

ЭФФЕКТ ТАУРИНА НА СОСТОЯНИЕ ПОТОМСТВА, ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ, ПРОДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В опытах на 97 беременных крысах с эндотоксемией установлен корригирующий эффект таурина по отношению к окислительному стрессу, продукции оксида азота у беременных самок крыс, физическому развитию, созреванию нервных процессов и показателей крови потомства.

Ключевые слова: беременность, эндотоксин, физическое развитие, оксид азота, окислительный стресс, таурин.

T. Milosh, N. Maksimovich

EFFECT OF TAURINE ON CONDITION OF DESCENDANTS, OXIDATIVE PROCESS, NITRIC OXIDE PRODUCTION OF PREGNANCY RATS IN ENDOTOXAEMIA

On 97 pregnancy rats with endotoxaemia correcting effect of taurine arrange participation oxidative stress, nitric oxide, the disturbances of physical development, blood parameters and development of nervous system.

Key words: pregnancy, endotoxin, established physical development, nitric oxide, oxidative stress, taurine.

Инфекция занимает в акушерской практике одно из ведущих мест в перинатальной патологии, являясь причиной различных нарушений у плода и новорожденного. Ее доля среди причин перинатальной патологии составляет от 6% до 58%, достигая среди недоношенных детей 70% [4].

В Республике Беларусь внутриутробная инфекция плода занимает третье место среди причин перинатальной смертности, ее доля в структуре неонатальной смертности в последние годы возросла до 24,6%.

С проявлениями внутриутробной инфекции рождается от 10 до 53% детей, ее последствия имеют большую медицинскую и социальную значимость. Дети с внутриутробным инфицированием сложнее адаптируются к условиям внеутробной жизни, у них развивается разнообразная соматическая патология, довольно широко встречаются нарушения со стороны нервной системы. Длительное действие повреждающего фактора в период антенатального развития ведет к срыву механизмов адаптации новорожденного и истощению ее

функциональных резервов.

Инфекционные агенты способствуют развитию деструктивного воспалительного процесса в различных органах плода, изменению их структуры, тератогенному воздействию с формированием стойких структурных нарушений в виде пороков развития.

В последние годы изменилась структура инфекционной заболеваемости беременных, плода и новорожденного, резко возросла роль условно-патогенных микроорганизмов, в том числе грамотрицательных микроорганизмов, а также возбудителей заболеваний, передаваемых половым путем, грибов. Как известно, многие из патогенных эффектов грамотрицательных микроорганизмов на развивающийся плод обусловлены действием их липополисахаридных (ЛПС) компонентов или эндотоксинов. Патогенез нарушений у плода при беременности, осложненной инфекцией, обусловлен как непосредственно действием токсических факторов микроорганизмов, так и возникновением иммунного конфликта между организмами матери и плода, образованием повреждающих цитокинов и др.

На основании данных литературы и собственных исследований установлено, что патогенез нарушений у плодов при инфицировании во время беременности обусловлен участием окислительного стресса, а также связан с гиперпродукцией оксида азота (NO) [5].

Поиск корректоров привёл к аминокислоте таурин, которая содержится в больших количествах в нервной ткани и участвует в развитии и функционировании мозга [8]. Основными биологическими свойствами этой аминокислоты являются нейромодуляция (агонист ГАМК и глицина), стабилизация нейрональных и синаптических мембран, влияние на распределение вне- и внутриклеточных потоков ионов кальция, осморегуляция, участие в конъюгации ретиноидов и ксенобиотиков, антиоксидантное действие. Также таурин участвует в регуляции секреции гормонов, ГАМК и ацетилхолина, активирует дофаминовую и серотониновую системы, фагоцитоз, имеются данные о его способности активировать элиминацию ЛПС из организма.

По данным литературы, концентрация таурина в плаценте у новорожденных детей с гипотрофией снижена. Это свидетельствует о возможном дефиците таурина при инфицировании во время беременности вследствие высокой потребности в этой аминокислоте.

Имеются данные, что соединение таурина — хлорамин таурина, образующийся в лейкоцитах, способно ингибировать индуцируемую изоформу NO-синтазы и тем самым снижать продукцию оксида азота. In vitro показано, что таурохламин связывает сильный оксидант-гипохлорную кислоту, которая вызывает повреждение ДНК. Отмечено благоприятное использование «Тауфона» (4% раствор таурина) при его субконъюнктивальном введении во время беременности, при задержке внутриутробного развития плода.

