
ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГИПОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС WISTAR В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Ю.И. Баева, Е.В. Орлова,
О.М. Родионова

Экологический факультет
Российский университет дружбы народов
Подольское шоссе, 8/5, Москва, Россия, 113093

Репродуктивная система весьма чувствительна к воздействию неблагоприятных факторов среды и отвечает на него формированием экологически зависимой патологии. Одним из самых эффективных и перспективных путей профилактики и терапии гипоксических повреждений матери и плода представляется применение антигипоксантов. Введение биологически активных препаратов с антигипоксическими свойствами вызывает выраженный антигипоксический эффект, купируя проявления гипоксического стресса в организме матери во время беременности.

Ключевые слова: экологическая патология, гипоксия, антигипоксанты, репродуктивная система, беременность, гипоксический стресс.

Одной из характерных особенностей современной эпохи является усиление антропогенного давления на биосферу, отрицательные эффекты которого проявляются на всех уровнях организации живых систем: от нарушения внутриклеточных процессов, возникновения тканевой и органной патологии, снижения репродуктивной способности до изменений на популяционном уровне. Особое значение имеет воздействие вредных факторов окружающей среды на репродуктивную систему, так как с ее функционированием связано не только здоровье ныне живущих, но и существование будущих поколений людей.

Непрерывное снабжение организма кислородом — абсолютное условие существования человека. Молекулярный кислород необходим для производства энергии, нормального роста и функционирования клеток. Однако сегодня, при постоянно возрастающем уровне загрязнения окружающей среды, гипоксический стресс стал неотъемлемым спутником современного человека.

Недостаток кислорода в организме матери в период беременности запускает ответную стресс-реакцию, в процессе развития которой реализуются две цепи явлений: во-первых, мобилизуется функциональная система, специфически ответственная за адаптацию к тому или иному фактору, и, во-вторых, активируется неспецифическая, возникающая при действии любого сильного раздражителя [5].

Начальным звеном данного процесса является возбуждение симпато-адреналовой системы (САС) и выброс катехоламинов, что приводит организм в состояние общей повышенной активности при стрессе [4; 9; 12]. На фоне активации САС запускаются процессы гликолиза, липолиза, протеолиза, развивается метаболический ацидоз, происходит набухание митохондрий и, соответственно, ра-

зобщение окислительного фосфорилирования и свободного дыхания, возникает дефицит АТФ и подавляются энергозависимые реакции в клетках различной структурной и функциональной организации [1; 10; 21]. Под влиянием избытка ионов H^+ в условиях гипоксии повышается проницаемость лизосомальных мембран и соответственно развиваются деструктивные процессы в тканях под влиянием лизосомальных гидролаз. Последние инициируют образование эйкозаноидов и простаноидов, в процессе взаимного превращения которых, возникают свободные радикалы [3].

Образующиеся высокоактивные свободные радикалы могут служить источниками самых разнообразных изменений, нарушений и повреждений на молекулярном уровне (в том числе модификация белков и повреждение нуклеиновых кислот, перекисное окисление липидов), приводящих к повреждениям, выявляемым на уровне мембран, а затем ткани, органа и целого организма [1].

Процессы свободнорадикального окисления в организме матери в период беременности в значительной степени определяют риск осложнений и невынашивания беременности, преждевременных родов, патологии плода и новорожденного [2; 6; 8]. В связи с этим очевидна значимость экспериментальных исследований, направленных на изучение антигипоксических эффектов лекарственных и биологически активных препаратов с целью снижения неблагоприятного воздействия факторов окружающей среды на организм в период беременности.

Целью настоящего исследования явилась оценка антигипоксических эффектов биологически активных препаратов у беременных крыс Wistar как одного из способов повышения резистентности организма к неблагоприятному воздействию факторов окружающей среды.

Исследования выполнены на беременных крысах линии Wistar массой 180—200 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария, получали корм и воду без ограничения и были разделены на шесть групп: 1-я группа — беременные крысы (контроль); 2-я группа — беременные самки, получавшие намивит; 3-я группа — беременные самки, получавшие суперпротамин; 4-я группа — беременные самки, перенесшие гипоксию; 5-я группа — беременные самки, перенесшие гипоксию и получавшие намивит; 6-я группа — беременные самки, перенесшие гипоксию и получавшие суперпротамин.

