

ВЛИЯНИЕ ДОНОРА СЕРОВОДОРОДА НА СЕНСО-МОТОРНОЕ РАЗВИТИЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

А.Р. Зиганшина, А.В. Попова, Н.Н. Хаертдинов, Е.В. Герасимова, О.В. Яковлева

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия, e-mail: a-olay@yandex.ru

Гомоцистеин (ГЦ) — это серосодержащая аминокислота, не являющаяся структурным элементом белков. ГЦ синтезируется из метионина за счет удаления терминальной метильной группы [Butkowski, 2016]. ГЦ способен оказывать токсическое воздействие на клетку, поэтому существуют механизмы выведения его в кровь [Hague, 2003]. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) — это заболевание, связанное с повышенным содержанием ГЦ (более 15 мкм/л) в плазме крови, что ведет к повреждению и активации эндотелиальных клеток, выстилающих стенки сосудов и повышает риск тромбозов, запускает атерогенный процесс [Арутюнян и др., 2010]. ГЦ способен проникать через плаценту, оказывать токсическое действие на плод и приводить к врожденным дефектам развития нервной системы плода [Hague, 2003; Арутюнян и др., 2010; Gerasimova et.al., 2017].

Сероводород (H₂S) хорошо известен как токсичный газ. Однако относительно высокие концентрации H₂S были обнаружены в мозге крысы и человека [Ситдикова и др., 2014]. В настоящее время известно, что H₂S может модифицировать функции нейронов и глиальных клеток [Reiffenstein, 1992]. Мутации ферментов синтеза H₂S наблюдаются при таком заболевании как ГГЦ. Клинический фенотип пациентов с этим заболеванием включает умственную отсталость, мышечные расстройства и сосудистые заболевания. Возможно, что некоторые из этих нарушений связаны с пониженным синтезом H₂S в мозге [Hague, 2003; Ситдикова и др., 2014].

Целью данного исследования было изучение влияния донора сероводорода на сенсорно-моторное развитие и двигательную активность крысят в контроле и при пренатальной гипергомоцистеинемии.

Объектом исследования были крысы линий Wistar в возрасте от 2 до 26 дня. Крысы были разделены на 4 группы: 1) контрольная (К) - крысята (n=53) полученные от самок находящихся на стандартном рационе питания; 2) гомоцистеиновая (ГГЦ) - крысята (n=53) от самок на метиониновой диете (7.7 мг/кг); 3) сероводородная (HS) - крысята (n=36) от самок на стандартной диете, получавших инъекции донора сероводорода NaHS (3 мг/кг) перед планированием, во время беременности и в период кормления детенышей; 4) опытная сероводородная (ГГЦ+HS) - крысята (n=34) от самок на метиониновой диете, получавших инъекции донора сероводорода NaHS (3 мг/кг).

У животных всех групп оценивалось физическое развитие и смертность в помете: определяли вес при рождении и количество животных в одном помете, регистрировался день отлипания ушной раковины, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов и открытия глаз. Для исследования соматосенсорного созревания в крысят использовали стандартную батарею тестов по оценке развивающегося поведенческого фенотипа крыс в период вскармливания [Миронов, 2012]. Формирование вестибулярной реакции и координации движений наблюдали в тестах «Избегание обрыва», «Переворачивание на плоскости», «Переворачивание в свободном падении», «Отрицательный геотаксис», развитие мышечной силы и тонуса — в тесте «Удержание на горизонтальной сетке» на 4, 16 и 26 день жизни; регистрировали появление обонятельной реакции, а также реакции на акустический стимул (таблица 2) [Миронов, 2012].

Статистическая обработка результатов. Для статистического анализа использовалась программа Origin 8.5. Все результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего. Сравнение средних проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. p - уровень значимости для непараметрических выборок: $*/\#$ - приемлемая граница значимости ($p \leq 0.05$).

В группах HS, ГГЦ и ГГЦ+HS при оценке физического развития крысят (отлипание ушной раковины, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз) не отмечено значимых отставаний в развитии при сравнении с показателями контрольных животных.

Наиболее важным показателем соматического развития животных является масса тела при рождении. В потомстве самок с ГГЦ наблюдается достоверное снижение массы тела крысят при рождении 6.04 ± 0.15 гр. ($n=53$, $p \leq 0.05$), относительно контрольной группы 7.97 ± 0.62 гр. ($n=53$) без изменения среднего количества крысят в помете (8.6 ± 1.2 шт и 8.4 ± 1.6 шт). Известно, что ГГЦ на поздних сроках беременности является причиной развития хронической фетоплацентарной недостаточности и хронической внутриутробной гипоксии плода. Это приводит к рождению детей с низкой массой тела и снижению функциональных резервов всех жизнеобеспечивающих систем новорожденного и развитию целого ряда осложнений периода новорожденности [Арутюнян и др., 2010].

У новорожденных HS группы наблюдалось увеличение массы тела (8.16 ± 0.41 гр., $n=36$, $p \leq 0.05$) и количества крысят в помете (13.3 ± 1.5 шт., $p \leq 0.05$), относительно контрольной группы (7.97 ± 0.62 гр. и 8.6 ± 1.2 шт.). У новорожденных группы ГГЦ+HS наблюдали увеличение количества крысят в помете (13.5 ± 1.0 , $p \leq 0.05$) относительно животных ГГЦ (8.4 ± 1.6 шт.), что, по-видимому, является причиной снижения средней массы при рождении (6.32 ± 0.12 гр.).

