

© Торянік Е. Л.

УДК 618. 2-085. 844. 6

Торянік Е. Л.

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТІВ ЗА УМОВ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ У ВАГІТНИХ ЩУРІВ

Національний фармацевтичний університет (м. Харків)

Зв'язок роботи з НДР університету: робота виконана в рамках науково-дослідної програми Національного фармацевтичного університету «Фармакологічні дослідження біологічно-активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування в медичній практиці», № держ. реєстрації 0103U000478.

Вступ. Невиношування вагітності є широко розповсюдженою патологією (її частота сягає 20-25% від усіх вагітностей), що виникає в результаті впливу різноманітних факторів [1]. Клінічно невинношування вагітності проявляється гострою або хронічною гіпоксією плоду та затримкою його розвитку. Часто вагітність і пологи супроводжуються високим ризиком, що обумовлює високий рівень перинатальних втрат [2]. При цьому дихальні порушення та аспіраційний синдром відмічаються у 11% малюків. Тому, впровадження в практику лікарських препаратів, які здатні уповільнювати процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) й коригувати гіпоксичні стани плоду – актуальна задача акушерства [1, 7]. Одним із відомих препаратів, що володіє цим видом фармакологічної активності й застосовується в акушерській практиці при гестозах, нефропатії вагітних, є есенціале [13]. У зв'язку з необхідністю розширення арсеналу антиоксидантів та гравідопротекторів, нашу увагу привернув такий препарат, як сальбутамолу гемісукцинат (сальгім). Сальгім містить залишок бурштинової кислоти, що зумовлює антигіпоксичну дію, яка вигідно доповнює токолітичний ефект даного препарату, відрізняючи його від інших β_2 -адреноміметиків [14]. Потребує зв'язування вплив даного препарату на стан процесів ПОЛ за умов моделювання фетоплацентарної недостатності.

Мета роботи – вивчити порівняльну характеристику ефективності антиоксидантів за умов фетоплацентарної недостатності у вагітних щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження виконано на 40 вагітних нелінійних щурах, масою 180,00 – 220,0 г, розподілених за методом рандомізації на 4 рівних групи. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах»,

ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Тварини 1-ої групи – щури з фізіологічним перебігом вагітності, яким з 10-11 дня вагітності протягом 7 днів вводили підшкірно розчинник – масло соняшникове (0,5 мл/кг) 1 раз на добу та внутрішньошлунково 0,5 мл дистильованої води 2 рази на добу. У щурів трьох інших груп моделювали фетоплацентарну недостатність токсичного генезу. З цією метою, з 10-11 дня вагітності протягом 7 днів вводили підшкірно 50% масляний розчин тетрахлорметану в дозі 0,5 мл/кг. Тварини II групи – вагітні щури з тетрахлорметановою фетоплацентарною недостатністю, без лікування. Третя група щурів за 2 год до й через 2 год після ін'єкції розчину тетрахлорметану отримували сальбутамолу гемісукцинат (сальгім, «Фармавіта», РФ) у дозі 30 мг/кг, IV група – препарат порівняння есенціале («Rhône-Poulenc Rorer», Німеччина) у дозі 200 мг/кг. Через тиждень, на 17-18-й день вагітності, після годування протягом 14-16 год, щурів декапітували під наркозом (етамінал-натрій, 35 мг/кг). Сироватку крові заморожували та зберігали у рідкому азоті до початку аналізу. Печінку, плаценту та матку гомогенізували у 100 мМ трис-буфері (рН 7,4) у співвідношенні 1:3. Рівень гідроперекисів ліпідів у сироватці крові та у гомогенатах тканин визначали спектрофотометрично за загальноприйнятими методами, виражаючи їхній вміст у еквівалентних кількостях малонового альдегіду (МДА) [10, 12]. Антиокиснювальну активність сироватки крові аналізували за методом [8, 3]. Про активність супероксиддисмутази (СОД) у гомогенатах органів судили за інгібуванням реакції відновлення нітротетразолію синього супероксидними радикалами, що генеруються у есантин-ксантинооксидазній системі. Визначали активність глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази та каталази [11]. Вміст білка в пробах визначали за Лоурі [8]. Процеси ПОЛ є тісно пов'язаними з морфофункціональним станом клітинних мембран, основним компонентом яких є фосfolіпіди. Встановлені в експерименті антиоксидантні властивості сальгіму є обґрунтованими доцільності його застосування при патології вагітності, що супроводжується підвищенням інтенсивності процесів ПОЛ [13]. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакета програм Statistica for Windows 6,0 з використанням