Использовали модель острой сублетальной гипобарической гипоксии, создавая ее на 15-й день беременности (срок беременности определяли считая со дня обнаружения спермиев в вагинальном мазке) в барокамере с регулируемым протоком воздуха. Давление снижали до конечного значения, соответствующего условиям подъема на высоту 12000 м над уровнем моря. В таких условиях животных выдерживали до остановки дыхания. Сразу после гипоксического воздействия крыс декапитировали под эфирным наркозом.

В качестве исследуемых препаратов применяли биологически активные иммуномодуляторы широкого спектра действия намивит (регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 16.08.2005 № 77.99.23.3.У.9412.8.05) и суперпрота-

мин (регистрационное удостоверение Минздрава России от 17 января 2000 г. № 001374.Р. 643.01.2000), которые вводили с первого по 14-й день гистации внутрижелудочно 1 раз в день в дозе 100 мг/кг массы. Данные препараты используются для повышения иммунореактивности организма, сопротивляемости к неблагоприятным факторам окружающей среды, коррекции метаболических нарушений и нормализации физиологических процессов при развитии ряда патологических состояний, являются эффективными антиоксидантами, действие которых проявляется в нормализации уровня активности глутатион-зависимого звена, снижении уровня малонового диальдегида, ингибировании перекисного окисления липидов, снижении активности синтазы оксида азота. Препараты не обладают мутагенными, эмбриотоксическими, тератогенными, аллергизирующими свойствами и не влияют на репродуктивную функцию.

Тяжесть окислительного стресса у крыс с гипоксией оценивали по следующим биохимическим показателям, характеризующим отдельные звенья данного патологического процесса: содержание адреналина и норадреналина, уровень SH-групп (общие, свободные (глутатиона) и белковые), супероксидперехватывающая активность, уровень ТБК-реактивных продуктов и активность различных изоформ NOS. Данные показатели определяли в плазме крови, тканях головного мозга, печени и мышцах бедра подопытных животных. Для этого ткани гомогенизировали в автоматическом гомогенизаторе Поттера и получали тканевые экстракты по методикам Forstermann et al. (1991) [14; 15], Fandrey J. et al. (1990) [13], Wenger R.H. et al. (1997) [20], Wang J. et al. (1991) [19], на которых проводили указанные исследования.

Содержание катехоламинов в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Уровни SH-групп (общие, свободные (глутатиона) и белковые) определяли по методу J.D. Hayes et al. (1999) [16], супероксидперехватывающую активность — по восстановлению нитросинего тетразолиевого в системе генерации супероксидного радикала феназинметасульфат-НАДН [17]. Продукты, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой, определяли в плазме по методу H. Ohkawa et al. (1979) [18], а в тканях — по методу Ф.Е. Путилиной (1982) [7]. Определение активности NOS осуществляли радиометрически по образованию ^3H -цитруллина из ^3H -L-аргинина (Bredt and Snyder, 1994) [11]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета статистических программ SPSS. Достоверность результатов оценивалась с использованием непараметрических критериев Манна—Уитни, Краскала—Уоллиса, Дана. Результаты экспериментов представлены в виде среднеарифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$) при критическом значении уровня значимости 5% ($p < 0,05$).

Полученные в результате исследования данные показали, что острая гипобарическая гипоксия вызывает выраженную ответную стресс-реакцию организма беременных самок крыс линии Wistar, направленную на повышение устойчивости к недостатку кислорода и характеризующуюся повышением уровней гормонов мозгового вещества надпочечников в плазме крови, а также развитием окис-

лительного стресса в различных органах и тканях. При этом специфика биохимических изменений, характерных для окислительного стресса, зависит от вида исследуемого органа или ткани. Наиболее выраженные нарушения важнейших антиоксидантных систем отмечены в плазме крови (что свидетельствует о генерализованном характере окислительного стресса) и в ткани головного мозга, наименее выражены в печени и мышце бедра животных.