Предполагается, что введение в организм беременных самок крыс аминокислоты таурин, обладающей нейтрализующим действием в отношении активных форм кислорода, может быть использовано для предотвращения в организме плода повреждений, вызываемых инфекционным агентом.

Целью исследований явилось изучение состояния потомства, окислительных процессов, продукции оксида азота у беременных самок крыс при эндотоксинемии и введении таурина.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 97 белых беспородных беременных крысах массой 200-230 г, разделенных на 3 группы (2 опытных и контрольная). Выявление беременных крыс осуществляли по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке (1-й день беременности).

Животным первой опытной группы (n=31) внутримышечно вводили эндотоксин грамотрицательных бактерий-липополисахарид (ЛПС) E. Coli «Sigma» в дозе 0,4 мг/кг на 11-14 сутки беременности (период плацентации). Крысам второй опытной группы (n=34) наряду с ЛПС внутримышечно вводили аминокислоту таурин в дозе 10 мг/кг в течение 7 суток ежедневно, начиная с 11-го дня беременности. Крысы контрольной группы (n=32) в аналогичные сроки беременности внутримышечно получали эквивалентное количество изотонического раствора NaCl.

У 21 крысы (14 крыс опытных и 7 крыс контрольной группы) оценивали прибавку веса за период беременности (с 1-х по 20-е сутки) и у 109 крысят опытной и 44 крысят контрольной групп изучали состояние потомства (количество крысят в помете, вес одного крысенка), а также оценивали некоторые по-

Таблица 1. Масса тела (г) крысят в постнатальном периоде развития рожденных самками крыс, получавшими липополисахарид (ЛПС), а также совместно ЛПС и таурин в период беременности (M±m).

Сутки	Группы животных		
	Контроль (n=14)	ЛПС (n=28)	ЛПС + таурин (n=11)
0 сут.	6,1±0,07	5,1±0,13**	6,2±0,12**
2 сут.	7,1±0,11	5,6±0,22**	7,0±0,32**
5 сут.	9,2±0,33	7,6±0,11**	9,0±0,33**
7 сут.	11,6±0,79	7,4±0,19**	14,1±1,31**
12 сут.	22,5±0,41	16,5±1,10**	20,9±0,34*
20 сут.	34,9±2,31	20,3±1,32**	35,7±1,87**

Примечание: * - p<0,05, ** - p<0,001 - различия достоверны между показателями опытных и контрольной групп; # - p<0,05, ## - p<0,001 - различия достоверны между показателями опытных групп.

казатели физического развития (прирост массы тела, сроки отлипания ушей, появления шерсти, прорезывания резцов, открытия глаз), созревание сенсорно-двигательных рефлексов (переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, избегание обрыва, маятниковый рефлекс, поднятие головы и передних лап, ползание, опора на задние конечности, подъем всего тела, двигательная активность, реакция на акустический стимул, обонятельная реакция, мышечная сила) и координацию движения (переворачивание в воздухе, удержание на вращающемся цилиндре, спонтанная двигательная активность) [1].

У новорожденных крысят (n=39) определяли содержание эритроцитов и гемоглобина в единице объема крови на 1-е, 5-е, 12-е сутки постнатального развития. Подсчет содержания эритроцитов осуществляли в сетке Горяева общепринятым методом, определение гемоглобина — фотометрически на КФК-3 гемоглобинцианидным методом с использованием трансформирующего раствора и калибровочной кривой.

Взятие материала (крови и плаценты) для исследований осуществляли в условиях наркоза (внутримышечно тиопентал натрия, 40-60 мг/кг). Плазму крови получали путем центрифугирования крови, забранной из общей сонной артерии с добавлением гепарина (20 ЕД/мл), при 3000 об/мин в течение 20 минут.

У самок крыс определяли продукцию оксида азота и активность окислительных процессов. Изучение продукции оксида азота в организме 74 беременных самок крыс (24 крыс 1-й опытной, 25 крыс 2-й опытной группы и 25 крыс контрольной группы) производили общепринятым фотометрическим методом на основании определения уровня нитритов и нитратов в плазме крови с помощью реактива Грисса и кадмия на фотометре КФК-3 при λ=525 нм [7].

