

УДК [591.3 + 591.17]:557.115.3

ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ПРЕДОТВРАЩАЮТ РАЗВИТИЕ ЛОКОМОТОРНЫХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЕМ НЕЙРОГУМОРАЛЬНОГО ФОНА У КРЫСЯТ

© 2010 г. Т. В. Авалиани, Н. С. Абдаладзе, Н. С. Лазаренко, В. М. Клименко

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН

197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12

E-mail: tanaavaleeani@mail.ru

Поступила в редакцию 25.05.09 г.

Окончательный вариант получен 16.07.09 г.

Показана эффективность применения полиненасыщенных жирных кислот у крыс в период беременности для предотвращения развития нарушений поведения новорожденного, вызванного воздействием патогенных пептидных факторов сыворотки крови, с перинатальным поражением центральной нервной системы.

Ключевые слова: ранний онтогенез, локомоторные нарушения, коррекция поведения, полиненасыщенные жирные кислоты, крысы.

Перинатальные поражения нервной системы и разработка возможных способов их коррекции продолжают оставаться в центре внимания научной и практической педиатрии. В структуре детской инвалидности поражения нервной системы составляют около 50%, при этом заболевания, приводящие к инвалидности и дезадаптации детей, в 70–80% случаев обусловлены перинатальными нарушениями (Пальчик, Шабалов, 2006). Среди многочисленных повреждающих факторов перинатального периода особо следует выделять гипоксию, которая может быть отнесена к универсальным повреждающим агентам (Барашнев, 2005; Журавин и др., 2009). Патогенетические механизмы гипоксически-ишемического поражения центральной нервной системы связаны с нарушениями мозгового кровотока и обмена нейротрансмиттеров, изменением реологических свойств крови, метаболическими отклонениями, а также гибелью нейронов и изменением пластичности нейронных сетей (Михеева и др., 2008; Журавин и др., 2009).

Гипоксия, независимо от механизмов, стимулирующих ее развитие, реализуется через активацию процессов перекисного окисления мембранных фосфолипидов, а избыточное накопление продуктов перекисного окисления приводит к нарушениям на уровне клеточных мембран отдельных клеток и целого органа. Показана патогенетическая значимость дестабилизации липидных мембран, в том числе клеточных мембран головного мозга, у новорожденных с перинатальными поражениями центральной нервной системы (Резник и др., 1990). У детей, перенесших внутриутробную гипоксию и ас-

фиксию при рождении и имеющих клинические симптомы нарушения мозгового кровообращения, изменена проницаемость эритроцитарных мембран в отличие от здоровых новорожденных. Нарушение структурно-функционального состояния клеточных мембран является ключевым звеном в патогенезе поражений мозга у плода и новорожденного в результате хронического и/или кратковременного воздействия гипоксии (Додхоев и др., 2000). Было показано, что в сыворотке крови новорожденных детей с неврологическими расстройствами и в амниотической жидкости, взятой у их матерей во время родов, обнаружены пептидные факторы, указывающие на наличие явных или скрытых форм двигательной патологии у новорожденного (Авалиани и др., 1994). Такие нарушения предопределяют развитие устойчивых расстройств поведения в процессе онтогенеза (Незговорова и др., 1994). Экспериментальное введение сыворотки крови таких детей и/или амниотической жидкости рожениц беременным самкам крыс вызывает эмбриотоксический эффект и нарушение двигательных функций у потомства крыс, которые выявляются и в отдаленный период развития (Авалиани и др., 1992, Абдаладзе и др., 1994). Внутриамниотическое введение крысам на 14-й день беременности сыворотки крови детей с двигательными расстройствами приводит к изменениям локомоторного поведения крысят по сравнению с интактными животными и крысятами, матерям которых вводилась сыворотка крови здоровых детей (Атаева и др., 1993). Морфологический анализ коры мозга крысят, подвергшихся внутриутробному воздействию сыворотки крови детей с двигательной па-

тологией, выявил уменьшение площади дендритного дерева и количества нейронов в моторной области коры, что задерживает нормальное по временным характеристикам образование синаптического аппарата пирамидных нейронов (Обухова и др., 1992).

