

АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

На правах рукописи
УДК 616.127-005.4:615.322.

Хайбуллина Зарина Руслановна

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ
БИОМЕМБРАН ПОД ДЕЙСТВИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ
КИСЛОРОДА ПРИ ГИПОКСИИ

03.00.04 - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Ташкент – 2012

Работа выполнена в Ташкентском педиатрическом медицинском институте и Институте биохимии АН РУз

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
ИБРАГИМОВ Уткур Кудратович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
АБИДОВ Олим Обидович
доктор медицинских наук,
ЛИВЕРКО Ирина Владимировна
доктор медицинских наук,
АРИПОВ Ориф Абдумаликович

Ведущая организация: **Ташкентская медицинская академия**

Защита состоится «_____» _____ 2012 г. в _____ часов на заседании Специализированного совета Д 015.16.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при Институте биохимии Академии Наук Республики Узбекистан по адресу: 100125, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 56.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии АН РУз.

Автореферат разослан «_____» _____ 2012 года

**Ученый секретарь
Специализированного Совета,
кандидат биологических наук**

Г.У. Усманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В мембранах локализованы три важнейшие регуляторные системы: циклических нуклеотидов; фосфоинозитидного цикла; пероксидного окисления липидов, между которыми существует тесное взаимодействие и взаимное влияние, а активные формы кислорода и фосфолипиды являются непосредственными участниками и модуляторами работы этих систем (Бурлакова Е.Б., 2010; Haddad G., Yu Sh.P., 2009;). Мембранные структуры непосредственно вовлечены в механизмы клеточной гибели при гипоксии: апоптоз, некроз, некроапоптоз (Banik N., Ray SK, 2009). Изменение функций мембран происходит на заключительных этапах гибели клетки при апоптозе, а для некроза состояние биомембран является фактором, определяющим обратимость поражения. Гипоксия различного генеза и последующая реоксигенация - это мощные стимулы для образования активных форм кислорода (АФК) и реализации их эффектов в клетке (Скулачев В.П., 2001; Болдырев А.А., 2005-2009; Adibhatla R.M. et al., 2010), а адаптация клетки к неблагоприятным условиям происходит путем изменения её фосфолипидного состава (Corrêa RR et al, 2012). Регуляция генерации АФК возможна с помощью антиоксидантов различных классов, действие которых реализуется как в терапевтических, так и в сверхмалых дозах (Алексеева О.М. и соавт., 2010).

Внутриутробная гипоксия плода, обуславливая задержку внутриутробного развития и возникновение церебральной ишемии у новорожденного, вносит существенный вклад в увеличение перинатальных повреждений центральной нервной системы и заболеваемости у детей (Барашнев Ю.И., 2008; Chang JY et al, 2011). Около 10% новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, составляют группу риска по смертности в остром периоде, а среди выживших 30% имеют риск развития нарушений нервно-психических функций, эпилепсии, шизофрении, аутизма (Shankaran S et al. 2005; Phelan JP et al, 2011). Примерно 0,2-04% всех живорожденных страдают перинатальной ишемией-гипоксией (Gill MB et al., 2008), которая обуславливает развитие неврологического дефицита и школьной неуспеваемости у детей (Mwaniki MK et al, 2012). В Узбекистане, в виду существенного реформирования здравоохранения и акцентирования внимания на здоровье матери и ребенка, достигнуты значительные успехи в сокращении детской смертности и заболеваемости. Однако, по данным Института здоровья МЗ РУз, в 2011 году из 610905 живорожденных детей 26065 перенесли внутриутробную гипоксию и асфиксию в родах, 968 из них – умерли (Гос. стат. отчетная форма 13-тип). Концепция нейропротекции антиоксидантами активно применяется при лечении ишемического инсульта у взрослых (Гусев Е.И., 2001; Суслина З.А., 2004; Hannah C et al., 2009; Володин Н.Н. и соавт., 2009), однако не используется у новорожденных,

вероятно, в виду отсутствия фундаментальных разработок, доказывающих ее эффективность. Тем более не исследовано действие сверхмалых доз (СМД). В живых объектах мишенями действия антиоксидантов являются клеточные мембраны (Burlakova EB et al., 2007). Молекулярные механизмы действия нанодоз антиоксидантов на структурно-функциональные параметры биологических мембран при внутриутробной гипоксии плода не исследованы, хотя именно повреждение мембран под действием АФК лежит в основе патогенеза гипоксии плода и гибели нейроцитов путем некроза, апоптоза, некроапоптоза (Northington FJ et al, 2007).

