

**ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТА ТИОФАНА НА МОРФОГЕНЕЗ ОСЕВОГО СКЕЛЕТА КРЫС В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА МАТЕРЕЙ**

*На модели глюкокортикоид-индуцированного окислительного стресса у лабораторных животных в период беременности установлено развитие окислительного стресса.*

*Методами морфогистохимического анализа доказано, что у беременных самок с высоким содержанием в плазме крови продуктов свободнорадикального перекисного окисления липидов замедляются сроки формирования осевого скелета у плодов. Сочетанное применение глюкокортикоидов и антиоксиданта тиофана в период гестации снижает показатели окислительного стресса в плазме крови беременных крыс до уровня физиологических значений и оптимизирует морфогенез осевого скелета у плодов крыс.*

**Ключевые слова:** крысы, беременность, окислительный стресс, антиоксидант тиофан, хондробласты, тело позвонка, плоды крыс.

A.A. Makeyev, A.V. Sakharov, A.E. Prosenko

**THIOPHANE ANTIOXIDANT INFLUENCE ON RAT AXIAL SKELETON MORPHOGENESIS IN THE MOTHER OXIDATIVE STRESS CONDITIONS**

*Oxidative stress development is determined on the basis of the glucocorticoid-induced oxidative stress model in the laboratory pregnant animals. It is proved by the methods of morphological and histochemical analysis that the embryo axial skeleton formation time slows in the pregnant females with high content of the free-radical lipid peroxidation products in blood plasma. Combined use of the glucocorticoids and thiophane antioxidant in gestation reduces the oxidative stress indicators in the pregnant rat blood plasma to the physiological mean level and optimizes the rat fetus axial skeleton morphogenesis.*

**Key words:** rats, pregnancy, oxidative stress, thiophane antioxidant, chondroblasts, vertebral body, rat fetuses.

Известно, что изменение базового уровня метаболизма в организме матери во время беременности является общебиологической закономерностью, характерной для млекопитающих всех видов [1, 5]. Считается, что в период гестации интенсивность течения анаболических и катаболических процессов сопровождается увеличением содержания в плазме крови ненасыщенных жирных кислот [3]. При взаимодействии с активными кислородными метаболитами данные органические соединения увеличивают активность процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов (СПОЛ), что приводит к развитию окислительного стресса [4]. По принципу обратной связи обеспечение окислительно-восстановительного гомеостаза в организме матери при физиологической беременности осуществляется за счет повышения активности системы антиоксидантной защиты, что рассматривается как один из важных механизмов системы адаптации организма матери к новым условиям существования [4–6]. Установлено, что при реализации адаптивного ответа происходит перераспределение трофического и энергетического материала между организмом матери и плода. В условиях осложненной беременности, а также при наличии сопутствующих заболеваний инфекционной и неинфекционной этиологии, которые встречаются в ветеринарной практике, процесс адаптации у самок достаточно быстро завершается дезадаптацией и развитием различных эмбриопатий [2, 13, 14, 16]. Несмотря на универсальность развития свободнорадикальных процессов в организме млекопитающих, механизм повреждения клеток различных тканей АКМ имеет выраженный тропизм. Хрящевая ткань формирующихся тел позвонков является наиболее уязвимой к повреждению АКМ, что явилось основанием для поиска эффективных хондропротекторов в эксперименте на лабораторных животных.

Цель исследования – изучить влияние антиоксиданта тиофана на морфогенез осевого скелета у плодов крыс в условиях глюкокортикоид-индуцированного окислительного стресса матерей.

**Материал и методы исследований.** Для изучения влияния антиоксиданта тиофана на морфогенез позвоночника плодов крыс линии Вистар в условиях окислительного стресса матерей было сформировано три группы животных. Согласно общепринятой методике у беременных самок двух опытных групп с 1-го дня беременности моделировали развитие окислительного стресса путем *per os* введения преднизолона в дозе

50 мг/кг в течение 14 суток [7]. Крысы 1-й опытной группы (n=10) не лечили. Животным 2-й опытной группы (n=10) ежедневно в течение 14 суток через 3 ч после введения преднизолона вводили антиоксидант тиофан в дозе 100 мг/кг.

