

Поиск способов коррекции метаболических нарушений при гестозе с помощью тест-систем *in vitro* (перспективы тест-технологии)

Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии

Комбинации антиоксидантов метаболического действия, таких как тиоктацид ($1,25 \times 10^{-5}$ М), тиамин ($1,5 \times 10^{-11}$ М) и никотиновая кислота (10-11 М), а также тиоктацид ($1,25 \times 10^{-9}$ М), тиамин ($1,5 \times 10^{-11}$ М), никотиновая кислота (10-11 М), пиридоксин (3×10^{-7} М) и аскорбиновая кислота (3×10^{-7} М), совместно с диавитолом, пентоксифиллином и АТФ наиболее эффективно корректируют нарушения редокс-статуса эритроцитов при тяжелых гестозах. Тест-системы на основе экспериментального моделирования нитроксильного стресса и бактериальной эндотоксемии *in vitro* с использованием эритроцитов беременных могут быть использованы для индивидуальной оптимизации схем фармакологической коррекции метаболических нарушений и профилактики развития гемической гипоксии у беременных и их плодов при тяжелых гестозах. Ключевые слова: антиоксиданты, гестозы, нитроксильный стресс, бактериальная эндотоксемия, эритроциты, редокс-статус, *in vitro*

При тяжелом гестозе (преэклампсии, эклампсии) в крови накапливаются липополисахариды (ЛПС) и другие бактериальные эндотоксины эндогенной аутофлоры вследствие повышения проницаемости стенок кишечника [2, 3]. ЛПС стимулирует сверхпродукцию монооксида азота (NO), который вследствие гидрофобности накапливается в мембранах эритроцитов и подвергается автоокислению до нитрита *in vivo*. Реакция NO с деоксигемоглобином приводит к образованию нитрозилгемоглобина (HbFe(II)NO), тогда как реакция NO с оксигемоглобином сопровождается образованием метгемоглобина и нитрата. Кроме того, стабильная форма NO также может реагировать с дезоксигемоглобином с образованием NO. Эта реакция, также как и образование тиол-NO-производного гемоглобина (SNO-Hb), по-видимому, является главным механизмом для сохранения и системного транспорта NO эритроцитами [4]. Обусловленная ЛПС и другими бактериальными эндотоксинами сверхпродукция NO и его стабильных дериватов - нитритов, нитратов, HbFe(II)NO и SNO-Hb - при гестозах способствует развитию «нитроксильного стресса» в клетках крови. «Нитроксильный стресс» приводит к развитию гемической гипоксии, метгемоглобинемии и нарушению кислородтранспортной функции эритроцитов. Нарушения окислительно-восстановительного (редокс-) статуса эритроцитов составляют метаболическую основу для развития тяжелых гестозов, их осложнений и последствий [5, 6]. Анализ данных клинических наблюдений и экспериментальных исследований позволили предложить гипотезу о том, что при гестозе развитие гемической гипоксии у матери сопровождается нарушением процессов газообмена в системе «мать-плацента-плод» и сопровождается развитием гемической гипоксии и СПОН у плода. Одним из способов коррекции нарушений редокс-статуса клеток крови, прежде всего, эритроцитов, может быть применение композиций антиоксидантов метаболического действия (АМД) и их комбинаций с

антигипоксантами. Вместе с тем, практически не изучены эффекты влияния бактериального эндотоксина на эритроциты при действии факторов «нитроксильного стресса», сопровождающегося развитием метгемоглобинемией. Целью работы является анализ возможности коррекции метаболических нарушений редокс-статуса эритроцитов с помощью композиций АМД, таких как альфа-липоевая кислота, тиамин, никотиновая кислота, пиридоксин и аскорбиновая кислота и их комбинаций с антигипоксантами - диавитолом, пентоксифиллином и аденозинтрифосфатом (АТФ) для коррекции функциональных и метаболических нарушений в эритроцитах женщин в условиях экспериментального моделирования влияние бактериального ЛПС на эритроциты в условиях нитроксильного стресса *in vitro*.