Перспектива коррекции жирнокислотного состава биологических мембран привела к использованию замещения арахидоновой кислоты в мембране жирными кислотами ряда ω -3, блокирования ими метаболизма арахидоновой кислоты и синтеза из полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) ω -3 противовоспалительных факторов (Прахин, Терещенко, 2000). Действительно, при воздействии пептидных факторов сыворотки крови, вызывающих двигательные нарушения у потомства, введение в рацион беременных крыс ПНЖК ω -3 уменьшает эмбриолетальность, увеличивает индекс жизнеспособности и массу новорожденных крысят, приводит к нормализации простых двигательных актов и предохраняет от развития грубых двигательных нарушений (Авалиани, Чеботарь, 2002). Показано также, что у овец прием ПНЖК ω -3 способствует пролонгированию беременности, предотвращает рождение маловесного потомства и улучшает его выживаемость (Carper et al., 2006). Употребление ПНЖК ω -3 в период беременности крыс увеличивает площадь дендритного дерева нейронов и количество зрелых нейронов в моторной области коры мозга у потомства (Обухова и др., 1992). Мышата, матери которых во время беременности принимали ПНЖК ω -3, более активны в тестах “открытое поле” и “чужак–резидент”, у них увеличено также время активного плавания в тесте “отчаяния” Порсолта (Raygada et al., 1998).

Цель нашего исследования – показать возможность коррекции смесью ПНЖК ω -3 нарушений локомоторного поведения у потомства крыс, вызванных введением их матерям сыворотки крови ребенка с двигательными расстройствами. Биологическая роль ПНЖК ω -3 состоит в обеспечении структурно-функционального действия биологических мембран. Эти кислоты выполняют структурную роль как компоненты фосфолипидов всех клеточных и субклеточных мембран в организме, определяя жидкость биомембран и их проницаемость (Барановский, 2001).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Источники биологически активных веществ. В экспериментах использовали сыворотку крови (СК) новорожденного с двигательными расстройствами, взятую из родильного дома № 16 Санкт-Петербурга и доставленную в НИИЭМ РАМН в течение 3 ч. Беременность у матери протекала с рядом ослож-

нений – преэклампсией средней степени тяжести, хронической маточно-плацентарной недостаточностью. Роды наступили на 38-й нед. гестации. Оценка новорожденного по шкале Апгар составила 7–8 баллов. Впоследствии у ребенка в возрасте 4 мес выявлена правосторонняя гемиплегия, а в 10 мес – легкая пирамидная недостаточность. Кровь после взятия центрифугировали 15 мин со скоростью 3000 об/мин и хранили при температуре – 18°C.

Моделирование двигательных расстройств у экспериментальных крысят. Самок на стадии проэструс–эструс вечером подсаживали к самцам. Отсчет срока беременности начинали со следующего дня при наличии сперматозоидов во влагалищных мазках самок. На 14-й день беременности под эфирным наркозом вскрывали брюшную полость самок и в каждую амниотическую полость рога матки вводили по 0.3 мл СК новорожденного (группа 2).

Использование ПНЖК для коррекции нарушений локомоторного поведения крысят. ПНЖК являются естественными элементами функционирования клетки, обладают адаптогенным, восстановительным действием, нормализуют рост клеток и устойчивость к кислородному голоданию (Крылов и др., 1991; Петрухина и др., 2002). Для коррекции двигательных нарушений раннего онтогенеза был выбран препарат эпаден, разработанный в НИИ биотехно-логий, – смесь эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот в соотношении 2 : 1. Этот препарат безвреден, не вызывает мутагенного эффекта и обладает антиагрегационной и антиоксидантной активностью.