Степень изученности проблемы. Несмотря на многообразие причин развития гипоксии, изменения, происходящие в клетках мозга, стереотипны и обусловлены гиперпродукцией АФК, включая в себя следующие механизмы: наличие гипоэнергетического состояния, ацидоза, запуска глутамат-кальциевого каскада, липопероксидации, нейротоксичности оксида азота, приводящих к повреждению жизненно важных структур клеток и их гибели (Banik N., Ray SK, 2009). Кроме того, при реоксигенации происходит вторичное повреждение клеток мозга за счет митохондриальной дисфункции, эксциторной нейротоксичности, а также циркуляторных нарушений и эндогенного воспаления, ведущая роль в инициации которых принадлежит АФК (Verklan MT, 2009). Особая ранимость олигодендроглии у недоношенных детей обусловлена более легкой аккумуляцией в ней свободных радикалов, их большей токсичностью в отношении недифференцированных олигодендроцитов по сравнению со зрелыми. Дифференцирующаяся глия очень чувствительна к дефициту кислорода именно в период новорожденности, ее поражение в указанный период ведет к нарушениям миелинизации (Weidemann A, 2009). Установлена ведущая роль АФК как непосредственных участников основных патогенетических механизмов повреждения мозга при гипоксии (Hossain MA, 2008), в то время как модулирующий эффект антиоксидантов в СМД в развивающемся мозге при гипоксии не исследован.

Мозговая ткань характеризуется довольно низким уровнем ферментов антиоксидантной защиты, в таких условиях для защиты мозговой ткани возрастает значение других компонентов антиокислительной системы, а также перераспределение антиоксидантной мощности в пользу наиболее пораженного органа. Печень, являясь депо антиоксидантов в организме, центральным звеном в детоксикации продуктов пероксидации, принимает непосредственное участие в обеспечении общей антиоксидантной активности и регуляции уровня генерации АФК, в связи с чем изучение ее мембранных компонентов при гипоксии является необходимым для установления патогенеза отсроченного повреждения мозга в постгипоксическом периоде.

Не смотря на достаточную изученность механизмов повреждения мозга при гипоксии, отсутствуют достоверные диагностические маркеры

структурно-функциональной недостаточности ЦНС, характеризующие степень адаптации новорожденного к патологическому состоянию гипоксии и отражающих во взаимосвязи изменения в системе мать-плод, позволяющих прогнозировать течение постнатального периода (Голосная Г.С., 2005; Moresco L et al, 2010).

С целью коррекции гипоксии предпринимаются попытки экспериментального использования антагонистов эксциаторных аминокислот и ростовых факторов, блокаторов путей апоптоза, ингибиторов образования оксида азота и «ловушек» АФК. Изучаются эффекты как потенциальных нейропротекторов: антагонистов фактора активации тромбоцитов, аденозинергических веществ, моносиалганглиозида GM1, инсулиноподобного фактора роста, эритропоэтина и др., а использование антиоксидантов при гипоксических поражениях мозга новорожденных ограничено и мало изучено (Chrysanthy I et al, 2010).

Обнаружение способности биологически активных веществ модифицировать живые системы различной степени сложности, действуя в сверхнизких концентрациях - нанодозах (10^{-22} - 10^{-14} М), является одним из наиболее впечатляющих открытий последних десятилетий (Бурлакова Е.Б. и соавт., 2008; Алексеева О.М., и соавт., 2008). Существуют факты, доказывающие, что ограниченность размеров приводит к изменению условий для фазовых и структурных превращений, намагничивания и размагничивания, явлений переноса теплоты, заряда, пропускания и отражения света и другие. При этом меняются все фундаментальные характеристики вещества: параметры решетки, электронный спектр, энергия отрыва электрона с наружной энергетической оболочки, температура плавления (Болдырева Л.Б., 2008). Силы притяжения и стремление понизить свободную энергию создают предпосылки для самоорганизации и самосборки наноструктур, а природа широко пользуется этим в биообъектах. Показано, что при сверхнизких концентрациях отдельные молекулы вещества могут образовывать супрамолекулярные наноразмерные частицы), которые могут рассматриваться в качестве гидрофильных поверхностей, а мишень их действия в биологических объектах – мембранные структуры (Бурлакова Е.Б. 2010). Природные и синтетические антиоксиданты обладают способностью оказывать значимые эффекты в СМД. Пространственно затрудненный экранированный фенол - Фенозан - сильный антиоксидант, влияющий на структуру и функции мембран. Биологически значимыми мишенями воздействия фенозана являются микродомены липосом, фрагменты клеточной мембраны, поверхностные клеточные рецепторы и внутриклеточные органеллы, также система сигнальной трансдукции, репарации и апоптоза клеток (Алексеева О.М., и соавт., 2010). Изучение молекулярных механизмов модуляции фосфолипидного состава биомембран клеток мозга и субклеточных фракций печени под действием нанодоз антиоксидантов позволит установить степень их эффективности и

разработать новые подходы к лечению гипоксии плода и профилактике ее последствий.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Диссертационная работа входит в план НИР ТашПМИ, выполнена в рамках проекта фундаментального исследования СС Ф5-048: «Активация факторов апоптоза при гипоксических состояниях», руководитель – профессор Ахмедова Д.И., а также в рамках прикладного проекта ИТСС 29-1: «Разработка комплексной диагностики, прогнозирования и профилактики гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных», руководитель – профессор А.В. Алимов.

Цель исследования: изучение молекулярных механизмов повреждения биомембран под действием активных форм кислорода и действия сверхмалых доз антиоксидантов различных классов на интенсивность свободно-радикального окисления и липидный состав биомембран мозга и печени в постнатальном онтогенезе после гипоксии плода.

Задачи исследования.