Контролем служили беременные интактные крысы (n=10), с которыми дополнительных манипуляций не проводили.

На 18-е сутки гестации крыс всех групп под эфирным наркозом выводили из эксперимента. Объектом исследования служили фрагменты тел позвонков грудного отдела плодов крыс и плазма крови матерей.

В плазме крови беременных самок определяли содержание продуктов свободнорадикального перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК), а также активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ).

Содержание МДА определяли в реакции с 3-хлоруксусной и тиобарбитуровой кислотами в присутствии ионов меди [10]; концентрацию ДК выявляли реакцией с гептан-изопропаноловой смесью [12]. Активность ферментов антиоксидантной защиты регистрировали по степени ингибирования хемилюминесценции в растворе с ксантинооксидазой [15]; активность КАТ определяли реакцией перекиси водорода с добавлением молибдата аммония [8].

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

Для проведения морфогистохимического анализа фрагменты позвоночного столба плодов крыс фиксировали в 10% растворе забуференного формалина, декальцинировали в насыщенном растворе трилона Б и после обезвоживания в Isorper заливали гистомиксом (Histomix, Biovitrum, Россия). На санном микротоме изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм и монтировали на предметные стекла. Для изучения общей морфологической картины срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Кислые гликозаминогликаны (ГАГ) выявляли альциановым синим по Сиддмену, распределение гликогена и гликопротеидов определяли ШИК-реакцией по Макманусу с постановкой соответствующих контролей.

**Результаты исследования и их обсуждение.** У беременных крыс в условиях хронической глюкокортикоидной нагрузки на 18-е сутки гестации в плазме крови отмечается статистически достоверное увеличение содержания МДА на 41,5%, ДК на 64,86% по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы. На фоне увеличения продуктов СПОЛ в плазме крови крыс 1-й опытной группы отмечается снижение активности ферментов антиоксидантной защиты по сравнению с соответствующими показателями беременных крыс контрольной группы. Активность СОД в плазме крови крыс 1-й опытной группы на 32,05 %, а КАТ на 52,56% имели статистически достоверно низкий показатель по сравнению с образцами плазмы крови контрольных самок. Полученные результаты позволяют считать, что длительное *per os* поступление в организм беременных крыс преднизолона изменяет равновесие в системе «прооксиданты-антиоксиданты». Увеличение в крови продуктов СПОЛ и формирование антиоксидантной недостаточности является признаком развитием ОС в организме матери [9]. Несовершенные механизмы синтеза ферментов антиоксидантной защиты в фетальный период обуславливают высокую чувствительность тканей плода к свободнорадикальному повреждению. Это явилось основанием для изучения реакции, наименее резистентной к СПОЛ, хрящевой ткани формирующегося позвоночного столба плодов. Считается, что в связи с особенностями метаболизма клеток хрящевой ткани последние являются наиболее чувствительными к влиянию АКМ и токсических продуктов СПОЛ [11]. В связи с тем, что формирование костной модели тела позвонка в раннем периоде онтогенеза проходит через хрящевую стадию, свободнорадикальный механизм определяет возможность повреждения тканей фетального осевого скелета.

Для проверки данной гипотезы использовался метод морфогистохимического анализа, позволяющий на тканевом уровне оценить степень свободнорадикального повреждения хрящевых моделей тел позвонков плодов крыс и возможность управления данным процессом с использованием антиоксиданта тиофана.

На обзорных препаратах тела позвонков плодов крыс 18-суточного возраста контрольной и опытной групп выполнены гиалиновой хрящевой тканью. Пластинка роста тела позвонка в данный возрастной период не сформирована. В хрящевой модели тела позвонка идентифицируется зона роста, которая представлена радиально расположенными вокруг центра оссификации хондробластами различного уровня дифференцировки. Несмотря на общность гистологического строения фетального тела позвонка животных всех исследуемых групп, хрящевая ткань имеет ярко выраженные качественные и количественные различия.