Активность окислительных процессов в организме беременных крыс, получавших ЛПС, оценивали по степени перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровню показателей антиоксидантной защиты (АОЗ) в плазме крови 76 крыс (24 крыс 1-й опытной, 27 крыс 2-й опытной группы и 25 крыс контрольной группы) и плацентах 31-й (10 крыс 1-й опытной, 8 крыс 2-й опытной группы и 13 крыс контрольной группы) крысы.

Определение активности перекисного окисления липидов осуществляли спектрофотометрически (СА-46, ЛОМО, Россия) по концентрации диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), оснований Шиффа (ОШ).

Содержание ДК определяли по интенсивности УФ-поглощения конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов при длине волны 232-234 нм [3]. Определение МДА оценивали по образованию с тиобарбитуровой кислотой окрашенных продуктов на спектрофотометре [9, 10]. Уровень ОШ определяли на спектрофотометре фирмы «Hitachi» по интенсивности флуоресценции хлороформного экстракта при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 нм и 440 нм соответственно [10].

Состояние антиоксидантной защиты в плазме крови оценивали по концентрации ретинола и α-токоферола, а в плаценте ретинола, α-токоферола и каталазы на спектрофлуориметре «F-4010» фирмы «Hitachi».

Содержание ретинола (витамин А) определяли по интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения 335 нм и длине волны флуоресценции (эмиссии) 460 нм. Уровень α-токоферола (витамин Е) оценивали по интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 335 нм и длине волны флуоресценции (эмиссии) 460 нм. Уровень β-токоферола (витамин В) оценивали по интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 335 нм и длине волны флуоресценции (эмиссии) 460 нм.

Примечание: * - p<0,05, ** - p<0,001 - различия между показателями опытной и контрольной групп; # - p<0,05, ## - p<0,001 - различия между показателями опытных групп.

Таблица 2. Содержание эритроцитов (Эр) и гемоглобина (Hb) в крови потомства крыс, получавших липополисахарид (ЛПС) и липополисахарид с таурином (M±m).

Показатели	Группы животных		
	Контроль (n=18)	ЛПС (n=12)	ЛПС + таурин (n=9)
0-е сутки			
Эр (x10 ¹² /л)	2,8±0,10	1,6±0,11**	2,4±0,03*
Hb (г/л)	124±4,3	102±7,0*	124±1,6*
5-е сутки			
Эр (x10 ¹² /л)	2,4±0,10	1,8±0,11**	2,4±0,11*
Hb (г/л)	116±4,9	83±3,0**	112±3,8**
12-е сутки			
Эр (x10 ¹² /л)	2,8±0,10	2,3±0,10**	2,9±0,13*
Hb (г/л)	124±2,8	84±2,8**	117±1,3**

Оригинальная статья

ресценции гексанового экстракта при длинах волн возбуждения и флуоресценции 292 нм и 325 нм соответственно [6]. Активность каталазы определяли колориметрическим методом, основанном на реакции солей молибдена с перекисью водорода, генерируемой каталазой [2].

Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

У крыс с введением ЛПС и таурина отмечали более высокую прибавку массы тела за период беременности, чем у крыс, получавших ЛПС. Прирост массы тела беременных крыс, получавших ЛПС, составил $85,7 \pm 2,54$ г ($n=7$, $p<0,001$), в контроле $106,4 \pm 3,89$ г ($n=7$), а у крыс, получавших ЛПС и таурин, отмечалось повышение прибавки веса до $106,3 \pm 3,40$ г ($n=7$, $p<0,001$), что выше, по сравнению с первой опытной группой, и не отличалось от прироста массы тела беременных крыс контрольной группы ($p>0,05$).

В помете крыс, получавших ЛПС, количество крысят составило $8 \pm 0,6$ ($n=8$, $p<0,001$), что меньше, чем в контрольной группе ($11 \pm 0,4$, $n=8$), а у крыс, получавших ЛПС и таурин $10 \pm 0,5$ ($n=8$, $p<0,05$), что также не отличалось от данного показателя в контроле ($p>0,05$).