1. Изучить влияние внутриутробной гипоксии на постнатальное развитие мозговых тканей: динамику фосфолипидного спектра, ферментативное звено защиты от АФК, уровень пероксидации в период от момента рождения до перехода на дефинитивное питание.
2. Провести анализ действия сверхмалых доз синтетического водорастворимого антиоксиданта в сравнении с альфа-токоферолом в мозговых тканях в постгипоксическом периоде.
3. В митохондриальной фракции печени исследовать фосфолипидный состав, уровень пероксидации и состояние ферментативного звена антиоксидантной системы в различные сроки постнатального периода после перенесенной гипоксии плода.
4. Изучить эффект сверхмалых доз синтетического водорастворимого антиоксиданта в митохондриальной фракции печени на динамику фосфолипидного состава, интенсивность генерации АФК и ферментативной системы их обезвреживания в постгипоксическом периоде в сравнительном аспекте относительно альфа-токоферола.
5. В микросомальной фракции печени в различные сроки постгипоксического периода определить изменения спектра фосфолипидов, уровня образования АФК и активности ферментов антиоксидантной системы.
6. Оценить влияние сверхмалых доз водорастворимого антиоксиданта в сравнении с альфа-токоферолом на мембранный компонент в микросомальной фракции печени в динамике постгипоксического периода.
7. Исследовать диагностическую значимость определения интенсивности генерации АФК, состояния антиоксидантной

системы у матери и в пуповинной крови в совокупности с показателями мозгового кровотока у новорожденных в прогнозировании церебральной ишемии у детей после хронической внутриутробной гипоксии.

8. Разработать биохимическое обоснование для нового подхода к лечению гипоксического поражения с учетом фундаментальных представлений о механизмах повреждающего действия АФК и эффектов нанодоз антиоксидантов мозге и печени в различные сроки постгипоксического периода.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования явились белые беспородные крысы: беременные самки, подвергнутые хронической гипобарической гипоксии на сроке со 2 недели гестации (n=236), новорожденные крысята (n=1274) в возрасте 0, 1, 3, 5, 8, 10, 12, 21 суток жизни. Предметом исследования явились тотальные гомогенаты мозга, митохондриальная, микросомальная фракции печени, периферическая кровь.

Объектом клинического исследования явились 147 детей (пар мать/новорожденный) с периода новорожденности до 1 года. Все обследованные образовали 3 группы: I - 126 доношенных новорожденных с церебральной ишемией различной степени вследствие перенесенной хронической гипоксии плода, II - 18 доношенных новорожденных с церебральной ишемией различной степени вследствие перенесенной острой асфиксии в родах, III – 20 здоровых новорожденных (контроль). Предметом клинических исследований явились периферическая кровь рожениц, пуповинная кровь.

Методы исследования: тонкослойная хроматография, биохимические, иммуногистохимические, клинические, УЗИ и доплерография головного мозга, статистические.

Положения, выносимые на защиту.

1. Хроническая внутриутробная гипоксия плода вызывает дисбаланс фосфолипидного состава мозговых тканей, обуславливая замедление их созревания, нарушает синхронизацию активности антиоксидантной системы с уровнем генерации АФК, формирование нейропластичности, обеспечиваемые индивидуальными фосфолипидами.
2. Водорастворимый антиоксидант фенозан в нанодозах обладает высокой эффективностью в мозговых тканях, т.к. приводит к ранней нормализации фосфолипидного состава и активности ферментов антиоксидантной системы в мозге, создавая благоприятные условия для развития мозговых функций в постгипоксическом периоде.
3. В митохондриальной фракции печени имеют место проявления окислительного стресса и липопероксидации, наблюдаемые в отдаленные сроки постгипоксического периода, доказывающие вклад печени в усугубление патологического процесса и устраняемые введением водорастворимого антиоксиданта в нанодозах.

4. Внутриутробная гипоксия плода приводит к изменениям фосфолипидного состава и избыточной генерации АФК в микросомальной фракции печени на протяжении постгипоксического периода, обуславливая нарушения детоксикации продуктов пероксидации и длительную персистенцию окислительного стресса, устраняемую в ранние сроки при введении антиоксидантов в нанодозах.
5. Определение интенсивности генерации активных форм кислорода и активности антиоксидантной системы в пуповинной крови и крови рожениц в совокупности с параметрами изменения мозгового кровотока у новорожденного может служить критерием определения степени тяжести церебральной ишемии.
6. Антиоксиданты в нанодозах обнаружили модулирующий эффект на состав фосфолипидов и уровень генерации АФК в тканях мозга и печени при экспериментальной гипоксии плода, с преобладанием эффекта водорастворимого низкомолекулярного фенозана в мозговой ткани и альфа-токоферола в субклеточных фракциях печени, что является биохимическим основанием для нового подхода к лечению гипоксического поражения у новорожденных.