Методические аспекты исследования композиций АМД с использованием лабораторных тест-систем на основе экспериментального моделирования бактериальной эндотоксемии и нитроксильного стресса *in vitro*. Наиболее удобными и доступными объектами для исследования являются эритроциты периферической крови беременных женщин с гестозами. При этом для моделирования нарушений редокс-статуса эритроцитов целесообразно прибавлять к суспензии эритроцитов женщин-доноров, а также беременных женщин, страдающих гестозами (гематокрит (Hct) - от 30 до 35) при одновременном применении ЛПС *Escherichia coli* в концентрации 10 мкг/мл совместно с NaNO_2 - (40 мкг/мл) в суспензии эритроцитов. Для характеристики физико-химической системы «перекисное окисление липидов - антиоксидантная активность». Интенсивность процессов ПОЛ оценивали по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), в условиях спонтанного и индуцированного (в Fe^{2+} - аскорбатной системе) свободнорадикального окисления в мембранах эритроцитов при $\lambda=532$ нм, $\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [5]. Основываясь на результатах собственных наблюдений, можно заключить, что наиболее удобными и информативными показателями состояния ФХС «ПОЛ-АОА» в эритроцитах является оценка резерва липидов перекисного окисления (РЛПО) в мембранах эритроцитов при спонтанном и индуцированном в Fe^{2+} -аскорбатной системе ПОЛ к уровню ТБК-РП при индуцированном ПОЛ в той же пробе:

$$\text{РЛПО} = ([\text{ТБК-РП инд.}] - [\text{ТБК-РП спонт.}]) / [\text{ТБК-РП инд.}],$$

где ТБК-РП инд. - уровень ТБК-РП в условиях $\text{Fe}(\text{II})$ -аскорбатной системы индукции ПОЛ, ТБК-РП спонт. - уровень ТБК-РП при спонтанном ПОЛ. Общая проокислительная активность (ПОА) и показатель (коэффициент) прооксидантно-антиоксидантного баланса (Кпаб), определяемых, соответственно, по формулам:

$$\text{ПОА} = \text{ТБК-РПСП} / \text{ТБК-РП инд.},$$

$$\text{Кпаб} = \text{ПОА} / \text{РЛПО} = \text{ТБК-РПСП} / [\text{ТБК-РП инд.} - \text{ТБК-РП сп.}]$$

Вместе с тем, следует отметить, что редокс-статус эритроцитов является сложной комплексной характеристикой жизнедеятельности биосистемы и не может исчерпываться изучением только лишь параметров ФХС «ПОЛ-АОА», либо оценки баланса про- и антиокислительных процессов, а требует изучения комплекса показателей кислотно-щелочного состояния (КЩС) во внутренней среде этой биосистемы [1]. Поэтому для оценки эффективности действия

композиций АМД и их комбинаций с антигипоксантами представляет интерес изучение газового состава и кислотно-щелочного состояния объектов исследования (в данном случае - суспензии эритроцитов). В наших экспериментах для изучения таких показателей КЩС суспензии эритроцитов, как рН, парциальное давление кислорода (рО₂, мм. рт. ст.), углекислого газа (рСО₂, мм. рт. ст.), содержание калия (К⁺, ммоль/л), уровень гематокрита (Hct, %), содержание общего (ТНб, г/л), оксигенированного (О₂Нб, %), восстановленного (RНб, %) гемоглобина, а также анализа таких коэффициентов, как Hct/ТНб (%л/г), Hct/О₂Нб, ТНб/О₂Нб (г/%л), ТНб/RНб (г/%л), был использован автоматический анализатор газового состава и кислотно-щелочного состояния крови «Synthesis-45» (Instrumentation Laboratory, США).

Формирование действия композиций антиоксидантов и их комбинаций с АМД. В предварительных исследованиях были изучены эффекты влияния 90 различных композиций АМД, включая альфа-липоевую кислоту (1), тиамин (2), никотиновую кислоту (3), пиридоксин (4), аскорбиновую кислоту (5) в широком диапазоне концентраций - от 10⁽⁻⁵⁾ до 10⁽⁻¹¹⁾ М, в отношении коррекции нарушений прооксидантно-антиоксидантного статуса и КЩС эритроцитов в условиях экспериментальных моделей «окислительного стресса» и «нитроксильного стресса» *in vitro*. Были охарактеризованы эффекты четырех композиций АМД, таких как:

А) альфа-липоевая кислота (тиоктацид) в конечных концентрациях: 1,25x10⁻⁵ М (вариант 11), 1,25x10⁻⁷ М (вариант 12), 1,25x10⁻⁹ М (вариант 13), 1,25x10⁻¹¹ М (вариант 14);

В) тиамин (5%) в конечных концентрациях: 1,5x10⁻⁵ М (вариант 21), 1,5x10⁻⁷ М (вариант 22), 1,5x10⁻⁹ М (вариант 23), 1,5x10⁻¹¹ М (вариант 24);

С) никотиновая кислота (1%) в конечных концентрациях: 10⁻⁵ М (вариант 31), 10⁻⁷ М (вариант 32), 10⁻⁹ М (вариант 33), 10⁻¹¹ М (вариант 34);

Д) пиридоксин (5%) в конечных концентрациях: 3x10⁻⁵ М (вариант 41), 3x10⁻⁷ М (вариант 42), 3x10⁻⁹ М (вариант 43), 3x10⁻¹¹ М (вариант 44);

Е) аскорбиновая кислота (5%) в конечных концентрациях: 3x10⁻⁵ М (вариант 51), 3x10⁻⁷ М (вариант 52), 3x10⁻⁹ М (вариант 53), 3x10⁻¹¹ М (вариант 54).