Масса тела новорожденных крысят 1-й опытной группы (с введением ЛПС) оказалась меньше, чем в контроле ($p<0,001$) (табл. 1). Потомство, рожденное крысами, получавшими ЛПС, отставало в прибавке веса во все изучаемые сроки постнатального периода. У крысят, рожденных крысами, получавшими ЛПС и таурин, отставание в приросте массы тела от крысят контрольной группы отмечалось только до 7-х суток постнатального периода, по сравнению с потомством крыс первой опытной группы с введением ЛПС.

Сроки появления показателей, характеризующих физическое развитие крысят, в 1-й опытной группе также запаздывали. Отлипания ушей отмечалось на 4-е сутки постнатального периода (в контрольной группе — на 2-е сутки), появление шерсти на 7-е сутки (в контроле на 5-е сутки), прорезывание резцов — на 11-е сутки (в контрольной группе — на 8-е сутки), открытие глаз — на 17-е сутки (в контрольной группе — на 14-е сутки). Также у потомства крыс, получавших ЛПС, выявлено отставание созревания сенсорно — двигательных рефлексов и координации движений в период вскармливания на 3-4 суток от аналогичных показателей у крысят контрольной группы. Сроки же появления этих признаков у потомства крыс, получавших ЛПС и таурин, не отличались от времени их появления в контрольной группе.

Изучение содержания эритроцитов и гемоглобина в единице объема крови у крысят опытной группы с введением ЛПС выявило развитие анемии в постнатальном периоде (табл. 2).

Видно, что у новорожденных крысят, рожденных крысами с введением ЛПС, содержание эритроцитов и гемоглобина в единице объема крови было ниже, по сравнению со значениями этих показателей в контроле, во все исследуемые сроки постнатального периода. У крысят же, рожденных крысами с введением ЛПС и таурина, содержание эритроцитов в единице объема крови было более низким до 5-х суток жизни с исчезновением различий к 12 суткам и было выше, чем у крысят группы крыс с введением ЛПС. Содержание гемоглобина в единице объема крови у крысят 2-й опытной группы было выше, чем у крысят с введением ЛПС, во все исследуемые сроки и не отличалось от данного показателя в контрольной группе. Из полученных результатов следует, что введение таурина способствует нормализации показателей эритроцитов и гемоглобина во все исследуемые сроки.

Установлено повышение содержания нитритов и нитратов в плазме крови крыс, получавших ЛПС до $99,5 \pm 4,7$ мкМ/л ($n=24$, $p<0,001$), в контроле — этот показатель составил $33,5 \pm 2,9$ мкМ/л ($n=25$), что свидетельствует о повышении продукции NO в организме самок крыс при эндотоксинемии и возможном участии NO — зависимых механизмов в патогенезе нарушений, возникающих у потомства крыс с введением эндотоксина (табл. 3). В группе крыс, получавших таурин, наблюдали снижение концентрации нитритов и нитратов до $55,6 \pm 5,6$ мкМ/л ($n=25$), по сравнению с первой опытной группой ($p<0,001$), что свидетельствует о способности таурина корректировать содержа-

Таблица 3. Содержание нитритов и нитратов (NO₂), диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), оснований Шиффа (ОШ), ретинола, α-токоферола и каталазы в плазме крови и плацентах беременных крыс после введения липополисахарида (ЛПС), а также совместно ЛПС и таурина (M±m).

Показатели	Объект исследования	Группа животных		
		Контроль	ЛПС	ЛПС + таурин
NO (мМ/л)	плазма	33,5±2,9	99,5±4,7**	55,6±5,6**
	плацента	1,2±0,1	2,1±0,13**	0,95±0,12**
ДК (Д ₂₃₂ ЕД/мл)	плазма	6,8±0,61	11,6±0,65**	4,1±0,74**
	плацента	1,6±0,10	2,9±0,22**	2,3±0,07**
МДА (мкМ/л)	плазма	5,6±1,19	13,4±0,92*	9,5±0,7**
	плацента	137,8±3,1	148,5±2,26*	137,9±2,67*
ОШ (ЕД/мл)	плазма	94,4±4,46	136,2±1,88*	110,5±4,3*
	плацента	4,9±0,31	3,6±0,17*	5,0±0,19**
Ретинол (мМ/л)	плазма	83,0±3,17	57,1±3,6*	83,0±11,83*
	плацента	24,8±0,13	22,1±0,65**	24,8±0,23**
α-токоферол (мкМ/л)	плазма	142,0±12,88	126,6±2,12	234,2±22,03**
	плацента	0,5±0,06	1,6±0,3*	0,7±0,07*

Примечание: * - $p<0,05$, ** - $p<0,001$ - различия между показателями опытной и контрольной групп; - # - $p<0,05$, ## - $p<0,001$ - различия между показателями опытных групп.