Научная новизна. Установлено, что активация генерации АФК в мозге при церебральной ишемии новорожденных не является органолокальным и кратковременным процессом, ибо она обнаруживается также в крови и мембранных компонентах гепатоцитов на протяжении всего постнатального периода. Установлена межорганная взаимосвязь при активации свободно-радикальных процессов и стационарный уровень генерации АФК в мозге на 21 сутки постгипоксического периода на фоне проявлений окислительного стресса и липопероксидации в субклеточных фракциях печени в этот срок. Установлен вклад избыточной генерации АФК и нарушений содержания кардиолипина и фосфатидилсерина в митохондриальной фракции печени в развитие апоптоза гепатоцитов в постгипоксическом периоде церебральной ишемии и антиапоптотное действие нанодоз фенозана. Установлено участие мембранного компонента микросомальной фракции печени в постгипоксических адаптационных реакциях при церебральной ишемии новорожденных и модулирующий эффект нанодоз альфа-токоферола на активность ферментативного звена антиоксидантной системы в ранние сроки постгипоксического периода, а также преимущественные эффекты нанодоз фенозана в отношении фосфолипидов микросомальных мембран в отдаленном периоде.

Установлены сроки значимых структурных перестроек фосфолипидного состава в ткани мозга и субклеточных фракциях печени в течение постнатального онтогенеза, периоды наибольшей уязвимости ферментативного звена антиоксидантной системы и фосфолипидных компонентов биомембран в указанных тканях в постгипоксическом периоде.

Сравнительный анализ эффективности нанодоз синтетического водорастворимого антиоксиданта фенозана относительно нанодоз природного жирорастворимого альфа-токоферола показал, что в мозговых тканях преобладают эффекты фенозана на ферментативное звено АОС с последующим снижением окисления фосфолипидов в течение постнатального периода, что оптимизирует условия для развития мозга. Установлен молекулярный механизм действия нанодоз фенозана в тканях мозга и субклеточных фракциях печени, проявившийся в снижении количества легкоокисляемых фракций, увеличения кислых фракций фосфолипидов относительно нейтральных, антиапоптозная активность, активирующее действие в отношении ферментов антиоксидантной системы. Показана диагностическая значимость определения уровня генерации АФК и активности ферментов антиоксидантной системы в пуповинной крови, в крови рожениц в совокупности с параметрами изменения мозгового кровотока у новорожденного в определении степени тяжести церебральной новорожденных. Биохимически обоснована возможность коррекции нарушений структуры мембран мозга, митохондрий и микросом печени после хронической внутриутробной гипоксии.

Научная и практическая значимость результатов исследования. В клинической практике при диагностике и лечении церебральной ишемии рекомендуется учитывать интенсивность свободно-радикального окисления в динамике постгипоксического периода и в зависимости от этого вводить в курс фармакотерапии препараты антиоксидантного действия, в том числе в нанодозах. Представления о молекулярных механизмах повреждения биомембран при развитии адаптационных изменений в ответ на гипоксическое повреждение и механизмах действия СМД антиоксидантов различных классов важны для разработки эффективных способов и новых подходов лечения гипоксических и постгипоксических состояний. Изучение состояния биомембран при окислительном стрессе с новых научных позиций – позиции саморегуляции мембранных структур под действием нанодоз антиоксидантов раскрывает широкие перспективы для использования нанотехнологий для регуляции метаболических процессов физиологическим путем, с минимумом инвазивного воздействия и фармакотерапии в нанодозах. Практическая ценность работы состоит в обосновании перспективности внедрения терапии в СМД антиоксидантов для модификации структуры мембран и активности ферментов антиоксидантной системы.

Реализация результатов. Установленные в работе теоретические положения и практические рекомендации включены в соответствующие разделы лекционных курсов кафедр биохимии, патофизиологии, неонатологии ТашПМИ и ТашИУВ.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на III Международной (XII Всероссийской) Пироговской конференции

студентов и молодых ученых (Москва, 2008); V Международной конференции молодых ученых (Винница, 2008); VI Съезде педиатров (Ташкент, 2009); IV Международной Пироговской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2009); VIII Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2010); VI Международной Пироговской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2011г); на заседании Проблемной комиссии медико-биологических кафедр ТашПМИ (Ташкент, 2011); на межлабораторном семинаре Центральной клинической и биохимической лаборатории РСНПМЦ Педиатрии МЗ РУз и кафедры Клинической и лабораторной диагностики ТашИУВ (Ташкент, 2011), на научном семинаре при Объединенном специализированном совете Д 015.16.01 при Институте биохимии АН РУз (Ташкент, 2011).

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликовано 40 работ, в том числе 2 монографии, 1 методические рекомендации для биохимиков, патофизиологов; 1 информационное письмо; 4 учебно-методических пособия; 15 оригинальных журнальных статей, 4 обзорные журнальные статьи, 1 статья в сборнике, 12 тезисов.

