

Состояние потомства, эндотелия кровеносных сосудов и уровень метаболитов оксида азота у крыс при введении липополисахарида и таурина в период беременности

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В экспериментах на 74 беременных крысах с внутримышечным введением липополисахарида *E. Coli* «Sigma» в период беременности и на 192 крысятах установлены корригирующие свойства таурина в отношении дисфункции эндотелия, уровня оксида азота у беременных самок крыс, физического развития потомства.

Ключевые слова: беременность, липополисахарид, физическое развитие, дисфункция эндотелия, оксид азота, таурин.

T. Milosh, N. Maksimovich

CONDITION OF DESCENDANTS, ENDOTHELIUM DYSFUNCTION AND PRODUCTION OF NITRIC OXIDE AT PREGNANCY RATS WITH INTRODUCTION LIPOPOLYSACCHARIDE AND TAURINE

Grodno medical university

On 74 pregnancy rats with intramuscular introduction of *E. Coli* lipopolysaccharides, «Sigma» during pregnancy and 192 newborns rats, the correction properties of taurine on endothelium dysfunction, increased production of nitric oxide and condition of progenity was revealed.

Kew words: pregnancy, lipopolysaccharide, physical development, endothelium dysfunctions, nitric oxide, taurine.

Охрана здоровья матери и ребёнка является приоритетным направлением в современном здравоохранении. Инфекция во время беременности, определяя уровень мертворождаемости и ранней неонатальной смертности, является актуальной проблемой современного акушерства. Показатель перинатальной смертности в Беларуси за 2006 год составил 7,3‰ (мертворождаемость – 5,4‰, ранняя неонатальная смертность – 2,4‰), доля инфекции среди перинатальных потерь занимает 3-е место [4].

Показатель инфекционно-воспалительной заболеваемости среди новорожденных республики Беларусь за 10-летний период увеличился в 2 раза (с 15,3‰ до 31‰). Наиболее высокие показатели регистрировались в 2000 году (19,7‰), а среднегодовые темпы роста составили 2‰ в год [2].

Несмотря на большое количество исследований в области инфекционной патологии плода, патогенез перинатальных нарушений изучен недостаточно, недостаточно разработаны способы их патогенетической коррекции.

Необходимо отметить, что среди инфекционных факторов, способствующих возникновению нарушений в системе «мать-плод», значительную роль играют грамотрицательные бактерии и их липополисахаридные (ЛПС) компоненты. Неблагоприятные эффекты ЛПС обусловлены способностью стимулировать образование в макрофагах биологически активных веществ, интерлейкинов, простагландинов, веществ окислительного действия, участием иммунной системы.

По данным литературы ЛПС обладают повреждающим действием на эндотелий кровеносных сосудов. Эндотелий – важный паракринный орган, непрерывно синтезирующий большое количество биологически активных веществ, важных для регуляции тонуса сосудов, проницаемости, гемостаза, ангиогенеза и др. Эндотелий участвует в поддержании гомеостаза путем образования вазодилаторных веществ (оксид

азота, простагландины J2, E2, эндотелиальный гиперполяризирующий фактор), а также факторов вазоконстрикторной природы (эндотелин, простагландин F2 α), регуляции анатомического строения сосудов путём синтеза и ингибирования факторов пролиферации, регуляции гемостаза через синтез и ингибирование факторов фибринолиза и агрегации тромбоцитов, модуляции воспаления с помощью про- и противовоспалительных факторов.

К настоящему времени установлена важная роль дисфункции эндотелия (ДЭ) в возникновении различной соматической патологии, показано, что нарушения кровообращения в системе «мать-плацента-плод» и развитие токсемии при гестозе зависит от степени эндотелиальной дисфункции. Однако в акушерской практике этот вопрос разработан недостаточно.

Важным патогенетическим фактором ДЭ при беременности, осложнённой инфекцией, может быть нарушение целостности эндотелиальной выстилки микрососудов с обнажением субэндотелиальных структур, что, в свою очередь, инициирует адгезию и агрегацию тромбоцитов и тромбогенез. Способность ЛПС индуцировать развитие окислительного стресса может стать причиной повреждений сосудистого эндотелия, нарушения маточного кровообращения и развития потомства. На основании собственных исследований установлено участие оксида азота в патогенезе дисфункции и десквамации эндотелия при ЛПС интоксикации в период беременности [3]. Однако эффективные способы коррекции ДЭ при эндотоксинемии в период беременности не разработаны.

Поиск корректоров обратил наше внимание на аминокислоту таурин, которая содержится в больших количествах в головном мозге и участвует в его развитии и функционировании. Таурин обладает осморегуляцией, антиоксидантными, детоксикационными, противовоспалительными, антиапоптотическими свойствами [10]. Предполагается, что введение в организм беременных самок крыс аминокислоты таурин, обладающей антиоксидательными свойствами, фагоцитоз и элиминацию ЛПС из организма, может оказать коррекцию перинатальных нарушений, вызываемых инфекционным агентом.