Каждый из исследованных антиоксидантов или их композиций можно обозначить группой цифр «антиоксидант-концентрация», первая из которых обозначает номер указанного выше антиоксиданта, а вторая - используемую концентрацию. Различные композиции антиоксидантов метаболического действия, которые могут быть обозначены группами цифр «антиоксидант-концентрация» как 11, 1124, 112432, 112433, 112434, 11243343, 11243351, 11243353, 11243354, 13, 1323, 1324, 132334, 132434, 13243441, 13243442, 1324344151, 1324344252, на параметры прооксидантно-антиоксидантного статуса эритроцитов в условиях «нитроксильного стресса» *in vitro* [1, 4].

На основе сформированных композиций АМД были сформированы комбинации композиций вышеуказанных АМД совместно с антигипоксантами, такими как натриевая соль АТФ, пентоксифиллин, диавитол. При совместном применении АМД вносили в экспериментальную систему один за другим, а антигипоксанты - через 30 мин после АМД. Достоверность различий между группами данных определяли методами непараметрической статистики с помощью F-теста.

Анализ эффективности и механизмов действия композиций АМД и их комбинаций с антигипоксантами.

Выбор АМД и сочетания их применения обусловлен особенностями их совместного «кумулятивного» действия, а также их ожидаемым возможным модифицирующим «кумулятивным» эффектом в отношении потенцирования эффектов антигипоксантов. Особенности эффектов избранных АМД и их потенцирующего влияния на механизмы действия эффектов диавитол, пентоксифиллин и АТФ представлены на рисунке 1. Обнаружено, что такие композиции АМД, как 112432, 112433 и 112434, 11243351, 11243353 и 11243354, а также 1324, 132334, 132434, 13243441, 13243442, 1324344151 и 1324344252, оказывают стимулирующее влияние на общую АОА по показателю РЛПО, а также вызывают снижение показателя общей ПОА в эритроцитах после обработки ими эритроцитов при «окислительном стрессе» по сравнению с контрольными клетками, не подвергавшимися какой-либо фармакологической коррекции.

Получены данные, свидетельствующие о том, что наиболее эффективными являются следующие комбинации антигипоксантов совместно с антиоксидантными композициями: 112434+пентоксифиллин; 112434+диавитол; 1324344252+АТФ; 1324344252+пентоксифиллин. Применение именно этих комбинаций АМД с антигипоксантами сопровождается нормализацией параметров КЩС в эритроцитах в условиях экспериментального моделирования «тяжелого гестоза» *in vitro*. Изученные композиции АМД оказывают наиболее существенное корректирующее влияние на показатели проокислительно-антиокислительного статуса эритроцитов при экспериментальном моделировании «окислительного стресса» и «нитроксильного стресса» *in vitro*. В частности, все четыре фармакологических композиционных состава способствовали повышению уровня РЛПО в 1,5-7,1 раза по сравнению с контролем (эритроциты, находящиеся в условиях моделирования «окислительного стресса» и «нитроксильного стресса» *in vitro*). Отмечено значительное снижение величины ПОА с последующей оптимизацией Кпаб в диапазоне значений от 1,0 до 3,0.

На основе результатов предварительных исследований были отобраны четыре варианта антиоксидантных композиций: 112434, 11243354, 13243442 и 1324344252. Установлено, что указанные композиции АМД наиболее существенно корректируют редокс-статус эритроцитов при экспериментальном моделировании «окислительного стресса» и «нитроксильного стресса» *in vitro*. По результатам анализа эффектов, оказываемых данными препаратами самостоятельно или при совместном действии, окончательно были выбраны две композиции: а) трехкомпонентная 112434 («тиоктацид ($1,25 \times 10^{-5}$ М) + тиамин ($1,5 \times 10^{-11}$ М) + никотиновая кислота (10^{-11} М)» и б) пятикомпонентная 1324344252 («тиоктацид ($1,25 \times 10^{-9}$ М) + тиамин ($1,5 \times 10^{-11}$ М + никотиновая кислота 10^{-11} М + пиридоксин 3×10^{-7} М + аскорбиновая кислота (3×10^{-7} М)»). Вышеуказанные антиоксидантные композиции способствовали восстановлению уровня РЛПО до значений, более чем в 4-5 раза превышающих значения РЛПО при «нитроксильном стрессе», чем в 2,5 раза уровень РЛПО в контроле. Анализ результатов экспериментальных исследований позволил установить, что

наиболее вариабельными показателями КЩС в эритроцитах, изменяющимися при экспериментальном моделировании «тяжелого гестоза» *in vitro*, являются показатели рН, рО₂ и рСО₂.