Внутрижелудочное введение биологически активных препаратов намивита и суперпротамина в исследуемых дозах беременным крысам вызывает выраженный антигипоксический эффект, купируя проявления гипоксического стресса в организме матери во время беременности.

Следует отметить, что намивит и суперпротамин неодинаково влияют на содержание адреналина и норадреналина в крови беременных животных, подверженных острой гипоксии (рис.1, 2). Так, применение намивита в значительной степени снижало выраженность ответной стресс-реакции организма на гипоксию, в то время как суперпротамин не вызывал достоверно значимого уменьшения степени гипоксического стресса.

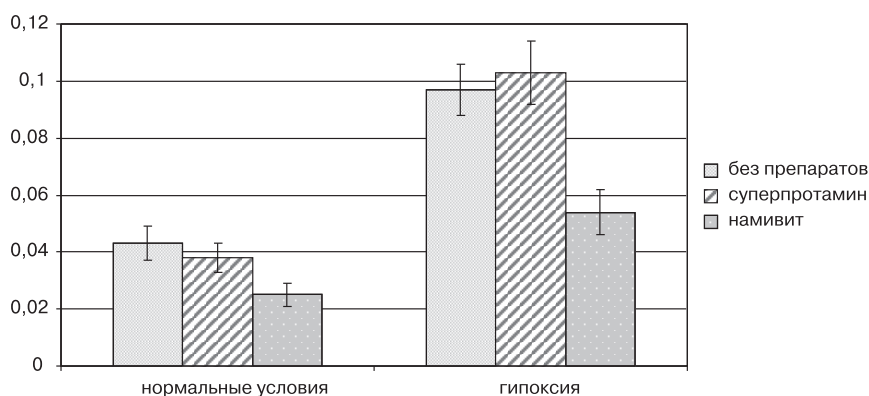


Рис. 1. Влияние намивита и суперпротамина на содержание адреналина в плазме крови (нг/мл) беременных крыс Wistar при нормальных условиях и в условиях гипоксии (уровень значимости $p < 0,05$)

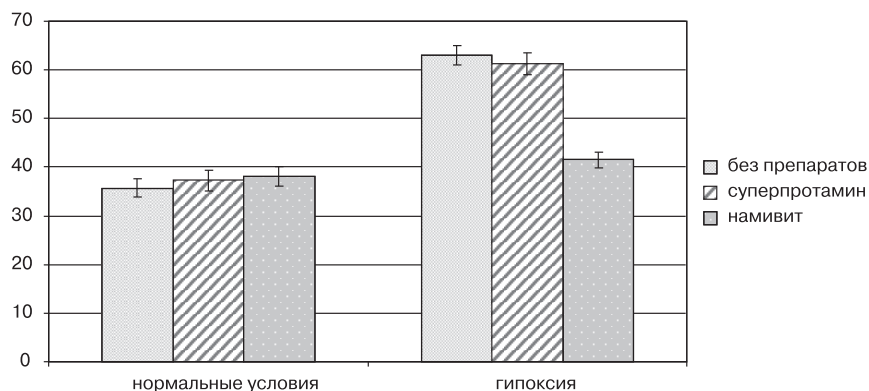


Рис. 2. Влияние намивита и суперпротамина на содержание норадреналина в плазме крови (нг/мл) беременных крыс Wistar при нормальных условиях и в условиях гипоксии (уровень значимости $p < 0,05$)

Применение исследуемых биологически активных препаратов предотвращало повышение генерации активных форм кислорода и накопление продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, в различных органах и тканях экспериментальных животных при гипоксическом стрессе (рис. 3).