Таблиця 1

Вплив сальгіму й есенціале на прооксидантно-антиоксидантний баланс сироватки крові вагітних щурів за умов моделювання фетоплацентарної недостатності $M \pm m$, $n=10$

Показники	Умови досліджу			
	Контроль	CCl ₄	CCl ₄ + сальгім	CCl ₄ + есенціале
Гідроперекиси ліпідів, нмоль МДА/ мл	2,30±0,17	3,76±0,51*	2,36±0,24#	2,38±0,25#
Антиокиснювальна активність, %	48,4±4,7	31,6±3,7*	44,0±2,8#	39,4±3,9
Глутатіонпероксидаза, нмоль НАДФН /млхв	2545±168	2101±164	2331±256	2570±185
Глутатіон-S-трансфераза нмоль ХНБ /млхв	49,1±6,3	42,9±9,5	38,6±7,1	43,3±2,3

Примітка: у табл. 1-3 статистично значуща різниця ($p < 0,05$): * – щодо контролю; # – щодо тварин, які отримували CCl₄; ^ – щодо тварин, які отримували есенціале.

Таблиця 2

Вплив сальгіму та есенціале на прооксидантно-антиоксидантний баланс у печінці вагітних щурів за умов моделювання фетоплацентарної недостатності $M \pm m$, $n=10$

Показники	Умови досліджу			
	Контроль	CCl ₄	CCl ₄ + сальгім	CCl ₄ + есенціале
Гідроперекиси ліпідів, нмоль МДА/ мл	0,24±0,02	0,36±0,04*	0,26±0,02#	0,30±0,03#
МДА, пмоль /мг білка	21,3±2,26	33,9±2,96*	19,9±1,45#	22,8±0,76#
Супероксиддисмутаза, од. / мг білка	701±56,5	518±49,2*	676±45,8#	730±51,1#
Глутатіонпероксидаза, нмоль НАДФН /мг білкахв	171±30,6	132±17,7	123±19,5	135±20,3
Глутатіонредуктаза, нмоль НАДФН/ мг білкахв.	34,8±0,8	30,4±3,3	32,7±2,0	42,7±5,2

Таблиця 3

Вплив сальгіму та есенціале на прооксидантно-антиоксидантний баланс у плаценті й матці вагітних щурів, за умов моделювання фетоплацентарної недостатності $M \pm m$, $n=10$

Показники	Умови досліджу				
	Орган	Контроль	CCl ₄	CCl ₄ + сальгім	CCl ₄ + есенціале
Гідроперекиси ліпідів, нмоль МДА/ мл	П	0,3±0,02	0,5±0,03*	0,4±0,03#	0,4±0,02#
	М	0,4±0,01	1,0±0,12*	0,4±0,13#	0,4±0,03#
МДА, пмоль /мг білка	П	24,7±0,9	32,8±1,7*	26,0±2,2#	29,4±3,3
	М	25,1±4,65	55,8±6,1*	25,8±6,1#	25,9±4,2#
Супероксиддисму-таза, од. / мг білка	П	310±33	206±19*	263±33	220±22
	М	450±70	424±40	419±52	427±52
Глутатіонперокси-даза, нмоль НАДФН/ мг білкахв	П ПВ	47,7±3,1	37,5±2,0	41,2±1,2	41,9±4,4
	П ГК	59,7±2,2	48,1±2,0*	51,8±3,0	57,8±3,2
	М	105±10,5	84,7±4,3	102±8,3	96,5±7,7
Глутатіонредукта-за, нмоль НАДФН/ мг білкахв.	П	11,3±0,8	8,3±0,5*	8,9±0,4*	9,1±0,5*
	М	26,4±3,27	17,5±1,01*	20,0±1,3	19,5±1,05
Глутатіон-S-транс-фераза, нМ ХНБ/ мг білкахв.	П	15,0±1,6	11,0±0,8*	12,0±1,0	13,4±1,1
Каталаза, мкМ H ₂ O ₂ /мг білкахв.	П	12,5±1,33	8,98±0,57*	10,4±1,2	10,6±0,74

Примітка: П – плацента, М – матка, субстрати: ПВ – перекис водню, ГК – гідроперекис кумолу.

t-критерію Ст'юдента і кореляційного аналізу. Відмінності вважали достовірними при $< 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення.