Параллельно с внутриамниотическим введением СК ребенка самкам вводили 0.3 мл ПНЖК ω -3 внутрижелудочно с помощью катетера на 14, 15 и 16-й дни беременности (группа 3) или на 9, 12, 13 и 14-й дни беременности, т.е. до введения СК (группа 4).

Метод оценки локомоторного поведения крысят. Интактных крысят в возрасте 27–30 сут (группа 1, $n = 30$) и крысят, подвергшихся воздействию в пренатальном периоде СК донора (группы 2 ($n = 28$), 3 ($n = 28$) и 4 ($n = 30$)), тестировали по специальным локомоторным методикам. Установка включала две одинаковые площадки размером 20×20 см, расположенные на высоте 35 см, между которыми помещались различные переходные сооружения длиной 120 см: а) лестница шириной 10 см, изготовленная из металлической проволоки диаметром 0.2 см с расстоянием между ступенями 2 см; б) рельсы, состоящие из двух параллельных металлических реек шириной 0.3 см с расстоянием между ними 2 см; в) эстакада – деревянная рейка шириной 1 см.

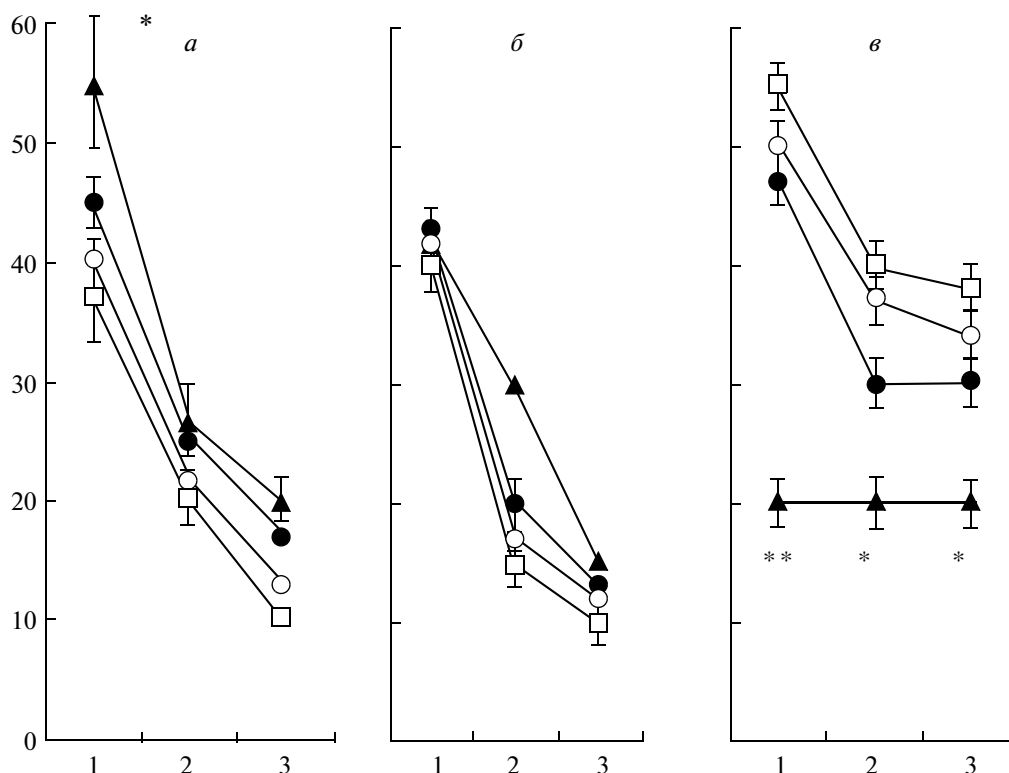


Рис. 1. Динамика средних показателей латентного периода в тестах “лестница” (а), “рельсы” (б) и “эстакада” (в) экспериментальных групп крысят: (□) – 1, (▲) – 2, (●) – 3, (○) – 4 (см. в тексте).