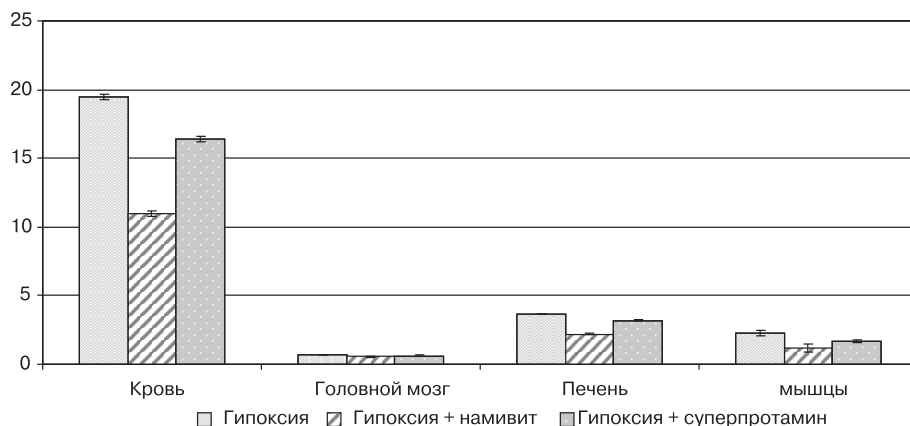


Рис. 3. Влияние намовита и суперпротамина на содержание ТБКАП у беременных крыс Wistar в условиях гипоксии (уровень значимости $p < 0,05$)

Намовит и суперпротамин купировали нарушение систем перехвата и генерации супероксидных радикалов в исследуемых органах и тканях, достоверно повышая супероксидперехватывающую активность (табл. 1).

Таблица 1

Влияние экспериментальной гипоксии и биологически активных препаратов на супероксидперехватывающую активность в различных органах и тканях беременных крыс Wistar

Группа	Супероксидперехватывающая активность, у.е.			
	кровь	головной мозг	печень	мышцы бедра
Контрольная группа	20,1 ± 0,9	63,2 ± 0,7	66 ± 0,9	47,7 ± 1,1
Намовит	23,4 ± 0,8	70,1 ± 0,6	68,6 ± 1,1	45,2 ± 0,8
Суперпротамин	21 ± 0,6	64,6 ± 0,9	67,5 ± 1,0	48,0 ± 0,9
Группа с экспериментальной гипоксией	9,8 ± 0,7	43,3 ± 0,6	59,3 ± 0,8	51,4 ± 0,6
Гипоксия + намовит	18,3 ± 0,8	61,8 ± 0,8	65,9 ± 0,9	49,6 ± 0,7
Гипоксия + суперпротамин	16,7 ± 0,6	50,6 ± 0,8	61,5 ± 1,1	49,9 ± 0,6

Использование биологически активных препаратов намовита и суперпротамина усиливало антиоксидантную защиту и тем самым уменьшало воздействие оксидативного стресса на организм беременных самок линии Wistar: в группах, прошедших курс препаратов, достоверно уменьшалось содержания общих и белковых SH-групп, а также увеличивался уровень свободных SH-групп глутатиона (табл. 2).

Таблица 2

**Уровни SH-групп в тканях и органах беременных крыс Wistar
после острой гипобарической гипоксии и при использовании намивита и суперпротамина**