По данным морфометрического анализа у плодов, полученных от матерей 1-й опытной группы, каудо-краниальные размеры на 39,23%, а ширина формирующегося тела позвонка на 37,81% меньше аналогичных

значений плодов, полученных от крыс контрольной группы. При этом в клеточном составе тела позвонка плодов крыс 1-й опытной группы регистрируется увеличение количества хондробластов на единицу площади (рис. 1, а, б). Основная популяция клеток зоны роста тела позвонка плодов 1-й группы представлена мелкими хондробластами округлой формы с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Данные клетки располагаются преимущественно в одиночных лакунах. Межклеточный матрикс выражен незначительно и проявляет слабобазофильную окраску. О низкой синтетической активности хондробластов свидетельствует незначительное содержание в цитоплазме гликогена и сульфатированных ГАГ. Площадь, занимаемая гипертрофированными клетками в образцах плодов крыс 1-й опытной группы, на 29,87 % ниже, чем у плодов, полученных от контрольных крыс в данный возрастной период.

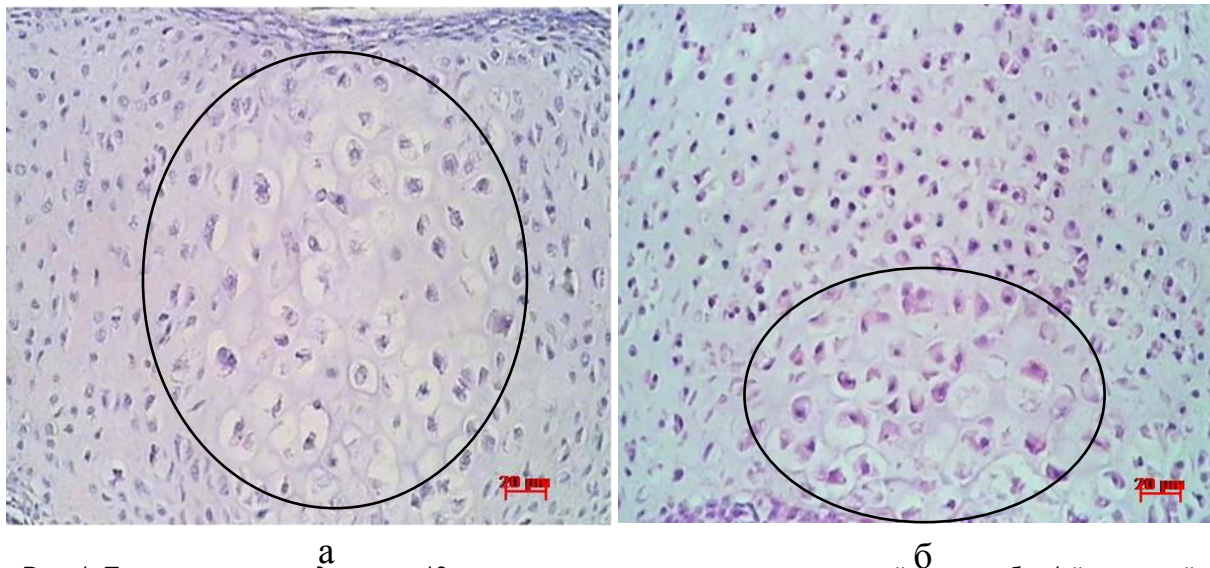


Рис. 1. Тело позвонка плодов крыс 18-суточного возраста: а – контрольной группы; б – 1-й опытной группы. Овалом обозначена зона гипертрофированных клеток. Гематоксилин и эозин. Ув. 100 х.

Преобладание в теле позвонка плодов крыс 1-й опытной группы низкодифференцированных клеток и наличие единичных гипертрофированных клеток в центре зоны роста свидетельствуют о низких темпах дифференцировки хондробластов, а следовательно, темпов роста осевого скелета по сравнению с контролем (см. рис. 1, б).

Совокупность результатов биохимического и морфологического анализа позволяют считать, что ОС матерей является фактором, ограничивающим дифференцировку хондробластов, интенсивность темпов роста и формирование костной модели тела позвонка.