Дані, наведені у табл. 1–3, свідчать про те, що моделювання фетоплацентарної недостатності, шляхом введення тетрахлорметану вагітним щурам, посилює процеси ПОЛ у крові, печінці, плаценті й, особливо, в матці експериментальних тварин. Так, вміст гідроперекисів ліпідів зріс, порівняно з контролем, у

середньому на 64 %, 50 %, 36 % та 181 %, відповідно. Вміст вторинного продукту ПОЛ – МДА збільшився у печінці й плаценті на 59 % та на 33 %, а у матці – на 122 %. Антиокиснювальна активність сироватки крові, яка є маркером стану неферментативного антиоксидантного захисту, зменшилася на 35 %, порівняно з цим показником у контрольних тварин (щури з фізіологічним перебігом вагітності).

Активність СОД – ферменту, що контролює перший рівень антиоксидантного захисту, – у печінці й у плаценті понижилася, відповідно на 26% та 34% (табл. 2, 3), а у гомогенатах матки не змінилася (табл. 3). Каталазна активність у гомогенатах плаценти щурів, які отримували тетрахлорметан, зменшилася на 28%, порівняно з контролем (табл. 3). Активність глутатіонпероксидази – основного ферменту, що утилізує гідроперекиси ліпідів, – у гомогенатах печінки практично не змінилася, у сироватці крові й у матці вона мала тенденцію до зниження, а в плаценті понижилася на 19%, при окисненні гідроперекису кумола, й на 21% – при окисненні перекису водню (табл. 1–3). У гомогенатах плаценти щурів, які отримували тетрахлорметан, виявлено також достовірне пониження глутатіон-S-трансферазної активності, тоді як у сироватці крові активність даного ферменту майже не зазнала змін (табл. 1, 3). Активність глутатіонредуктази у гомогенатах печінки не змінилася, а у гомогенатах матки й плаценти зменшилася, порівняно з контролем, на 34% та на 27% відповідно (табл. 2, 3).

Таким чином, активність всіх ферментів, що вивчалися, достовірно понижувалася тільки у плаценті щурів, котрим було введено тетрахлорметан; у матці не змінювалася активність СОД, а у печінці – глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази. Слід зазначити, що використана модель фетоплацентарної недостатності супроводжується пониженням надійності ферментативної та неферментативної антиоксидантних систем, а також активацією ПОЛ у крові й у всіх досліджуваних органах експериментальних тварин.

Застосування сальгіму у щурів з моделлю фетоплацентарної недостатності дозволило нормалізувати вміст первинних та вторинних продуктів ПОЛ у сироватці крові, гомогенатах печінки, плаценти та матки (табл. 1–3). Його ефективність перевищувала таку у препарату порівняння есенціалє. Сальгім відновлював антиокиснювальну активність сироватки крові тварин, які отримували тетрахлорметан, до рівня у контрольних тварин (табл. 1), що вказує на підвищення надійності неферментативної антиоксидантної системи. За впливом на активність антиоксидантних ферментів печінки за дією на активність пероксидази й каталази у плаценті, сальгім мало

відрізнявся від есенціалє (табл. 2, 3). Разом з цим, сальгім, як і есенціалє, не попереджував пониження глутатіонредуктазної активності у плаценті, яке викликалося тетрахлорметаном. Однак, щодо активності СОД плаценти, сальгім проявляв помірний захисний ефект, у той час як есенціалє був практично неефективним (табл. 3).

Таким чином, сальгім, як свідчать результати дослідження, нормалізує інтенсивність ПОЛ й збільшує надійність антиоксидантних систем не тільки у плаценті й матці, але й у крові та печінці вагітних щурів з моделлю фетоплацентарної недостатності токсичного генезу. Для акушерської практики нормалізація антиоксидантного статусу печінки має велике значення, оскільки його порушення часто спостерігаються при вагітності й супутніх екстрагенітальних захворюваннях, тяжких формах гестозу.

Есенціалє, що є складним фосфоліпідно-вітамінним комплексом, добре зарекомендував себе як мембранопротектор й антиоксидант. Його фосфоліпіди інтегруються в структуру мембрани й перешкоджають надмірному ПОЛ, ціанокобаламін та α -токоферол мають антиоксидантні властивості, а тіамін, рибофлавін, піридоксин, нікотинамід – антигіпоксичні. Ці фармакологічні властивості есенціалє обумовлюють його застосування при гестозах, нефропатії вагітних. Однак, як свідчать результати дослідів, за умов експериментальної фетоплацентарної недостатності, сальгім виявляв більш виражену антиоксидантну активність, ніж есенціалє.

Висновки.

1. Сальбутамолу гемісукцинат (сальгім) чинить антиоксидантну дію, яка верифікується за зменшенням накопичення продуктів вільнорадикального окиснення й підвищенням активності ферментів антиоксидантного захисту.