Группа	Уровень SH-групп, нмоль/мг белка		
	SH-группы общие	SH-группы глутатиона	SH-группы белковые
Плазма крови			
Контрольная группа	36,1 ± 0,3	10,02 ± 0,15	1,04 ± 0,16
Намивит	27,7 ± 0,2	13,11 ± 0,17	0,74 ± 0,17
Суперпротамин	33,5 ± 0,4	11,05 ± 0,16	0,91 ± 0,15
Группа с экспериментальной гипоксией	67,2 ± 0,1	0	6,83 ± 0,19
Гипоксия+намивит	45,4 ± 0,3	5,36 ± 0,18	3,97 ± 0,17
Гипоксия+суперпротамин	59,9 ± 0,2	1,78 ± 0,19	5,87 ± 0,18
Головной мозг			
Контрольная группа	163,4 ± 0,7	3,58 ± 0,12	157,6 ± 0,8
Намивит	157,7 ± 0,6	4,97 ± 0,11	143,2 ± 0,7
Суперпротамин	161,5 ± 0,7	4,01 ± 0,13	153,1 ± 0,9
Группа с экспериментальной гипоксией	179,2 ± 0,8	0	177,9 ± 0,6
Гипоксия+намивит	162,9 ± 0,9	2,39 ± 0,09	161,7 ± 0,7
Гипоксия+суперпротамин	173,3 ± 0,8	0,76 ± 0,11	172,8 ± 0,9
Печень			
Контрольная группа	105,5 ± 1,3	10 ± 0,6	93,7 ± 0,9
Намивит	95,9 ± 1,2	11,2 ± 0,5	87,5 ± 1,1
Суперпротамин	102,3 ± 1,4	9,5 ± 0,7	91,8 ± 0,8
Группа с экспериментальной гипоксией	114,6 ± 1,1	3,3 ± 0,8	107,8 ± 1,2
Гипоксия+намивит	81,7 ± 1,3	6,1 ± 0,5	98,6 ± 0,9
Гипоксия+суперпротамин	104,3 ± 1,3	4,2 ± 0,7	104,5 ± 0,8
Мышцы бедра			
Контрольная группа	40,5 ± 0,6	3,35 ± 0,16	39,7 ± 0,5
Намивит	37,8 ± 0,5	3,58 ± 0,17	37,5 ± 0,4
Суперпротамин	39,6 ± 0,7	3,43 ± 0,13	38,9 ± 0,5
Группа с экспериментальной гипоксией	72,9 ± 0,4	1,14 ± 0,12	75,4 ± 0,3
Гипоксия+намивит	60,7 ± 0,5	2,99 ± 0,18	62,8 ± 0,6
Гипоксия+суперпротамин	68,8 ± 0,3	1,77 ± 0,15	71,2 ± 0,3

Внутрижелудочное введение крысам изучаемых биологически активных препаратов также восстанавливало сниженную в результате развития у них гипоксического стресса активность Ca^{2+} -зависимой NO-синтазы и подавляло индукцию iNOS, повышая тем самым сопротивляемость организма к воздействию гипоксии (табл. 3, рис. 4, 5).

Таблица 3

**Влияние намивита и суперпротамина на активность NO-синтазы
в плазме крови и в головном мозге беременных крыс Wistar**

Группа	Активность NO-синтазы, пмоль цитруллина/ мин/мг белка	
	плазма крови	головной мозг
Контрольная группа	29,3 ± 0,6	46,4 ± 3,1
Намивит	31,2 ± 0,5	55,5 ± 3,0
Суперпротамин	29,9 ± 0,6	50,0 ± 2,9
Группа с экспериментальной гипоксией	21,4 ± 0,4	30,5 ± 2,9
Гипоксия + намивит	26,3 ± 0,5	42,5 ± 2,5
Гипоксия + суперпротамин	22,8 ± 0,3	35,1 ± 1,6

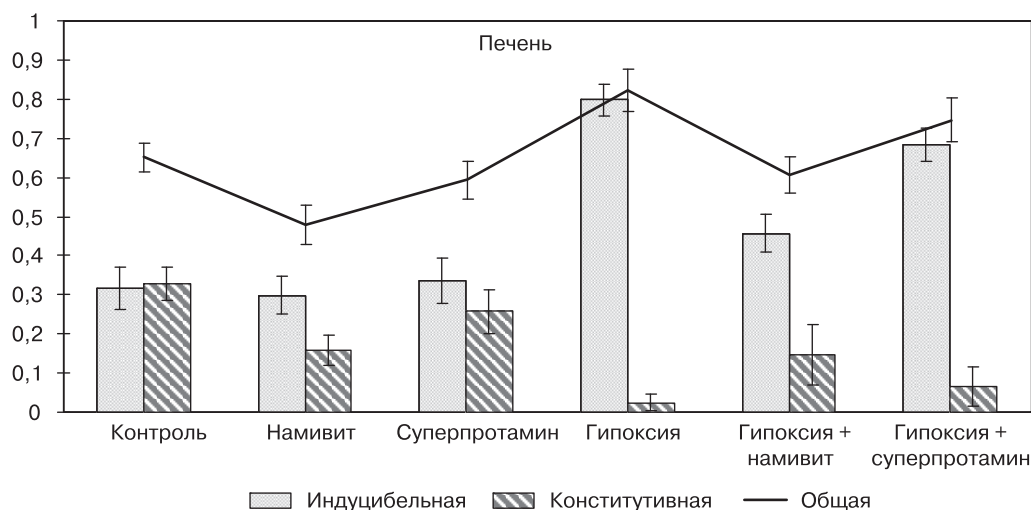


Рис. 4. Соотношение активности различных изоформ NOS в печени беременных крыс после 14-дневного курса намивита и суперпротамина при экспериментальной гипоксии (пмоль цитруллина/мин/мг белка) (уровень значимости $p < 0,05$)