Структура и объём диссертации. Диссертация написана на русском языке, изложена на 296 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 5 глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Литературный указатель состоит из 508 ссылок на источники, 385 из которых представлены зарубежными авторами. Работа иллюстрирована 55 таблицами, 29 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Первая глава (обзор литературы) содержит информацию об уровне изученности влияния активных форм кислорода на состояние биомембран клеток мозга, субклеточных фракций печени, периферической крови при гипоксии плода. Рассмотрены механизмы вторичного повреждения мембран мозговых тканей при реоксигенации за счет митохондриальной дисфункции, эксциаторной нейротоксичности, усиления генерации АФК, а также циркуляторных нарушений и эндогенного воспаления. Рассмотрено участие митохондриальной (МХ) и микросомальной (МС) фракций печени в гипоксическом повреждении у плода и новорожденного. Приведены данные о динамике фосфолипидного спектра и жирнокислотного состава мозговых тканей и печени в постнатальном онтогенезе. Рассмотрен спектр веществ, оказывающих эффекты в сверхмалых дозах, механизмы действия антиоксидантов в зависимости от дозы. Представлены современные подходы к диагностике и терапии церебральной ишемии новорожденных и обоснована перспективность выполнения настоящего исследования.

Во второй главе описаны материалы и методы исследования. В качестве экспериментальных животных выбраны белые беспородные крысы:

беременные самки на сроке со 2 недели гестации ($n=236$), новорожденные крысята ($n=1274$) в возрасте 0 – 21 суток жизни.

Беременность крыс подтверждали микроскопией вагинального мазка.

Хроническая внутриутробная гипоксия создавалась путем адаптации беременных самок к хронической гипобарической гипоксии. Животных подвергали гипоксии после определения индивидуальной устойчивости к гипоксии (по Л.Д. Лукьяновой, 1998), использовали низкоустойчивых крыс, у которых при гипоксии происходит стимуляция приспособительных ресурсов организма, тогда как у высокоустойчивых – истощение их.

Моделирование хронической внутриутробной гипоксии: беременным крысам-самкам со второй недели гестации в хроническом эксперименте воспроизводилась общая гипобарическая гипоксия. Животных ежедневно в течение 10 дней погружали в специальную камеру, снабженную манометром, предохранительным клапаном, смотровым окошком, щелочным поглотителем для устранения избытка углекислого газа, где создавалось давление 41,1 кПа (308 мм. рт. ст.), что соответствует подъёму на высоту 7000м над уровнем моря. Скорость компрессии и декомпрессии – 0,5 кПа/мин (в течение 80 мин). Экспозиция в условиях разрежения воздуха - 1 час под контролем содержания O_2 и CO_2 в воздухе. Выбранная модель является адекватной, т.к. в результате высотной гипобарической гипоксии происходит нарушение плацентарного кровотока у самок, что является основной причиной фето-плацентарной недостаточности у беременных женщин (Moore LG et al, 2011). Именно плацентарная недостаточность и внутриутробная гипоксия обуславливают нарушения нервно-психического развития и поведения, имея неблагоприятные отдаленные последствия, механизмы развития которых полностью не известны (Anastario M, 2012). Данная модель позднее была использована в работе Morton et al, 2011.

В группах для каждой серии экспериментов использовано по 7-16 животных. Распределение опытных крысят на группы производилось следующим образом. Контрольная группа – интактные крысята в возрасте 0-21 дня. Опытная группа – крысята, перенесшие хроническую внутриутробную гипоксию плода, аналогичного возраста. Группа наблюдения - крысята, перенесшие хроническую внутриутробную гипоксию плода, получавшие фенозан (препарат синтезирован в Институте химической физики АН СССР, относится к экранированным пространственно затрудненным фенолам) в нанодозе ($10^{-16}M$ в 0,1 мл). Группа сравнения - крысята, перенесшие хроническую внутриутробную гипоксию плода, получавшие альфа-токоферол в нанодозе ($10^{-15}M$ в 0,1 мл).

Нанодозировку фенозана получали путем последовательного дробного разведения рабочей смеси, состоявшей из 27,8 мг калиевой соли фенозана, доведенной до 1,0 л 0,036M раствора гидроксида калия (раствор фенозана $10^{-12}M/л$). Животным группы наблюдения ежедневно в течение 5 первых

дней жизни вводили по 0,1мл этого раствора, содержащего 10^{-16} М фенозана. Для введения внутрь пищевода использовали длинную иглу с наконечником.

Аналогичным способом животным группы сравнения в течение первых 5 дней жизни вводили жирорастворимый антиоксидант альфа-токоферол. Масляный 5% раствор альфа-токоферола разводили дробно последовательно в растительном масле до концентрации 10^{-15} М в 0,1 мл.

После родов произведено обследование новорожденных крысят: при рождении, на 1, 3, 5, 8, 10, 12, 21 дни жизни. Забой животных проводили путем декапитации под эфирным наркозом с соблюдением этических требований Международной конвенции о гуманном обращении с животными. Биосубстратами для исследования служили: периферическая кровь, тотальный гомогенат мозга, МХ и МС фракции печени.