При сочетанном использовании глюкокортикоидов и антиоксиданта тиофана в плазме крови беременных крыс 2-й опытной группы установлено снижение показателей СПОЛ и увеличение активности ферментов антиоксидантной защиты по сравнению с показателями крыс 1-й опытной группы. Установлено, что концентрация МДА в плазме крови беременных крыс, получавших антиоксидант тиофан, статистически достоверно снижена на 33,78%, а ДК – на 44,78%. При этом уровень активности СОД превышал на 26,93% активность соответствующего фермента крыс 1-й опытной группы. Активность каталазы в образцах плазмы крови крыс 2-й опытной группы возрастает и не имеет достоверных отличий от контрольных значений.

При анализе препаратов в проходящем свете степень дифференцировки и линейные размеры тел позвонков плодов, полученных от матерей 1-й и 2-й опытных групп, имеют отчетливые различия.

С краниальной и каудальной поверхности тело позвонка представлено низкодифференцированными клетками округлой формы с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 2). Степень дифференцировки клеток возрастает по направлению от периферии к центру тела позвонка. Это находит свое отражение в уменьшении ядерно-цитоплазматического отношения хондробластов, снижении содержания клеток на единицу площади (рис. 3, в), за счет синтеза компонентов хрящевого матрикса. С увеличением степени дифференцировки хондробластов происходит изменение их морфологии. Хондробласты увеличиваются в размерах, принимают округлую форму. Обильная цитоплазма клеток умеренно окрашивается гематоксилином, что отражает их повышенную синтетическую активность.

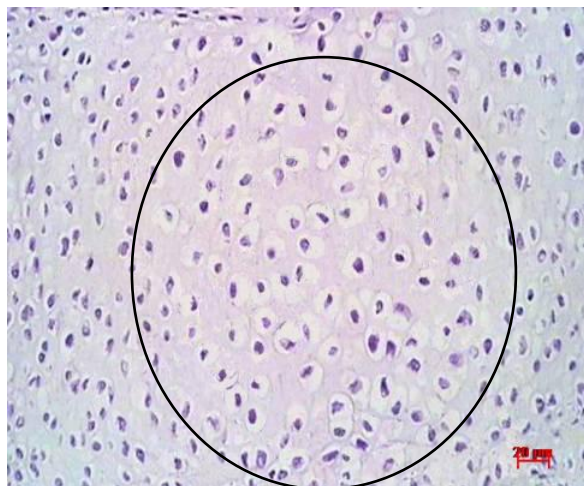
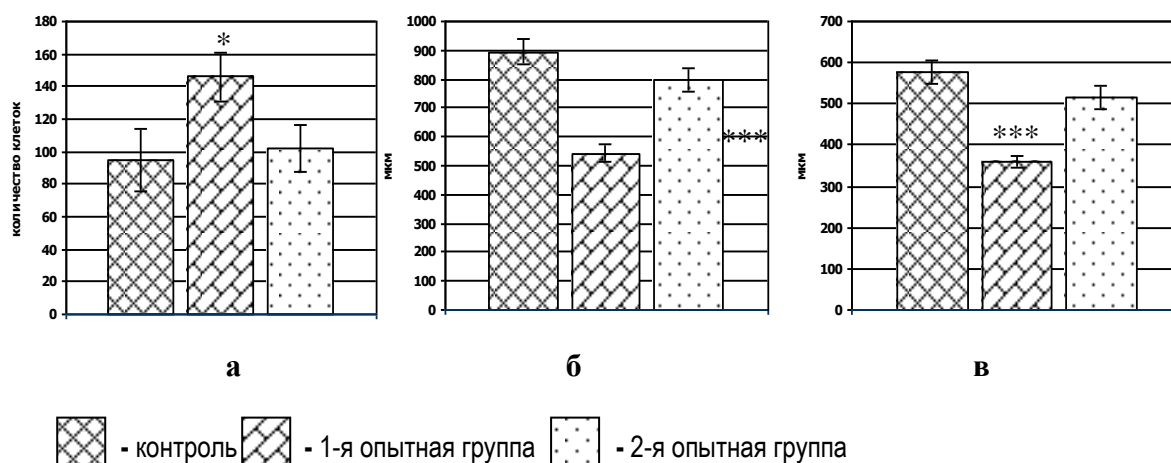


Рис. 2. Тело позвонка плодов крыс 2-й опытной группы 18-суточного возраста. Овалом обозначена зона гипертрофированных клеток. Гематоксилин и эозин. Ув. 100 х.