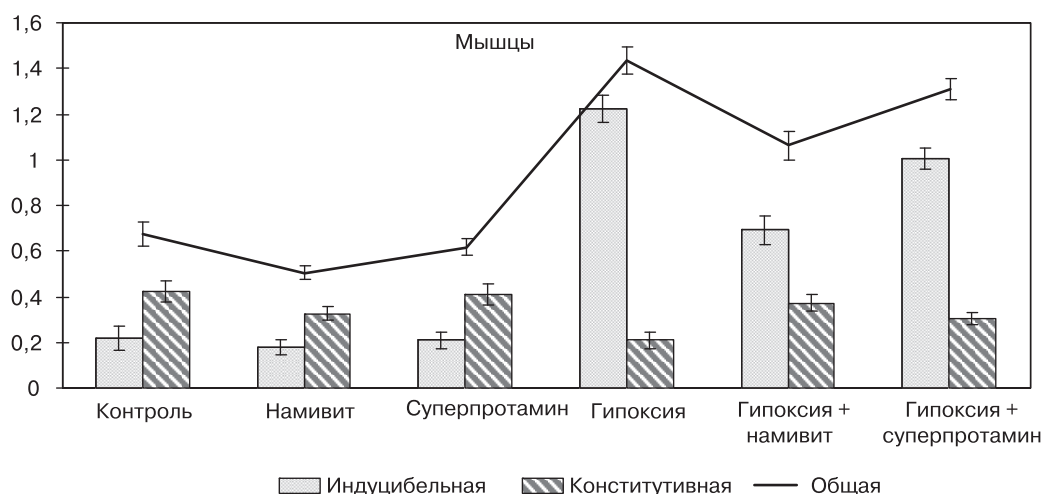


Рис. 5. Соотношение активности различных изоформ NOS в мышцах бедра беременных крыс после 14-дневного курса намивита и суперпротамина при экспериментальной гипоксии (пмоль цитруллина/мин/мг белка) (уровень значимости $p < 0,05$)

Намивит и суперпротамин с разной силой воздействуют на показатели гипоксического стресса в органах и тканях беременных крыс. При этом антигипоксический эффект намивита выражен в большей мере, чем суперпротамина.