Из мозга и печени крысят готовили гомогенаты. Среда выделения состояла из 0,125М KCl. Из гомогенатов печени выделяли МХ и МС фракции методом дифференциального центрифугирования по Shnaider на ультрацентрифуге Beckman в холодной комнате при 0 – 2°C. Экстракцию общих липидов проводили по методу Фолча с рекомендациями (Кейтс М., 1975), с использованием хлороформ-метаноловой смеси в соотношении 2:1. Фракционирование фосфолипидов (ФЛ) проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле. О количестве общих ФЛ и их отдельных фракций судили по содержанию фосфора в них по методу Васьковского. Количество малонового диальдегида (МДА) определяли тестом с тиобарбитуровой кислотой по методу Стальной И.Д. и соавт. (1977), активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по скорости аутоокисления адреналина по Mirsa P.H., Fridovich I. в модификации О.С. Брусова с соавт. (1976), каталазы – перманганатометрически по С.М. Зубковой и соавт. (1976). Определение bcl-2 и p53 в гепатоцитах проводили иммуногистохимически. Клинический материал был собран на базе отделения патологии новорожденных Родильного комплекса №6 г. Ташкента, клиники ТашПМИ, РСНПМЦ Акушерства и гинекологии. Нами обследовано 147 детей (пар мать/новорожденный) с периода новорожденности до 1 года. Из них 20 детей родились доношенными от здоровых матерей и в течение периода новорожденности и первого года жизни были практически здоровы – они составили контрольную группу. 18 детей родились в острой асфиксии, 126 детей имели признаки церебральной ишемии (Р 91.0 по МКБ-Х) различной степени, либо родились от матерей из группы риска по хронической гипоксии плода (матери с анемией, фетоплацентарной недостаточностью (ФПН) и отягощенным соматическим статусом), что также, согласно МКБ-Х, является основанием для диагностирования церебральной ишемии II степени. Асфиксия устанавливалась при рН 7,0 и ниже, дефиците оснований 16 ммоль/л или более в пуповинной крови или крови ребенка в первый час после рождения, оценка по шкале Апгар - 5 и ниже на 10 минуте жизни. У беременных

проводилось общеклиническое, ультразвуковое обследование, биохимические исследования крови. У новорожденных проводились исследования клинического течения церебральной ишемии, анализ основных клинических симптомов и синдромов в динамике. Было осуществлено комплексное соматическое, неврологическое обследование совместно с неонатологом Холматовой З.К., неврологом Сигатуллиной М.И. Нейросонография и доплерография проводилась на аппарате DC7 (MINDRAY) с использованием конвексных датчиков 3,5-5,0-7,5-10 МГц, исследования проведены совместно с к.м.н. Ходжаевой Г.Т. Интра- и перивентрикулярные геморрагии классифицировали Levine, ишемические повреждения – по De Vries. Полученные данные статистически обрабатывались с помощью пакета прикладных программ статистического анализа на компьютере Pentium IV.

В третьей главе представлены результаты собственных исследований становления АОС и уровня генерации АФК, динамики ФЛ спектра в тотальных гомогенатах мозга в различные сроки постнатального периода в норме, после внутриутробной гипоксии плода и при введении антиоксидантов различных классов в нанодозах. Предпосылкой для выбора в качестве предмета исследований тотального гомогената мозга послужили работы G.Y.Sun and B.S.Leung, 2005; Anne M. Bakken, 2006, где установлено, что разные регионы мозга практически идентичны по липидному спектру, антиоксидантной активности, уровню МДА. Абсолютно разные участки мозга – кора, базальные ганглии, мозжечок, при явных морфологических и функциональных различиях имели почти идентичный ФЛ состав, причем не только в соотношении фракций ФЛ, но и их жирнокислотного (ЖК) спектра (Bakken A.M., 2006). Согласно полученным нами результатам, в период с момента рождения до 21 дня жизни крыс происходят существенные перестройки как в составе мембранных ФЛ, так и уровня МДА, активности ферментов антиоксидантной защиты, что можно рассматривать как следствие созревания мозговых структур и синхронизации активности АОС с уровнем генерации АФК.

В постнатальном периоде редокс-статус в мозговой ткани, определяемый балансом уровня генерации АФК и активностью АОС, значительно отличается от такового у половозрелых крыс. При рождении концентрация МДА в мозговой ткани в 1,42 раза ниже, чем у крыс 21 дневного возраста и достоверно отличается от аналогичного показателя на 1 сутки жизни. В течение постнатального периода происходит заметное увеличение уровня МДА, начиная с 8 суток жизни, а после 10 дня дальнейший рост МДА прекращается (рис.1). Увеличение концентрации МДА сопровождается синхронным увеличением активности ферментов АОС – СОД и каталазы. Продукция АФК в мозге усиливается на 8 - 10 сутки жизни в 1,2 – 1,4 раза, а активность СОД и каталазы в эти сроки достоверно

увеличивается в 1,8 – 2,1 и 1,3 – 1,4 раза относительно аналогичных показателей при рождении соответственно (рис.2).

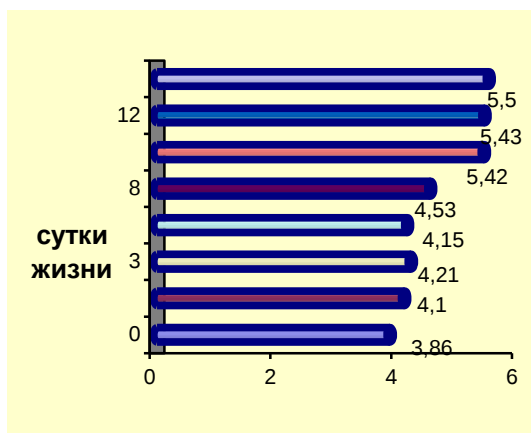


Рис. 1. Содержание МДА (нмоль/мг белка х мин) в мозговых тканях в постнатальном периоде в норме.