Цель исследований - изучить состояние потомства, эндотелия кровеносных сосудов и уровень метаболитов оксида азота беременных крыс при введении липополисахарида и таурина.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 74 беременных крысах массой 200-230 г, разделенных на 3 группы. Животным первой опытной группы (n=24) в период плацентации (11-14-е сутки беременности) внутримышечно вводили эндотоксин грамотрицательных бактерий – ЛПС E. Coli «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 в течение 7 суток ежедневно, начиная с 11-го дня беременности. Крысы контрольной группы (n=25) в аналогичные сроки беременности внутримышечно получали эквивалентное количество изотонического раствора NaCl.

У 49 крыс опытной и 25 контрольной групп определяли количество крысят в помете, вес при рождении, а также прирост массы тела в постнатальном периоде, у 109 крысят опытной и 44 крысят контрольной групп оценивали некоторые показатели физического развития (сроки отлипания ушей, появления шерсти, прорезывания резцов, открытия глаз), созревания сенсорно-двигательных рефлексов (переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, избегание обрыва, маятниковый рефлекс и др.) и координации движений (переворачивание в воздухе, удержание на вращающемся цилиндре, спонтанная двигательная активность) [5].

Взятие материала (крови и плацент, аорты) 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 1000 об/мин, а также при 3000 об/мин в течение 20 минут.

У 42 беременных крыс (22 крысы 1-й опытной, 12 крыс 2-й опытной группы и 8 крыс контрольной группы) оценивали уровень метаболитов оксида азота, а также выраженность функциональных нарушений эндотелия кровеносных сосудов (эндотелий зависимой дилатации и эндотелий независимой дилатации), а также осуществляли оценку его морфологических повреждений.

Эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) изучали микроскопически на основании определения изменения сужения диаметра колец аорты, предварительно спазмированных норадреналином, НА (10-6М) – величина вазоконстрикции (ВК), под влиянием ацетилхолина (АцХ, 10-5М) и выражали в виде % от исходного диаметра [6, 7]. Эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) колец аорты оценивали на основании изменения сужения диаметра колец аорты, предварительно спазмированных НА, под влиянием глицеролтринитрата (ГТН, 10-6М). Степень морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов изучали по количеству десквамированных циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в 100μл плазмы крови [1, 9].

В организме 74 беременных самок крыс оценивали на основании определения уровня нитритов и нитратов [NOx] в плазме крови с помощью реактива Грисса и кадмия общепринятым фотометрическим методом на КФК-3 при $\lambda=540$ нм [8]. Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Потомство, рожденное крысами, получавшими ЛПС, отставало в прибавке веса во все изучаемые сроки постнатального периода (таблица 1).

Таблица 1 - Масса тела (г) крысят в постнатальном периоде, рожденных самками крыс, получавшими липополисахарид (ЛПС), а также совместно ЛПС и таурин в период беременности ($M \pm m$)

| Сутки после рождения | 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** |

Примечания:

1 - * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ – различия статистически значимы между показателями опытной и контрольной группы;

2 - # - $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ – различия статистически значимы между показателями опытных групп

Сроки появления других показателей, характеризующих, физическое развитие крысят, в 1-й опытной группе также запаздывали. Отлипание 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 ($p < 0,001$).

У крысят, рождённых 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 ($p < 0,05$), таблица 2.

Таблица 2 – Показатели развития сенсорно-двигательных рефлексов у крысят в период новорожденности у крысят, рожденных крысами с введением липополисахарида (ЛПС) и таурина (Т) в дозе 70 мг/кг в период плацентации (M±STD)

| Изучаемые реф- лексы | Сроки появления (сутки) | | |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | Группы животных | | |
| | Контроль (n=8) | ЛПС (n=8) | ЛПС+Т (n=8) |
| Переворачивание на плоскости | 2,0±0,00 | 5,6±0,74** | 3,4±0,52*** |
| Отрицательный геотаксис | 5,0±0,00 | 7,6±0,52** | 6,1±0,64*** |
| Избегание обрыва | 6,0±0,00 | 9,0±0,53** | 7,0±0,76* |
| Реакция на акустический стимул | 8,1±0,35 | 11,3±1,04** | 9,4±0,52*** |
| Открытое поле: ползание | 10,0±0,93 | 13,4±0,74** | 11,0±0,76*** |
| Обонятельная реакция | 14,4±0,52 | 17,5±0,53** | 16,3±0,46*** |
| Мышечная сила | 14,8±0,46 | 18,6±0,52** | 16,5±0,76*** |