По оси абсцисс – дни экспериментов; по оси ординат – время, с.

Различия достоверны по сравнению с контролем: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

На одной из площадок имелся съемный домик с отверстием, который переставляли в зависимости от направления движения животного с площадки на площадку. В домик помещали пищевое подкрепление (кусочек белого хлеба, смоченный растительным маслом). Животных обучали хождению по переходным сооружениям – от простых к сложным (“лестница” → “рельсы” → “эстакада”) по три дня на каждый тест. С каждым животным опыт повторяли четыре раза. После каждого перехода животное получало пищевое подкрепление. В течение эксперимента регистрировали: а) латентный период – время от начала опыта до начала пробежки по переходным сооружениям; б) время прохождения животного по переходным сооружениям; в) число срывов передних и задних лапок слева и справа за опыт.

Статистическую обработку (программа Statistica-6) результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента (при оценке различий средних величин в тестах “лестница”, “рельсы” и “эстакада”) и непараметрического *U*-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни (при оценке показателей срывов лапок и достоверности различий в малых выборках).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ особенностей передвижения крысят по переходным сооружениям выявил следующие различия между животными контрольной и опытных групп. У контрольных (группа 1) во всех тестах в первый день опыта латентный период был длиннее, чем в последующие дни. В наиболее сложном тесте “эстакада” латентный период был длиннее, чем в первых двух (рис. 1). Аналогичная картина выявлена и для времени прохождения животных по переходным сооружениям (рис. 2). Число срывов лапок крысят с каждым опытом и новым тестом уменьшалось. Различий в количестве срывов передних и задних лап справа и слева не выявлено (рис. 3).

В группе крысят 2, матери которых на 14-й день беременности подверглись воздействию СК ребенка с двигательными расстройствами, латентный период в наиболее сложном тесте “эстакада” во все дни опытов был достоверно короче, чем у контрольных крысят ($p < 0.05$). У особей, матери которых получали ПНЖК ω -3 (группа 3 и 4), данные показатели не отличались от контроля.

Время прохождения по переходным сооружениям у крысят группы 2 в первом тесте было длиннее