Рис. 2. Активность СОД (Е/мг белка) в мозговых тканях в постнатальном периоде в норме.

Из этого следует, что существует уровень АФК, необходимый для развития мозга. АФК являются участниками рецепторных функций центральной нервной системы (ЦНС) – N-метил-D-аспартат (NMDA), глутаматных и других. NMDA рецепторы широко распространены в ЦНС в постсинаптических дендритах, кортикальных астроцитах, но наиболее богаты ими кора, базальные ганглии, гиппокамп. После NMDA активации в мозге усиливается образование супероксид-аниона, который ответственен за регуляцию активности киназы, активируемой внеклеточными стимулами (ERK) и автономную активность протеинкиназы C (ПКС), обеспечивая длительную активацию гиппокампа, лежащую в основе формирования когнитивных функций и памяти (Chiang-Shan Niu, 2008). Примечательно, что обезвреживание супероксиданиона при гиперэкспрессии СОД блокирует гиппокампальную активность и угнетает синаптическую пластичность у молодых животных, а у взрослых – оказывает противоположный эффект, предотвращая окислительный стресс и улучшая функции мозга (Daoying Hu, 2007). Таким образом, по мере созревания мозговой ткани, усиление генерации АФК сопровождается соответствующим увеличением активности антиоксидантной системы для предотвращения их токсического действия и поддержания необходимого уровня АФК для осуществления нейропластичности и синаптогенеза.

Изучение суммарных и индивидуальных ФЛ в различные сроки постнатального периода выявило следующее. Количество общих ФЛ имело тенденцию к увеличению, особенно после 10 дня жизни. В процессе развития головного мозга, происходит равномерное увеличение абсолютного содержания всех фракций ФЛ, особенно, начиная с 12 дня жизни. Сроки достоверного увеличения содержания отдельных ФЛ различны, изменяясь в ряду: лизофосфатидилхолин (ЛФХ) – 1 сутки, фосфатидилсерин (ФС) и

фосфатидилинозитол (ФИ) – 3 сутки, фосфатидилэтаноламин (ФЭА), сфингомиелин (СФМ) – 5 сутки, фосфатидная кислота (ФК) – 8 сутки; кардиолипин (КЛ) – 10 сутки; ФХ – 21 сутки. Суммарные ФЛ достоверно увеличиваются, начиная с 5 дня, их увеличение обусловлено ростом количества ФХ и ФЭА (табл.1).

Таблица 1.

Фосфолипидный состав мозга здоровых крыс в онтогенезе (ммоль липидного Р/кг ткани)

Сутки жизни	ЛФХ	СФМ	ФХ	ФС	ФИ	ФЭА	КЛ	ФК	Сумма
0 сут	0,31± 0,03	1,06± 0,03	18,55± 0,57	1,47± 0,05	1,34± 0,04	10,22± 0,26	1,20± 0,05	0,89± 0,05	35,04± 0,73
1 сут	0,43± 0,02	1,1± 0,04	18,42± 0,65	1,60± 0,06	1,47± 0,05	10,62± 0,40	1,17± 0,04	0,79± 0,06	35,94± 1,09
3 сут	0,44± 0,03	0,98± 0,03	17,63± 0,36	2,23± 0,13	1,62± 0,09	11,33± 0,59	1,36± 0,06	0,86± 0,04	36,45± 1,03
5 сут	0,41± 0,03	1,23± 0,05	17,65± 0,49	3,61± 0,23	1,82± 0,06	12,45± 0,51	1,32± 0,03	0,95± 0,05	39,46± 0,34
8 сут	0,36± 0,01	1,28± 0,05	18,57± 0,48	3,68± 0,23	2,10± 0,03	13,52± 0,25	1,19± 0,01	1,09± 0,02	41,74± 0,40
10 сут	0,35± 0,03	1,27± 0,07	17,41± 0,54	4,28± 0,27	2,07± 0,13	13,62± 0,37	1,46± 0,07	1,14± 0,04	41,61± 1,02
12 сут	0,48± 0,07	2,25± 0,21	22,02± 2,20	6,38± 0,34	2,53± 0,24	14,76± 0,66	2,15± 0,21	1,34± 0,12	47,38± 1,26
21 сут	1,57± 0,15	3,86± 0,11	30,38± 0,44	8,21± 0,31	2,99± 0,07	25,73± 0,46	2,67± 0,07	0,88± 0,01	76,31± 1,33

