованиями на экспериментальных животных установлено ухудшение кислородтранспортной функции крови, возникновение окислительного стресса, а также нарушение вазоактивных свойств эндотелия кровеносных сосудов у крыс в условиях эндотоксемии. Таурин оказал корректирующее действие на перечисленные показатели, которое может быть обусловлено наличием у него антиоксидантных свойств. Предполагается, что использование таурина в период беременности позволит уменьшить нарушения развития у потомства при беременности, осложненной действием бактериальных эндотоксинов.

ВЫВОДЫ

1. Эндотоксин у беременных крыс вызывает снижение кислородтранспортной функции крови в 1,2–2,3 раза ($p < 0,05$), активацию перекисного окисления липидов (увеличение в плазме крови концентрации диеновых конъюгатов на 91 %, $p < 0,001$, малонового диальдегида — на 56 %, $p < 0,001$) и нарушение вазодилаторных реакций эндотелия сосудов.

2. Таурин (10 мг/кг, внутримышечно, 7 сут) оказал корректирующий эффект на состояние кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного равновесия у крыс в период плацентации на фоне введения бактериального эндотоксина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. В. Гнедько, Н. Г. Капура, О. Н. Гриценко, *Безопасное материнство в XXI веке: сборник материалов VIII съезда акушеров-гинекологов и неонатологов республики Беларусь*, (Витебск) (2007), сс. 481 – 483.
2. В. В. Зинчук, А. Н. Глебов, *Журн. ГрГМУ*, № 1, 139 – 142 (2007).
3. В. С. Камышников, *Методы клинических лабораторных исследований*, Белорусская наука, Минск (2002).
4. М. А. Корольок, *Лаб. дело*, № 1, 16 – 19 (1988).
5. Н. В. Орджоникидзе, Е. К. Ушницкая, *Акуш. и гин.*, № 5, 12 – 14 (2008).
6. О. Ю. Реброва, *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA*, Медиа Сфера, Москва (2003).
7. Р. Ч. Черняускене, З. З. Варшкявичене, П. С. Грибаускас, *Лаб. дело*, № 6, 362 – 365 (1984).
8. В. И. Шебеко, Ю. Я. Родионов, *Мед. новости*, № 11, 12 – 17 (1997).
9. S. Chlopicki, R. J. Gryglewski, *J. Physiol. Pharmacol.*, **43**(4), 353 – 365 (1992).
10. B. L. Fletcher, C. J. Dillard, A. L. Tappel, *Anal. Biochem.*, **52**(1), 1 – 9 (1973).
11. J. Hladovec, P. Rossman, *Thromb. Res.*, **3**(5), 663 – 674 (1973).
12. E. Park, M. R. Quinn, C. E. Wright, G. Schuller-Levis, *J. Leukoc. Biol.*, **54**(2), 119 – 124 (1993).
13. C. A. Rice-Evans, A. T. Diplock, M. C. R. Symons, *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research*, Elsevier, Elsevier Amsterdam-London-New York-Tokyo (1991).
14. P. Scheid, M. Meyer, *J. Appl. Physiol.*, **45**(5), 616 – 622 (1978).
15. P. P. Stapleton, H. P. Redmond, D. J. Bouchier-Hayes, *J. Leukoc-Biol.*, **61**(2), 231 – 232 (1997).

Поступила 13.08.13

BLOOD OXYGEN TRANSPORT, PROOXIDANT – ANTIOXIDANT STATUS, AND VASOACTIVE CHARACTERISTICS OF VASCULAR ENDOTHELIUM IN RATS TREATED WITH ENDOTOXIN AND TAURINE

T. S. Milosh and N. E. Maksimovich

Grodno State Medical University, ul. Gor'kogo 80, Grodno, 230009, Belarus

Experiments on a group of 74 pregnant rats upon intramuscular introduction of *E. coli* lipopolysaccharides during pregnancy revealed the correction effect of taurine on the blood oxygen transport function, prooxidant – antioxidant status, and vasoactive characteristics of vascular endothelium.

Keywords: endotoxin; oxygen transport function; prooxidant – antioxidant status; endothelium; taurine; rats