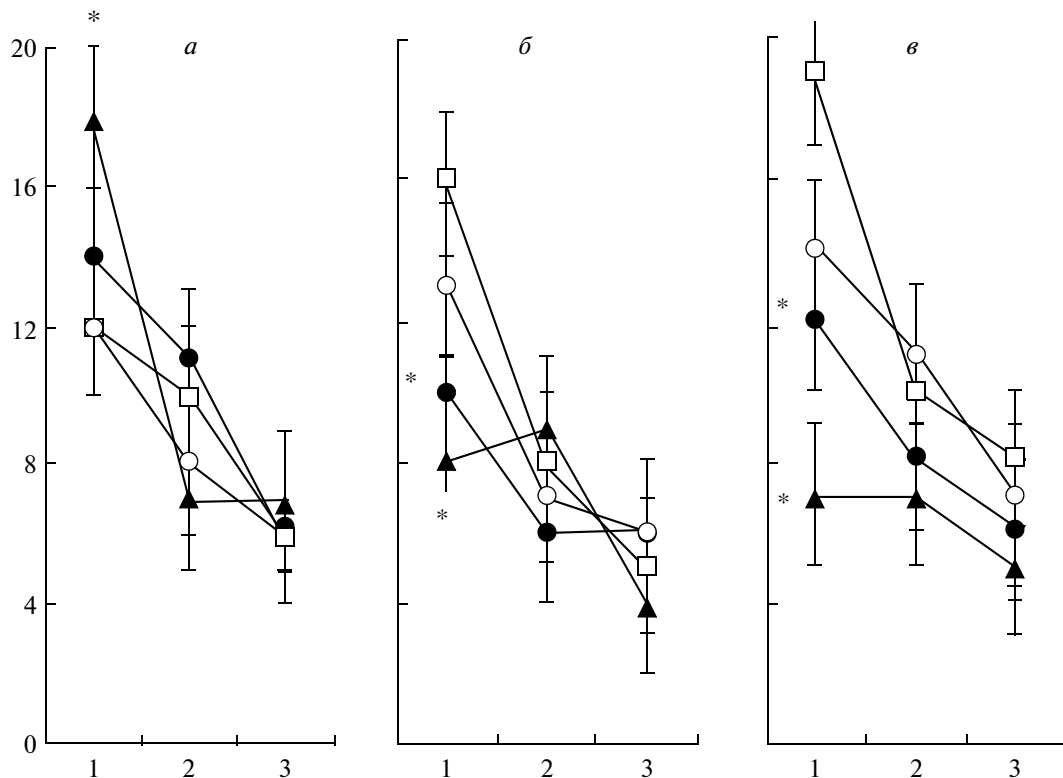


Рис. 2. Динамика средних показателей времени прохождения по переходным сооружениям экспериментальных групп крыс в тестах “лестница” (а), “рельсы” (б) и “эстакада” (в). Обозначения см. на рис. 1.

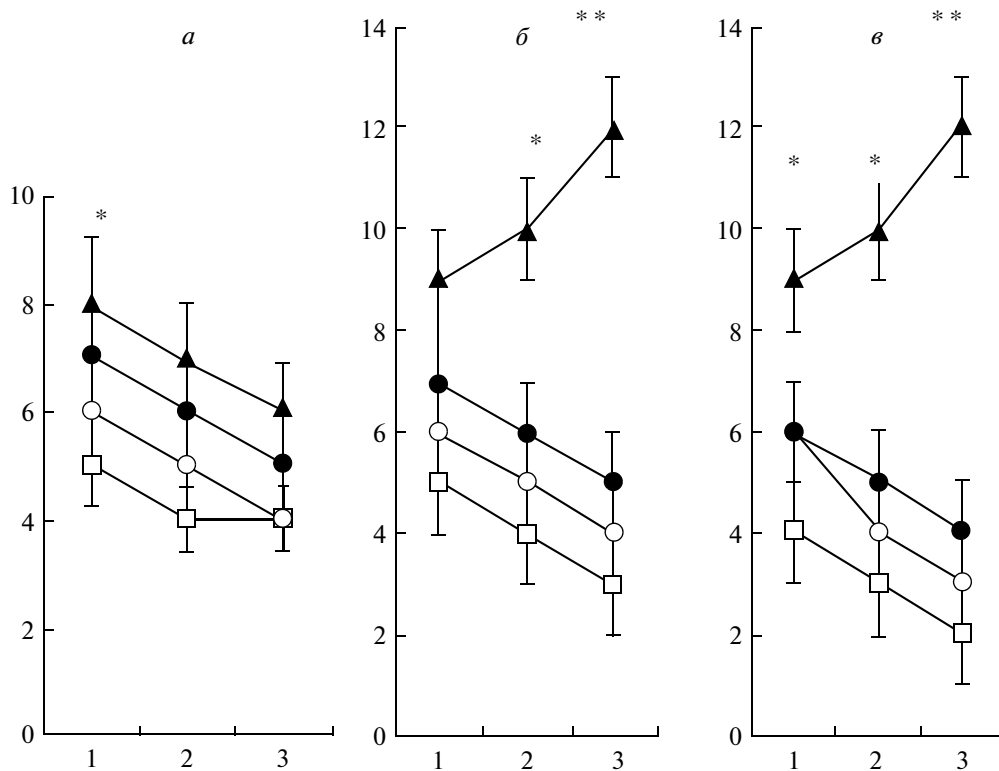


Рис. 3. Динамика средних показателей числа срывов лапок (по оси ординат) экспериментальных групп крыс в тестах “лестница” (а), “рельсы” (б) и “эстакада” (в); ост. обозначения см. на рис. 1.