2. У плаценті сальгім сприяє нормалізації рівня малонового діальдегіду й активності супероксиддисмутази, однак не нормалізує активності глутатіонредуктази в тканинах плаценти.

3. Сальгім є найбільш ефективним антиоксидантом, ніж препарат порівняння есенціалє, за умов моделювання фетоплацентарної недостатності.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується вивчення ефективності антиоксидантів різних механізмів дії при фетоплацентарній недостатності.

Література

1. Абрамченко В. В. Антиоксиданти и антигипоксанти в акушерстве (Оксидативный стресс в акушерстве и его терапия антиоксидантами и антигипоксантами) / В. В. Абрамченко. – Спб.: ДЕАН, 2001. – 400 с.
2. Актуальные вопросы невынашивания беременности: сборник клинических лекций / Ю. Э. Доброхотова, Эм. Джебава, А. В. Степанян [и др.]. – М.: Медицина, 2007. – 96 с.
3. Арутюнян А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: метод. рекомендации / А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина. – СПб.: Фолиант, 2000. – 104 с.
4. Біотична експертиза до клінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: метод. реком. / О. Г. Резніков, А. І. Соловійов, Н. В. Добреля, О. В. Стефанов // Вісник фармакології та фармації. – 2006. – №7. – С. 47-67.
5. Кононский А. И. Гистохимия. Выявление сукцинатдегидрогеназы по Нахласу, Валькеру и Зилегману / А. И. Кононский. – К.: Вища школа, 1976. – С. 175-176.
6. Королюк М. А. Определение активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова // Лаб. дело. – 1998. – № 1. – С. 16-19.

7. Малевич Ю. К. Фетоплацентарная недостаточность / Ю. К. Малевич, В. А. Шостак. – Минск: Белорусь, 2007. – 158 с.
8. Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – 17-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна: издатель Умережков, 2011. – 1216 с.
9. Никитин А. И. Вредные факторы среды и репродуктивная система человека (ответственность перед будущими поколениями) / А. И. Никитин. – СПб.: ЭЛБИ – СПб., 2005. – 216 с.
10. Радзинский В. Е. Биохимия плацентарной недостаточности / В. Е. Радзинский, П. Я. Смальков. – М.: Изд-во РУДН, 2011. – 273 с.
11. Сидельникова В. М. Привычная потеря беременности / В. М. Сидельникова. – М.: Триада – X, 2002. – 158 с.
12. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современ. методы в биохимии / Под ред. В. Н. Орехович. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
13. Филиппов О. С. Плацентарная недостаточность / О. С. Филиппов, Е. В. Карнаухова, А. А. Казанцева. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 160 с.
14. Шевелева Г. А. Корректирующие свойства сальгима при патологических состояниях системы мать-плод / Г. А. Шевелева, В. С. Акиншина, В. Т. Филимонов, С. Я. Скачилова // Бюлл. Всеросс. научн. Центра по безопасности БАВ. – Кургановна, 2001. – С. 48-57.
15. Starzyk K. A. A placental pathology view of preterm labor: villous and uteroplacental vascular pathology [Электронный ресурс] / K. A. Starzyk, C. M. Salafia // Medscape women's health journal. – 2010. – Vol. 5, №6. – Режим доступа <http://www.medscape.com/viewarticle/408936>.

УДК 618.2-085.844.6

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТІВ ЗА УМОВ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ У ВАГІТНИХ ЩУРІВ

Торянік Е. Л.

Резюме. Метою роботи було вивчити порівняльну характеристику ефективності антиоксидантів за умов фетоплацентарної недостатності у вагітних щурів. У досліджах на вагітних щурах з моделлю фетоплацентарної недостатності, що була викликана тетрахлорметаном, встановлено, що β_2 -адреноміметик сальбутамолу гемісукцинат (сальгім) володіє антиоксидантною активністю. Даний ефект відмічається в сировотці крові, тканинах печінки, матки та плаценти. У плаценті сальгім сприяє нормалізації рівня малонового діальдегіду й активності супероксиддисмутази, однак не нормалізує активності глутатіонредуктази в тканинах плаценти. Антиоксидантна активність сальгіма вище, ніж у препарата порівняння есенціале.

Ключові слова: фетоплацентарна недостатність, антиоксидантний та прооксидантний стан, сальгім, есенціале.

УДК 618.2-085.844.6

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ В УСЛОВИЯХ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС

Торяник Э. Л.