Примечания:

1 – * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ – различия статистически значимы между показателями опытной и контрольной групп;

2 – # - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$ - различия статистически значимы между показателями опытных групп

Изучение морфо-функциональных изменений эндотелия сосудов в организме самок крыс, получавших ЛПС, выявило тенденцию к более выраженной вазоконстрикторной реакции колец аорты на норадреналин (38%), по сравнению со значением ВК в контрольной группе (33%, $p > 0,05$) (таблица 3). У крыс с введением ЛПС и таурина отмечено менее выраженное сужение диаметра колец аорты (34%), чем в первой опытной группе ($p < 0,05$). Прирост диаметра колец аорты в ответ на действие эндотелийзависимого вазодилатора АцХ (10-5М) у крыс первой опытной группы был существенно меньше, чем в контроле ($5 \pm 2,3\%$, $n=22$ и $70 \pm 10,8\%$, $n=8$, соответственно, $p < 0,001$), а во второй опытной группе его значение составило $38 \pm 5,3\%$ ($n=12$, $p < 0,05$), что больше, по сравнению со значением в первой опытной группе с введением ЛПС ($p < 0,001$). После воздействия АцХ на предварительно спазмированные норадреналином кольца аорты их диаметр у крыс, получавших ЛПС, составил $72 \pm 4,7\%$ ($n=17$, $p < 0,05$). У крыс с введением ЛПС и таурина отмечено увеличение диаметра спазмированных НА колец аорты после воздействия АцХ до $80 \pm 2,9\%$ ($n=10$, $p < 0,001$) от исходного.

Таблица 3 - Степень вазоконстрикции (ВК), эндотелийзависимой (ЭЗВД) и эндотелийнезависимой вазодилатации (ЭНВД), значение диаметра колец аорты от исходного после действия ацетилхолина (АцХ), а также после действия глицеролтринитрата (ГТН), количество циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК), у беременных крыс с введением липополисахарида (ЛПС), а также совместно ЛПС и таурина (M±m)

| Показатели | Группы животных | | |
|---------------|-------------------|-----------------------|------------------------|
| | Контроль (n=8) | ЛПС (n=22) | ЛПС + таурин (n=12) |
| ВК (%) | 33±6,3 | 38±5,5 | 34±7,8 ¹ |
| ЭЗВД (%) | 70±10,8 | 5±2,3 ^{**} | 38±5,3 ^{**#} |
| d (%), АцХ | 97±0,6 | 72±4,7 ^{**} | 80±2,9 ^{**#} |
| ЭНВД (%) | 88±3,6 | 85±7,4 | 85±3,3 |
| d (%), ГТН | 99±0,8 | 99±0,7 | 98±0,4 |
| ЦЭК / 100 мкл | 4±0,7 | 94±12,3 ^{**} | 21±2,0 ^{**#} |

Примечания:

1 - * - p<0,05, ** - p<0,001 – различия статистически значимы между показателями опытной и контрольной групп;

2 - # - p<0,05, ## - p<0,001 - различия статистически значимы между показателями опытных групп

ЭНВД, определяемая приростом диаметра колец аорты после воздействия на предварительно спазмированные НА кольца аорты ГТН (10-6М) – непрямым донором оксида азота в качестве эндотелийнезависимого вазодилататора, не была изменена у крыс с введением эндотоксина, по сравнению с её значением у крыс контрольной группы, составив 85±7,4% и 88±3,6%, соответственно (p>0,05). В группе крыс с введением ЛПС и таурина ЭНВД колец аорты также не изменилась – 85±3,3% (n=8, p>0,05). При этом диаметр колец аорты, предварительно спазмированных НА, после добавления ГТН, у крыс, получавших ЛПС не отличался от значений в контрольной группе, составив 99±0,7% (n=18) от исходного диаметра, в контроле – 99±0,8% (n=7, p>0,05). У крыс с введением ЛПС и таурина также различий не отмечалось – 98±0,4% (n=9, p>0,05).

При изучении выраженности десквамации эндотелия кровеносных сосудов, как маркера морфологического повреждения, оцениваемой по количеству ЦЭК, установлено существенное повышение морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов у крыс, получавших в период беременности ЛПС. Так, количество ЦЭК в плазме крови крыс первой опытной группы составило 94±12,3/ 100 мкл (p<0,001, n=22), в то время как в контроле – 4±0,7/ 100 мкл (n=8). В группе крыс с введением ЛПС и аминокислоты таурин отмечено снижение количества ЦЭК, по сравнению со значением в первой опытной группе с введением ЛПС, до 21±2,0/100 мкл (p<0,001, n=12), что указывает на эндотелиопротекторный эффект таурина.