контрольных показателей ($p < 0.05$), но уменьшалось в ходе обучения. В последующих тестах в первый день время пробежки было достоверно короче ($p < 0.01$), чем в контрольной группе (рис. 2). У крысят группы 3 в тестах “рельсы” и “эстакада” в первый день опытов время пробежки также было ниже контрольных показателей. У крысят с профилактическим введением смеси ПНЖК ω -3 матерям (группа 4) эти показатели не отличались от контроля.

Число срывов лапок у крысят группы 2 (рис. 3) в тесте “лестница” в первый день опыта было достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0.05$), в последующие дни опыта этот показатель снижался. При усложнении задания (тесты “рельсы” и “эстакада”) число срывов лапок увеличивалось и достоверно ($p < 0.01$) отличалось от показателей интактных крысят. Увеличение нагрузки в наиболее сложном тесте приводило к проявлению двигательной асимметрии (число срывов лапок справа – 10 ± 2 , слева – 3 ± 1).

У крысят групп 3 и 4, матери которых на 14-й день беременности подверглись воздействию СК и внутривенному введению ПНЖК ω -3, число срывов лапок во всех тестах было меньшим, чем в группе 2 ($p < 0.05$), но большим, чем в контрольной группе. Данный показатель в процессе обучения уменьшался даже при усложнении задания. При профилактическом приеме препарата беременными самками локомоторное поведение крысят соответствовало поведению таковых контрольной группы.

У крысят группы 4 в отличие от животных группы 2 не выявлена асимметрия в числе срывов лапок справа и слева.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы показали, что внутриамниотическое введение крысам на 14-й день беременности сыворотки крови ребенка с двигательными расстройствами изменяет локомоторное поведение крысят по сравнению с интактными животными и крысятами, матерям которых вводили сыворотку крови здоровых детей (Атаева и др., 1993). Было выявлено, что крысята опытной группы, в отличие от контрольных, при усложнении задачи не способны выделять новизну ситуации. Новизна ситуации влечет за собой ориентировочную реакцию, в которой присутствует эмоциональный компонент. По-видимому, можно сделать вывод о том, что у крысят группы 2 нарушен эмоционально-оценочный контроль поведения. Крысята, матерям которых добавляли в пищевой рацион ПНЖК, при усложнении тестов на новизну реагировали, что выражалось соответственно увеличением латентного периода и времени пробежки в первый день опыта. В частно-

сти известно, что для пищевого поведения в этом возрасте характерно повышение времени реакции, это мы и наблюдали только у интактных крысят.

Сравнительный анализ динамики прохождения по переходным сооружениям указывает на высокий уровень двигательной активности крысят экспериментальных групп. Морфофункциональные и локомоторные нарушения у них были обусловлены внутриамниотическим воздействием СК ребенка с двигательной патологией, применение же ПНЖК ω -3 в период беременности матери нивелирует действие пептидных факторов на развитие кортикоспинальной системы (Обухова и др., 1992) и улучшает локомоторное поведение крысят.

Анализ числа срывов лапок в тестах показал, что крысята, матери которых подверглись внутриамниотическому воздействию СК ребенка с двигательной патологией, совершали значительно больше срывов конечностей по сравнению с особями контрольной группы. Более того, тренировки не приводили к уменьшению числа ошибок, что указывает как на низкую обучаемость, так и на отклонения двигательной функции крысят группы 2. Именно в этой группе животных выявлена асимметрия срывов лапок, которая соответствовала двигательным нарушениям у ребенка-донора.

Мы выяснили, что наиболее отчетливое купирующее влияние на крысят оказывает профилактический прием ПНЖК (латентный период и время прохождения во всех трех тестах соответствовали контролю). Количество срывов лапок у них уменьшалось от опыта к опыту и от теста к тесту, хотя по абсолютному значению превышало контрольные данные; в конце обучения число срывов лапок было достоверно ниже, чем в группах 2 и 3. Асимметрии в количестве срывов лап справа и слева у крысят группы 4 не наблюдали.