Анализ сенсо-моторного развития крысят показал, что у животных ГГЦ группы наблюдается замедление формирования сенсорно-моторных рефлексов, относительно контрольной группы (Таблица 2). Крысята HS группы в большинстве сенсо-моторных тестов показала результаты, сопоставимые с контролем, а в тесте «переворот на плоскости» значительно их превзошла (Таблица 2). Инъекции донора сероводорода крысам с ГГЦ привели к тому, что крысята ГГЦ+HS группы во всех тестах показали результаты, близкие к контрольным и достоверно отличающиеся от результатов ГГЦ группы (Таблица 2).

В контрольной группе в тесте «Удержание на горизонтальной сетке» с возрастом увеличивается время пребывания крысенка на сетке 2.6 ± 0.3 , 20.9 ± 5.1 и 107.1 ± 7.9 секунд на 4, 16, 26 день жизни соответственно. В ГГЦ группе наблюдается снижение времени пребывания крысенка на сетке, и чем старше животное, тем сильнее наблюдаемые изменения (1.6 ± 0.4 , 8.3 ± 1.2 и 75.2 ± 8.1 секунды, $p < 0.05$). В HS группе время пребывания крысенка на сетке не отличалось от контрольной группы. В ГГЦ+HS группе время пребывания крысят на сетке соответствовало контрольным значениям (2.2 ± 0.2 , 15.8 ± 3.3 и 96.1 ± 14.3 секунд). При оценке развития мышечной системы на ранних сроках жизни у крысят от самок с ГГЦ наблюдается снижение выносливости и силы мышц. Инъекции донора сероводорода самкам с ГГЦ во время беременности и кормления частично снимали данные патологические изменения.

Активные формы кислорода являются нормальными продуктами жизнедеятельности клетки, но высокая их продукция при ГГЦ является основным фактором патологического действия гомоцистеина в клетке и плазме [Аллилуев, 2015]. Помимо нейромодуляторной сероводород также оказывает нейропротекторное действие в условиях окислительного стресса [Ситдикова и др., 2014]. Таким образом, можно предположить, что сероводород может оказывать нейропротекторные эффекты на развитие потомства в условиях пренатальной ГГЦ.

Таблица 2 Эффекты материнской гипергомоцистеинемии и антиоксидантной терапии на формирование рефлексов у потомства

Параметры	К группа	ГГЦ группа	HS группа	ГГЦ+HS группа
Отрицательный геотаксис (день формирования рефлекса)	6.09 ± 0.18	$6.71 \pm 0.16^*$	6.08 ± 0.10	4.83 ± 0.25
Переворот на плоскости (день формирования рефлекса)	5.96 ± 0.21	6.14 ± 0.14	$4.78 \pm 0.19^*$	$5.00 \pm 0.14^{* \#}$
Переворот на плоскости (время, сек) P=6	1.58 ± 0.15	$2.68 \pm 0.12^*$	1.45 ± 0.13	$1.34 \pm 0.13^{\#}$
Избегание обрыва (день формирования рефлекса)	5.90 ± 0.18	$7.28 \pm 0.24^*$	5.03 ± 0.15	$4.28 \pm 0.13^{\#}$

Реакция на акустический стимул (день формирования рефлекса)	9.54±0.21	10.35±0.29	8.61±0.65	10.53±0.28
Избегание обрыва, вызванное визуальным стимулом (день формирования рефлекса)	13.94±0.35	15.91±0.29*	14.36±0.30	14.44±0.17 [#]
Переворот в падении (день формирования рефлекса)	13.3±0.41	18.23±0.39*	13.85±0.18	13.70±0.23 [#]
Обоняние (день формирования рефлекса)	13.57±0.39	16.53±0.47*	13.83±0.21	13.75±0.31 [#]

* $p \leq 0.05$ по отношению к контрольной группе

[#] $p \leq 0.05$ по отношению к ГГЦ группе

Поддержано фондом РФФ №- 14-1500618п.

Список литературы

Butkowski E.G., Al-Aubaidy H.A., Jelinek H.F. Interaction of homocysteine, glutathione and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in metabolic syndrome progression // *Clinical Biochemistry* – 2016 – Vol 50 – pp 116-120.

Hague W.M. Homocysteine and pregnancy. // *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* – 2003 – Vol. 17 – pp 459 – 469.

Арутюнян А.В., Козина Л.С., Арутюнов В.А. Токсическое влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на потомство // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2010. – Т LIX(4) – с. 16-20.

Gerasimova E., Yakovleva O., Burkhanova G., Ziyatdinova G., Khaertdinov N., Sitdikova G. Effects of Maternal Hyperhomocysteinemia on the Early Physical Development and Neurobehavioral Maturation of Rat Offspring // *BioNanoScience* 2017 - Vol 7, [11](#) - pp 155–158.

Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В., Зефирова А.Л. Газомедиатора: от токсических эффектов к регуляции клеточных функций и использованию в клинике. // *Бюллетень сибирской медицины*, 2014, том 13, № 6, с. 185–200.

Reiffenstein R.J., Hulbert W.C., Roth S.H. Toxicology of hydrogen sulfide // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1992. V. 32. P. 109–134.

Мионов А.Н., Бунатян Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: в 2 т. М.: Гриф. и Ко. 2012. 944 с.

Аллилуев И.А., Вечканов Е.М., Сорокина И.А., Калюжная Ю.Н. и др. Состояние глутатионовой системы в тканях крыс при травме опорно-двигательного аппарата в условиях метионин индуцированной гипергомоцистеинемии. // *Медицинский вестник Юга России*. - 2015 – №3 - с. 18-24.