ние NO либо в результате его непосредственного нейтрализующего действия, либо вследствие ингибирования NO — синтазы.

При изучении динамики показателей, характеризующих прооксидантно-антиоксидантное состояние, в организме беременных самок крыс, получавших ЛПС, выявлено увеличение активности перекисного окисления липидов на фоне уменьшения антиоксидантной защиты (табл. 3). Это проявлялось повышением содержания концентрации диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, оснований Шиффа, а также уменьшением уровня ретинола и α-токоферола, как в плазме, так и в плаценте. Также отмечено повышение в плаценте активности каталазы, как следствие активации у беременных самок крыс окислительных процессов при эндотоксинемии. У крыс, получавших наряду с ЛПС таурин, отмечали уменьшение концентрации продуктов перекисного окисления липидов и повышение уровня антиоксидантной защиты, причем уровень показателей АОЗ, за исключением МДА и α-токоферола, в плазме крови и ретинола в плаценте не отличался от значений в контроле.

Выводы

1. Комплекс проведенных исследований по изучению развития потомства крыс с введением ЛПС, выявил снижение содержания эритроцитов и гемоглобина в единице объема крови, а также увеличение продукции оксида азота, активности окислительных процессов у беременных крыс, что указывает на то, что генез нарушений развития потомства крыс с эндотоксинемией в постнатальном периоде опосредован повышенной продукцией оксида азота и активацией окислительных процессов в организме матери.

2. Учитывая, что ЛПС — один из основных компонентов грамотрицательных бактерий, очевидно, что окислительный стресс и эндотоксинемия участвуют в патогенезе нарушений при инфицировании во время беременности.

3. Введение аминокислоты таурин беременным крысам, получавшим ЛПС, приводит к нормализации нарушений в системе «мать-плод»: уменьшению отставания физического развития потомства, снижению выраженности анемии в постнатальном периоде, что может быть обусловлено нормализацией продукции NO и уменьшением активности окислительных процессов.

Литература

- Буреш, Я. Методики и основание эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. М. Хьюстон // М.: Высш. шк., 1991. 400 с.
- Королюк, М. А. Метод определения каталазы / М. А. Королюк [и др.] // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16 — 19.
- Кослюк, В. А. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / В. А. Кослюк, А. И. Потапович, Е. Ф. Лунец // Вопросы мед. химии. 1984. № 4. С. 125 — 127.
- Линева, О. И. Морфологические критерии прогнозирования реализации внутриутробной инфекции у новорожденного / О. И. Линева [и др.] //

Оригинальная статья

Акушерство и гинекология. 2004. № 3. С. 23 – 26.

5. Милош, Т. С. NO-зависимые механизмы дисфункции эндотелия – фактор патогенеза нарушений у потомства при экспериментальном введении липополисахарида / Т. С. Милош, Н. Е. Максимович // Медицинский журнал. 2007. С. 78 – 80.

6. Черняускене, Р. Ч. Одновременное флюориметрическое определение концентраций витаминов Е и А в сыворотке крови / Р. Ч. Черняускене, З. З. Варшкявичене, П. С. Грибаускас // Лабораторное дело. 1984. Т. 6. С. 362 – 365.

7. Granger, D. N. Nitric oxide as antiinflammatory agent / D. N. Granger, P. Kubes // Methods in Enzymology. 1996. V. 269. P. 434 – 442.

8. Lourenco, R. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An over-

view in health and disease / R. Lourenco, M. E. Camilo // Nutr. Hosp. 2002. 17(6). P. 262 – 70.

9. Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, M. Uchiyama // Anal. Biochem. 1978. V. 86. (1). P. 271 – 278.

10. Rice-Evans, C. A. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research / C. A. Rice-Evans, A. T. Diplock, M. C. R. Symons // Elsevier. 1991. Elsevier Amsterdam-London-New York. Tokyo. P. 291.

Работа выполнена

при поддержке гранта БРФФИ № Б06М-083.