В механизме антигипоксического эффекта эйкозапентаеновой кислоты ведущая роль принадлежит процессу стабилизации плазматических мембран внутриклеточных структур. Селективное включение эйкозапентаеновой кислоты в фосфолипидный матрикс плазматических мембран приводит к активному изменению мембранной проницаемости, способствует стабилизации мембран, в частности, к понижению ригидности эритроцитарных мембран. Применение эйкозапентаеновой кислоты вызывает улучшение показателей микроциркуляции, что важно при гипоксических состояниях (Тер-Карапетян, 1993). Экспериментально установлено, что назначение экзогенных докозагексаеновой и эйкозапентаеновой кислот сопровождается инкорпорированием ПНЖК ω -3 в липидных фракциях крови и в фосфолипидных формах элементов крови (тромбоци-

тов, эритроцитов, полиморфно-ядерных лейкоцитов). Это оказывает влияние на свойства плазмолеммы и функцию рецепторов к восприятию и обработке внеклеточной, в частности гормональной, информации (Ажгихин, Тер-Карапетян, 1987).

Результаты клинических исследований, проведенных американскими учеными, показали, что прием ПНЖК ω -3 в третьем триместре беременности снижает риск развития преэклампсий, способствует пролонгированию беременности и увеличению массы новорожденных (Makrides, Gibson, 2000). Добавление в пищевой рацион женщин во время беременности ПНЖК способствует оптимальному развитию нервной системы будущих детей и предотвращает развитие депрессивноподобных состояний у матерей (Makrides, Gibson, 2000; Hibbeln et al., 2007).