Изучение морфо-функционального состояния эндотелия кровеносных сосудов беременных самок крыс с введением эндотоксина показало, что важное значение в генезе выявленных нарушений у потомства при действии инфекционного агента во время беременности могут играть морфо-функциональные нарушения эндотелия кровеносных сосудов. Учитывая, что эндотелий играет ключевую роль в регуляции сосудистого тонуса и

кровотока, в том числе и в матке, очевидно, что его повреждение может стать важным звеном патогенеза нарушений у потомства крыс с воздействием на организм ЛПС и инфекционных агентов.

Наряду с этим в плазме крови крыс, получавших ЛПС, установлено повышение содержания нитритов и нитратов – стабильных метаболитов NO до $99,5 \pm 4,65$ мкМ/л ($n=24$, $p<0,001$), в контроле этот показатель составил $33,5 \pm 2,92$ 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 при инфицировании в период беременности эндотоксина. В группе крыс, получавших ЛПС и 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 позволяет объяснить механизм его эндотелиопротекторных свойств. Предполагается, что избыточное образование оксида азота в организме беременных крыс с эндотоксинемией может явиться причиной морфо-функциональных нарушений эндотелия сосудов вследствие наличия у NO свободнорадикальных свойств и способности образовывать пероксинитрит с сильными окислительными эффектами.

Выводы. Введение липополисахарида грамотрицательных бактерий крысам в период беременности приводит к нарушению созревания плодов, а также развития потомства, патогенез которых обусловлен возникновением дисфункции эндотелия кровеносных сосудов и повышенным уровнем метаболитов оксида азота. Введение таурина крысам, получавшим ЛПС, корригирует уровень оксида азота, морфо-функциональные изменения эндотелия сосудов у беременных крыс, уменьшает выраженность патогенных эффектов липополисахарида у развивающего потомства. Предполагается, что использование таурина в период беременности позволит уменьшить нарушения развития у потомства при инфицировании в период беременности.

Литература

1. Власов, Т. Д. Системные нарушения микроциркуляции как следствие органной постишемической реперфузии: сб. науч. трудов «Патофизиология микроциркуляции и гемостаза»/ Т. Д. Власов. СПб., 1998. С. 90–106.
2. Гнедько, Т. В. Инфекционная заболеваемость новорожденных в родовспомогательных учреждениях Республики Беларусь / Т. В. Гнедько, Н. Г. Капура, О. Н. Гриценко // Безопасное материнство в XXI веке: сб. материалов VIII съезда акушеров-генекологов и неонатологов республики Беларусь, Витебск, 17–18 октября 2007 г. / Мин. здравоохран. РБ, Витебс. гос. мед. ун-т; редкол.: В. И. Жарко [и др.]. Витебск, 2007. С. 481–483.
3. Милош, Т. С. NO-зависимые механизмы дисфункции эндотелия – фактор патогенеза нарушений потомства при экспериментальном введении липополисахарида / Т. С. Милош, Н. Е. Максимович // Медицинский журнал. 2007. С. 79–80.
4. Организационное обеспечение безопасного материнства в Республике Беларусь / В. И. Жарко [и др.] // Безопасное материнство в XXI веке: сб. материалов VIII съезда акушеров-генекологов и неонатологов республики Беларусь, Витебск, 17–18 октября 2007 г. / Мин. здравоохран. РБ, Витебс. гос. мед. ун-т; редкол.: В. И. Жарко [и др.]. Витебск, 2007. С. 3–13.
5. Brady, J.V. Subcortical mechanisms in emotional behavior: Affective changes following septal forebrain lesions in the albino rat / J.V. Brady, V.J.H. Nauta // J. Cong and Physiol. Pscychol. 1953. P. 339–346.

6. Busse, R. Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and functional implications / R. Busse, I. Fleming, V. Schini // In: The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology (eds. Koprowski, H., Maeda, H.). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. 1995. P. 7-18.

7. Chlopicki, S. The endothelium-dependent and the endothelium-independent vasodilators in the isolated, perfused guinea pig heart / S. Chlopicki, R.J. Gryglewski // J. Physiol Pharmacol. 1992. Vol. 43. P. 353-365.

8. Granger, D.N. Nitric oxide as antiinflammatory agent/ D.N. Granger, P. Kubes// Methods in Enzymology. 1996. Vol. 269. P. 434-442.

9. Hladovec, J. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats / J. Hladovec, P. Rossman // Thromb. Res. 1973. Vol. 3. P. 665-674.

10. The antioxidant action of taurine in acute hypoxic hypoxia / I.M. Mankovska [et al.] // Fiziologicheski Zurnal. 1998. Vol. 44(5-6). P. 65-72.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ № Б04М-044