Рисунок 1 - Основные действующие факторы и характеристика эффектов композиций антиоксидантов метаболического действия и их комбинаций с антигипоксантами

При этом уровень ПОА в эритроцитах ниже в 3-5 раза по сравнению с уровнем при «нитроксильном стрессе» *in vitro*. Влияние, оказываемое данными композициями АД на состояние проокислительно-антиокислительного баланса эритроцитов беременных женщин, страдающих гестозами, в условиях экспериментального моделирования «нитроксильного стресса» *in vitro*, оказалось наиболее оптимальным.

Результаты изучения модулирующего влияния композиций АД на эффективность действия антигипоксантов, таких как АТФ, пентоксифиллин и диавитол, в отношении проокислительно-антиокислительного статуса и КЩС эритроцитов в условиях экспериментального моделирования действия ЛПС *E. coli* на эритроциты в условиях нитроксильного стресса указывают на выраженный потенцирующий характер воздействия отдельных композиций АД на антигипоксанты.

Итоги собственных исследований. 1) Такие композиции АД, как 112434 «тиоктацид ($1,25 \times 10^{-5}$ М) + тиамин ($1,5 \times 10^{-11}$ М) + никотиновая кислота (10^{-11} М)» и 1324344252 «тиоктацид ($1,25 \times 10^{-9}$ М) + тиамин ($1,5 \times 10^{-11}$ М) + никотиновая кислота (10^{-11} М) + пиридоксин (3×10^{-7} М) + аскорбиновая кислота (3×10^{-7} М)» являются наиболее эффективными в отношении коррекции нарушений редокс-статуса эритроцитов при тяжелых гестозах.

2) Указанные композиции АД способствуют восстановлению уровня РЛПО более чем в 4-5 раза превышающих значения РЛПО при «нитроксильном стрессе». При этом уровень ПОА в эритроцитах был снижен в 3-5 раза по

сравнению с исходным.

3) Установлено, что комбинации антигипоксантов совместно с антиоксидантными композициями: 1) «тиоктацид ($1,25 \times 10^{-5}$ М) + тиамин ($1,5 \times 10^{-11}$ М) + никотиновая кислота (10-11 М) + пентоксифиллин»; 2) «тиоктацид в конечной концентрации $1,25 \times 10^{-5}$ М + тиамин ($1,5 \times 10^{-11}$ М) + никотиновая кислота (10-11 М) + диавитол»; 3) «тиоктацид ($1,25 \times 10^{-9}$ М) + тиамин ($1,5 \times 10^{-11}$ М) + никотиновая кислота (10-11 М) + пиридоксин (3×10^{-7} М) + аскорбиновая кислота (3×10^{-7} М) + АТФ»; 4) «тиоктацид ($1,25 \times 10^{-9}$ М) + тиамин ($1,5 \times 10^{-11}$ М) + никотиновая кислота (10-11 М) + пиридоксин (3×10^{-7} М) + аскорбиновая кислота (3×10^{-7} М) + пентоксифиллин» оказались наиболее эффективными в отношении коррекции нарушений прооксидантно-антиоксидантного баланса и КЦС эритроцитов в условиях лабораторной тест-системы на основе сочетанного воздействия ЛПС *E.coli* на фоне «нитроксильного стресса» *in vitro*.

Перспективы. Разработка комплекса тест-систем (лабораторной тест-технологии) на основе экспериментального моделирования нитроксильного стресса и бактериальной эндотоксемии *in vitro* с использованием эритроцитов беременных могут быть использованы для индивидуальной оптимизации схем фармакологической коррекции метаболических нарушений и профилактики развития гемической гипоксии у беременных и их плодов при тяжелых гестозах.

Литература

1. Комов, В. П. Биохимия / В. П. Комов, В. Н. Шведова. М., 2006. 638 с.
2. Кулаков, В. И. Анестезия и реанимация в акушерстве и гинекологии / В. И. Кулаков [и др.]. М., 2000. 383 с.
3. Кустаров, В. Н. Гестоз: патогенез, симптоматика, лечение / В. Н. Кустаров, В. А. Линде. СПб., 2000. 160 с.
4. Морозкина, Т. С. Витамины: краткое руководство для врачей и студентов / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеенок. Минск., 2002. 112 с.
5. Cokić, V.P. Effects of nitric oxide on red blood cell development and phenotype / V.P. Cokić, A.N. Schechter // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2008. Vol. 82. P. 169-215.
6. Dekker, G.A. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts / G.A. Dekker, B.M. Sibai // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998. Vol. 179. № 5. P. 1359-1975.