Таким образом, мы показали, что добавление ПНЖК ω -3 в рацион беременных крыс способствует купированию экспериментально вызванных нарушений поведения у их потомства, а профилактический прием предохраняет центральную нервную систему от патогенного воздействия пептидных факторов, присутствующих в сыворотке крови новорожденных с двигательной патологией, способных вызвать у крыс грубые отклонения в поведении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдаладзе Н.С., Авалиани Т.В., Чеботарь Н.А. и др. Эмбриотоксический эффект у крыс при воздействии сыворотки крови новорожденных детей, тестируемых на наличие трансферных факторов // Онтогенез. 1994. Т. 25. № 1. С. 38–43.
- Авалиани Т.В., Чеботарь Н.А. Полиненасыщенные жирные кислоты уменьшают индуцированные патологические нарушения у крысят // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2002. Т. 38. № 1. С. 62–65.
- Авалиани Т.В., Чеботарь Н.А., Игнатьева Т.В. и др. Влияние амниотической жидкости, взятой у женщин во время родов, на морфофункциональное развитие плодов и новорожденных крыс // Там же. 1992. Т. 28. № 1. С. 126–129.
- Авалиани Т.В., Незговорова И.В., Абдаладзе Н.С. и др. Биотестирование беременных как метод оценки риска двигательных нарушений у новорожденных // Экология человека. 1994. № 1. С. 33–36.
- Ажгихин И.С., Тер-Карапетян В.А., Гандель В.Г., Аракелова Н.Н. Докозагексаеновая и эйкозапентаеновая кислоты – новые фармацевтические и медицинские аспекты // Фармация. 1987. Т. 36. № 2. С. 80–90.
- Атаева О.В., Абдаладзе Н.С., Лазаренко Н.С. и др. Локомоторное и пространственно-ориентировочное поведение крысят в норме и при экспериментальной патологии // ЖВНД. 1993. Т. 43. № 1. С. 150–156.
- Барановский А.Ю. Руководство по диетологии. СПб.: Питер, 2001. 544 с.
- Барашнев Ю.И. Перинатальная неврология. М.: Триада-Х, 2005. 672 с.
- Доджов Д.С., Евсюкова И.И., Байбородов Б.Д. Проницаемость эритроцитарных мембран и сорбционная способность эритроцитов у новорожденных, перенесших гипоксию // Педиатрия. 2000. № 1. С. 101–102.
- Журавин И.А., Туманова Н.Л., Васильев Д.С. Структурные изменения нервной ткани гиппокампа в онтогенезе крыс после пренатальной гипоксии // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2009. Т. 45. № 1. С. 138–140.
- Крылов Ю.Ф., Любимов И.Б., Муляр А. Г. Перспективы использования эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот как лекарственных средств // Хим.-фармацевт. журн. 1991. Т. 25. № 9. С. 4–9.
- Михеева И.Г., Рюкерт Е.Н., Брусов О.С. и др. Содержание серотонина в сыворотке крови новорожденных детей с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС // Педиатрия. 2008. № 1. С. 40–44.
- Незговорова И.В. Авалиани Т.В., Богданов О.В. и др. Биотестирование сыворотки крови и ликвора в период новорожденности // Там же. 1994. № 4. С. 46–49.
- Обухова Г.П., Селиверова С.Г., Варлинская Е.И. и др. Нейроморфологический анализ моторной области коры мозга крысят, подвергшихся пренатальному воздействию нормальной и патологической сыворотки крови // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1992. Т. 28. № 4. С. 510–517.
- Пальчик А.Б., Шабалов Н.П. Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных. М: Медпресс-информ, 2006. 256 с.
- Петрухина Г.Н., Ремов М.Н., Макаров В.А. и др. Влияние хронического введения кроликам эпадена и ацетилсалициловой кислоты на противотромботический потенциал сосудистой стенки // Журн. эксперим. и клин. фармакологии. 2002. Т. 65. № 1. С. 46–52.
- Прахин Е.И., Терещенко С.Ю. Липиды плазматических мембран и липидные медиаторы воспаления у детей с atopическими заболеваниями – роль в патогенезе и возможные пути коррекции // Педиатрия. 2000. № 2. С. 82–88.
- Резник Б.Я., Пасенюк Т.А., Артеменко И.П. Фосфолипидный спектр и показатели перекисного окисления липидов спинномозговой жидкости у новорожденных с перинатальными поражениями ЦНС // Там же. 1990. № 10. С. 20–21.
- Тер-Карапетян В.А. Фармакологическая коррекция эпаденом липидного обмена, систем гемостаза и гемореологии при цереброваскулярных заболеваниях: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. СПб.: НИИЭМ РАМН, 1993. 39 с.
- Capper J., Wilkinson R.G., Mackenzie A.M. et al. Polyunsaturated fatty acids supplementation during pregnancy alters neonatal behavior in sheep // J. Nutr. 2006. V. 136. № 2. P. 397–403.
- Hibbeln J.R., Davis J.M., Steer C. et al. Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopment outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study // Lancet. 2007. V. 369. P. 578–585.
- Makrides M., Gibson R.A. Long-chain polyunsaturated fatty acid requirements during pregnancy and lactation // Am. J. Clin. Nutr. 2000. V. 71. № 1. P. 307S–311S.

Raygada M., Cho E., Hilakivi-Clarke L. High maternal intake of polyunsaturated fatty acids during pregnancy in mice alters offspring' aggressive behavior, immobility in

the swim test, locomotor activity and brain protein kinase C activity // J. Nutr. 1998. V. 128. № 12. P. 2505–2511.

Polyunsaturated Fatty Acids Prevent the Development of Locomotor Disturbances Caused by Changes in the Neurohumoral Background in Rat Pups

T. V. Avaliani, N. S. Abdaladze, N. S. Lazarenko, and V. M. Klimenko

*Scientific Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Sciences,
12 ul. Akademika Pavlova, St. Petersburg, 197376 Russia*

e-mail: tanaavaleeani@mail.ru

Abstract—The present study shows the effectiveness of using polyunsaturated fatty acids in pregnant rats in order to prevent behavioral alterations in neonatal rats caused by the action of the pathogenic peptide factors of blood serum with perinatal damage of the central nervous system.