Примечание. Достоверные различия с контрольной группой (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Рис. 3. Морфометрические показатели тела позвонка плодов крыс: а – показатель ядерно-цитоплазматического отношения; б – каудо-краниальные размеры; в – ширина тела позвонка

Подтверждением этому может служить значительное содержание в цитоплазме гликогена, который обеспечивает энергозависимый транспорт клетки и является исходным соединением для биосинтеза протеогликанов. Результаты морфометрического анализа показали, что каудо-краниальные размеры на 31,37 %, а ширина на 30,51 % превышает аналогичные показатели плодов крыс 1-й опытной группы. Площадь, занимаемая гипертрофированными клетками, на 26,76 % больше аналогичного значения плодов крыс 1-й опытной группы.

Таким образом, результаты исследований на лабораторных животных показали, что одним из механизмов ответной реакции организма беременных самок на введение ГК является увеличение активности свободнорадикальных процессов. В условиях несовершенной системы регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза у плодов, повышение в организме матери уровня СПОЛ, сопряженное со снижением активности системы антиоксидантной защиты, оказывает влияние на замедление дифференцировки хондробластов зон роста тел позвонков у плодов. Увеличения параметров линейных размеров тел позвонков у плодов матерей, которые на фоне ОС получали антиоксидант тиофан, являются доказательством высокой роли СПОЛ в процессах фетального хондрогенеза и обосновывают использование антиоксидантных соединений для оптимизации процесса роста осевого скелета животных в условиях хронического стресса.

## Литература

1. *Абрамченко В.В.* Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве. – СПб., 2001. – 400 с.
2. *Аккер Л.В., Варшавский Б.Я.* Показатели оксидантного и антиоксидантного статуса у беременных с гестозом // Акушерство и гинекология – 2000. – № 4. – С. 17–20 .
3. *Афанасьева Н.В., Стрижаков А.Н.* Исходы беременности и родов при фетоплацентарной недостаточности различной степени тяжести // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2007. – Т.3, № 2. – С. 7–13.
4. Показатели процесса деградации белков и антиокислительной системы при нормальной беременности / *С.О. Бурмистров [и др.]* // Акушерство и гинекология. – 2001. – № 6. – С. 17–20.
5. *Громько Г.Л., Шпаков А.О.* Современные представления о механизмах регуляции кровообращения в плаценте при физиологической и осложненной беременности // Вестн. Рос. ассоциации акушеров-гинекологов. – 1995. – № 4. – С. 35–41.
6. *Евсюкова И.И., Савельева Т.В.* Свободнорадикальное окисление у доношенных новорожденных детей с различной патологией // Педиатрия. – 2005. – №1. – С. 13–16.
7. *Зиганшина Л.Е., Бурнашева З.А., Валеева И.Х.* Сравнительное изучение эффективности димефосфона и ксидофона при стероидном остеопорозе у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – № 6. – С. 55–56.
8. *Корольюк М.А.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С.16–19.
9. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / *Е.Б. Меньщикова [и др.]*. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
10. Определение резистентности к окислению липопротеинов низкой плотности сыворотки крови: метод, рекомендации / сост. *Ю.И. Рагина, М.И. Душкин*. – Новосибирск, 1998. – 11с.
11. *Павлова В.Н.* Хрящ. – М.: Медицина, 1988. – 320 с.
12. *Стальная И.Д.* Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – 391 с.
13. *Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н.* Молекулярно-клеточные механизмы индукции свободнорадикального окисления в условиях патологии // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 6 – С. 21–26.
14. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress; a possible factor in human early pregnancy failure / *E. Jauniaux [et al.]* // Am. J. Pathol. – 2000. – Vol. – 157. – P. 2111–2122.
15. *Laihia J.K., Jansen C.T.* Lucigenin and linoleate enhanced chemiluminescent assay for superoxide dismutase activity // Free Radic. Biol. Med. – 1993. – Vol. 14. – P. 457–461.
16. *Sharma J.B., Sharma A., Bahadur A.* Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia // International Journal of Gynecology and Obstetrics. – 2006. – Vol. 94. – P. 23–27.