Результаты проведенных исследований позволяют утверждать, что намивит и суперпротамин оказывают благоприятное влияние на организм матери во время беременности и, тем самым, существенно снижают риск развития негативных последствий гипоксии для плода. Это расширяет возможности использования данных биологически активных препаратов во время беременности с целью повышения неспецифической резистентности организма к вредному влиянию загрязнения окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Бизенкова М.Н.* Общие закономерности метаболических расстройств при гипоксии различного генеза и патогенетическое обоснование принципов их медикаментозной коррекции: Автореф. дисс. ... к.м.н. — Саратов, 2008. — 27 с.
- [2] *Евсюкова И.И.* Патогенез перинатальной патологии у новорожденных детей, развивавшихся в условиях хронической гипоксии при плацентарной недостаточности // Журнал акушерства и женских болезней. — 2004. — Т. LIII. — Вып. 2. — С. 26—29.
- [3] *Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П.* Основы общей патологии. Часть 2 / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. — Основы патохимии. — СПб.: ЭЛБИ, 2000. — 687с.
- [4] *Коркушко О.В., Иванов Л.А.* Современные представления о патогенетических факторах гипоксии в пожилом и старческом возрасте // Вестн. АМН СССР. — 1990. — № 1. — С. 41—45.
- [5] *Меерсон Ф.З.* Физиология адаптационных процессов. — М., 1986. — 224 с.
- [6] *Никитин А.И.* Вредные факторы среды и репродуктивная система человека (ответственность перед будущими поколениями). — СПб.: «ЭЛБИ-СПб», 2008. — 240с.
- [7] *Путилина Ф.Е.* Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях. Методы биохим. исслед. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — С. 183—186.
- [8] *Ревич Б.А., Авалиани С.Л., Тихонова Г.И.* Экологическая эпидемиология: Учебник для вузов / Под ред. Б.А. Ревича. — М.: Академия, 2004. — 384 с.
- [9] Физиология адаптационных процессов: Руководство по физиологии / Под ред. Ф.З. Меерсона. — М.: Наука, 1989. — 632 с.
- [10] *Balaban P.M., Guliaeva N.V.* Commonality of molecular mechanisms of neuroplasticity and neuropathology: integrative approach // Ross Fiziol Zh Im I.M. Sechenova. — 2006. — Feb; 92(2). — С. 145—151.
- [11] *Bredt D.S., Snyder S.H.* Isolation and characterisation of nitric oxide synthases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — V. 93. — P. 682—685.
- [12] *Esler M.D., Thompson J.M., Kaye D.M. et al.* Effects of aging on the responsiveness of the human cardiac sympathetic nerves to stressors // Circulation. — 1995b. — 91, № 2. — P. 351—358.
- [13] *Fandrey J., Seydel F.P., Siegers C.P., Jelkman W.* Role of cytochrome P450 in the control of the production of erythropoietin // Life Sci. — 1990. — V. 47. — P. 127—134.
- [14] *Förstermann U., Polloc J.S., Schmidt H.H.H.W., Murad F.* Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor / nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovin aortic endothelial cells // Proc. Natl. Acad. Sci., USA. — 1991. — V. 88. — P. 1788—1792.
- [15] *Förstermann U., Schmidt H.H., Polloc J.S., Sheng H., Mitchell J.A., Warner T.D., Nacane M., Murad F.* Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different all types // Biochem. Pharmacol. — 1991. — V. 42. — P. 1849—1857.
- [16] *Hayes J.D., McLellan L.I.* Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defense against oxidative stress // Free Radic Res. — 1999. — V. 31. — P. 273—300.
- [17] *Nishikimi M., Yoshino M.* Fluorometric and Spectrophotometric Studies on the Binding of Sulfonphthalein Dyes to Proteins // J. Biochem. — 1972. — V. 7. — P. 1237—1244.
- [18] *Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.* Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction // Analyt. Biochem. — 1979. — V. 95. — P. 351—358.
- [19] *Wang J., Shin W.S., Kawaguchi H., Kato M.* Contribution of sustained Ca²⁺-elevation for NO production in endothelial cells and subsequent modulation of Ca²⁺ levels in vascular smooth muscle cells in coculture // J.B.C. — 1991. — V. 238. — P. 197—210.

- [20] *Wenger R.H., Gassmann M.* Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1 // *Biol Chem.* — 1997. — V. 378. — P. 609—616.
- [21] *Vo T.D., Palsson B.III.* Building the power house: recent advances in mitochondrial studies through proteomics and systems biology // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* — 2007. — 292(1). — C. 164—177.

IMPACT ASSESSMENT BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS ON BIOCHEMICAL PARAMETERS HYPOXIC STRESS IN PREGNANT WISTAR RAT IN A POLLUTION

**Y.I. Baeva, E.V. Orlova,
O.M. Rodionova**

Ecological Faculty
Russian Peoples' Friendship University
Podolskoye shosse, 8/5, Moscow, Russia, 113093

The reproductive system is very sensitive to adverse environmental factors and on-Chambers for his formation of environmentally dependent pathology. One of the most effective and far-reaching ways of per-prevention and treatment of hypoxic damage to the mother and the fetus appears antihypoxants application. The introduction of biologically active compounds with antihypoxic properties-you is expressed antihypoxic effect kupiruya manifestations of hypoxic stress in the body naturally during pregnancy.

Key words: environmental pathology, hypoxia, antihypoxants, reproductive system, pregnancy, hypoxic stress.