Резюме. Целью работы явилось изучение сравнительной характеристики эффективности антиоксидантов в условиях фетоплацентарной недостаточности у беременных крыс. В опытах на беременных крысах с моделью фетоплацентарной недостаточности, вызванной введением тетрахлорметана, установлено, что β_2 -адреномиметик сальбутамолу гемісукцинат (сальгим) обладает антиоксидантной активностью. Данный эффект отмечается в сыворотке крови, тканях печени, матки и плаценты. В плаценте сальгим способствует нормализации уровня малонового диальдегида и активности супероксиддисмутази, однако не нормализует активность глутатионредуктазы в тканях плаценты. Антиоксидантная активность сальгима выше, чем у препарата сравнения эсенциале.

Ключевые слова: фетоплацентарная недостаточность, антиоксидантное и прооксидантное состояние, сальгим, эсенциале.

UDC 618.2-085.844.6

Comparative Effectiveness of Antioxidants in Fetoplacental Insufficiency in Pregnant Rats

Toryanik Ye. L.

Abstract. Introduction. Noncarrying of pregnancy is a common pathology (its frequency is 20-25% of all pregnancies) that arises as a result of the influence of various factors.

The purpose of the research is to study comparative effectiveness of antioxidants in fetoplacental insufficiency in pregnant rats.

Object and methods of research. The research has been carried out on 40 pregnant outbred rats, weighted 180, 00–220, 0 g. Superoxide dismutase (SOD) activity in organs' homogenates had been estimated at inhibition of reduction of nitro tetrazolium blue by superoxide radicals, generated in xanthine-xanthine oxidase system. Activity of glutathionreductase, glutathionperoxidase, glutathione-S-transferase and catalase has been estimated. Antioxidant properties of Salgim®, discovered during the experiment, are the grounds for appropriateness of its use in pregnancy failure, associated with lipid peroxidation (LPO) intensive elevation.

Results of the research and their discussion. The obtained data showed that modeling of fetoplacental insufficiency, caused by introduction of chlorinated carbon to pregnant rats, reinforces LPO processes in blood, liver, placenta and, especially, in uterus of experimental rodents. In this way content of lipid hydroperoxides increased by the average of 64 %, 50 %, 36 % and 181 %, respectively, as compared with control. Content of malonic dialdehyde (MDA), i. e., secondary product of LPO, increased in liver and placenta by 59 % and by 33 %, respectively, and by 122 % in uterus. Serum antioxidant activity, which is the marker of nonenzymatic antioxidant protection condition, decreased by 35 %, as compared with this index in controlling rodents (rats with physiological pregnancy course).

The activity of all enzymes under study was decreased significantly only in placenta of rats, which were introduced with chlorinated carbon; no changes of SOD activity in uterus and activity of glutathionperoxidase and glutathionreductase in liver have been observed.

Application of Salgim® in rats with modeled fetoplacental insufficiency resulted in LPO primary and secondary products' content normalization in blood serum, liver homogenates, placenta and uterus. Its effectiveness was greater, as compared with Essentiale® preparation. Salgim® reduced serum antioxidant activity of rodents, which were introduced with chlorinated carbon, to the level of controlling animals, indicating the increase of reliability of nonenzymatic antioxidation. Salgim® showed nearly the same effect as Essentiale® as for the influence on liver antioxidant enzymes' activity and impact on the activity of peroxidase and catalase in placenta. At the same time both Salgim® and Essentiale® did not prevent decrease in activity of glutathionreductase in placenta, caused by chlorinated carbon. However, Salgim® showed a moderate protective effect as for SOD activity in placenta, while Essentiale® was practically ineffective.

Thus, findings on Salgim® effectiveness showed that it normalizes LPO intensity and increases the reliability of antioxidant systems not only in placenta and uterus, but also in blood and liver of pregnant rats with modeled toxic fetoplacental insufficiency. Normalization of liver antioxidant status is of particular importance for obstetrics, since its disorders are frequently occurred during pregnancy and in associated extragenital diseases and severe forms of gestosis.

Conclusions. Salbutamol hemisuccinate (Salgim®) is of antioxidant effect, verified by the decrease in free radical oxidation products' accumulation and increase in activity of enzymes of antioxidant protection. Salgim® facilitates normalization of malonic dialdehyde level in placenta and activity of superoxide dismutase, although no normalization of glutathionreductase activity has been detected in placenta tissues. Salgim® is the most effective antioxidant as compared with Essentiale® in modeling of fetoplacental insufficiency.

Key words: fetoplacental insufficiency, antioxidant and prooxidant condition, Salgim®, Essentiale®.

Рецензент – проф. Дев'яткіна Т. О.

Стаття надійшла 5. 03. 2014 р.