На 12 сутки жизни происходит резкое увеличение содержания всех фракций ФЛ: увеличение ФС - в 2,53 раза; СФМ в 1,8 раза; ФХ - в 1,3 раза; КЛ – в 1,5 раза; ФИ и ФК - в 1,2 раза по сравнению с 10 днем. Это указывает на «скачок» роста и развития мозговой ткани в этот период. К 21 дню содержание ФХ увеличивается в 1,4 раза, СФМ – в 1,7 раз; ЛФХ - в 3,3 раза; ФС - в 1,3 раза; ФИ- в 1,2 раза; ФЭА - в 1,7 раза, КЛ - в 1,2 раза; суммарных ФЛ – в 1,6 раза, а содержание ФК уменьшается в 1,5 раза по сравнению с 12 сутками жизни. Понижение количества и молярной доли ФК, обнаруженное на 21 день в совокупности с увеличением количества ЛФХ, свидетельствует об ослаблении синтеза ФЛ к этому сроку. Динамика содержания ЛФХ, отражая адаптационную реакцию биомембран клеток мозговой ткани к внеутробной жизни, указывает на увеличение окисления ФЛ мембран в первые 5 дней жизни, когда происходит увеличение абсолютной концентрации ЛФХ в 1,4 – 1,3 раза относительно показателя при рождении с постепенным снижением на 8-10 день жизни. Это позволяет выделить 1 и 5 сутки жизни как критический период развития мозговых тканей, когда мозг наиболее уязвим к воздействию неблагоприятных факторов, а 12 сутки жизни рассматривать как срок интенсификации роста и развития мозга. Это подтверждается обнаруженными нами сдвигами ФЛ состава мозга в постгипоксическом периоде. Именно на 1 и 5 сутки постгипоксического

периода имели место всплеск генерации АФК, угнетение активности СОД и значимые сдвиги содержания функционально важных фракций ФЛ – ФС и ФИ, а на 12 сутки жизни мозговые ткани были особенно чувствительны к введению как жиро-, так и водорастворимого антиоксидантов в нанодозах.

Перенесенная хроническая внутриутробная гипоксия способствует накоплению МДА в тканях мозга уже к моменту рождения и постоянному персистированию его там вплоть до 21 суток жизни, когда отмечается его спонтанное понижение до уровня контроля. Изменения активности ферментов антиоксидантной защиты СОД и каталазы у крысят, подвергнутых внутриутробной гипоксии, имеют однонаправленный характер, отражая напряжение компенсаторных способностей антиоксидантной системы, а затем их истощение. Активность СОД в тканях мозга у крысят опытной группы при рождении повышена в 1,8 раз относительно контроля, к концу первых суток она резко понижается до уровня в 1,9 раз ниже контроля. В течение 3 – 8 суток активность СОД постепенно восстанавливается и, начиная с 10 суток, достоверно не отличается от контроля. При введении нанодоз фенозана достоверное восстановление активности СОД происходит на 8 сутки жизни, а при введении альфа-токоферола – на 21 сутки постгипоксического периода. У животных опытной группы активность каталазы к моменту рождения повышена относительно контроля на 19%, а затем резко снижается, составляя лишь 73% от нормальной. К концу 3 суток она составляет 64% от контроля, на 8, 12 и 21 сутки постгипоксического периода она ниже нормы в 1,7; 1,8 и 1,5 раза соответственно. Введение нанодоз альфа-токоферола способствует восстановлению каталазной активности на 21 сутки жизни, а при введении фенозана активность каталазы остается достоверно сниженной во все сроки наблюдения.

Изменения содержания отдельных ФЛ фракций у животных опытной группы отмечаются во все сроки наблюдения – с момента рождения до 21 дня жизни. Обращает внимание понижение содержания ФХ, ФИ,ДФГ на фоне увеличения ФК и ЛФХ. Молярная доля (%) достоверно отличается от нормы для ЛФХ, СФМ, ФК. Содержание ЛФХ к моменту рождения повышено в 1,6 раза, ФК - 1,2 раза. Суммарные ФЛ понижены на 12% относительно контрольной группы. Во все сроки наблюдения имеет место достоверное относительно контроля снижение количества ФС, что указывает на его окисление и экстернализацию, приводящие к апоптозу. Стабильно низкое количественное содержание ФС является предпосылкой для гибели нейронов путем апоптоза на протяжении первых 5 суток постнатального периода, что ведет к задержке развития мозга, а после 8 суток жизни – может рассматриваться как фактор хронизации поражения мозговых тканей за счет активации под действием ФС иммунной реакции (ChaurioRA et al, 2009), что подтверждено морфологически.

Количество ФИ, отражающее состояние цитоскелета и участвующего в сигнальной трансдукции, также достоверно снижено во все сроки исследования. Это свидетельствует о снижении организации динамики цитоскелета, нарушении деятельности актинсвязывающих белков и полимеризации актина, где непосредственное участие принимает ФИ. Полимеризация актина клеточной мембраны имеет значение во многих процессах – миграции, морфогенезе, эндоцитозе, а фосфатидил инзитол ди- и трифосфаты являются платформой для связывания протеинов, запуска сигнальных каскадов, регуляции активности актин-связывающих белков. Актин-ассоциированные белки способны направленно изменять и деформировать ФИ-богатые мембраны, путем образования впячиваний и выпячиваний (Saarikangas J et al, 2010), необходимых для развития синапсов и нейропластичности. Выявленные изменения содержания ФИ свидетельствуют о нарушении развития цитоскелета и сигнальных функций после перенесенной внутриутробной гипоксии, которые начинают постепенно восстанавливаться к 21 дню жизни (рис. 3).

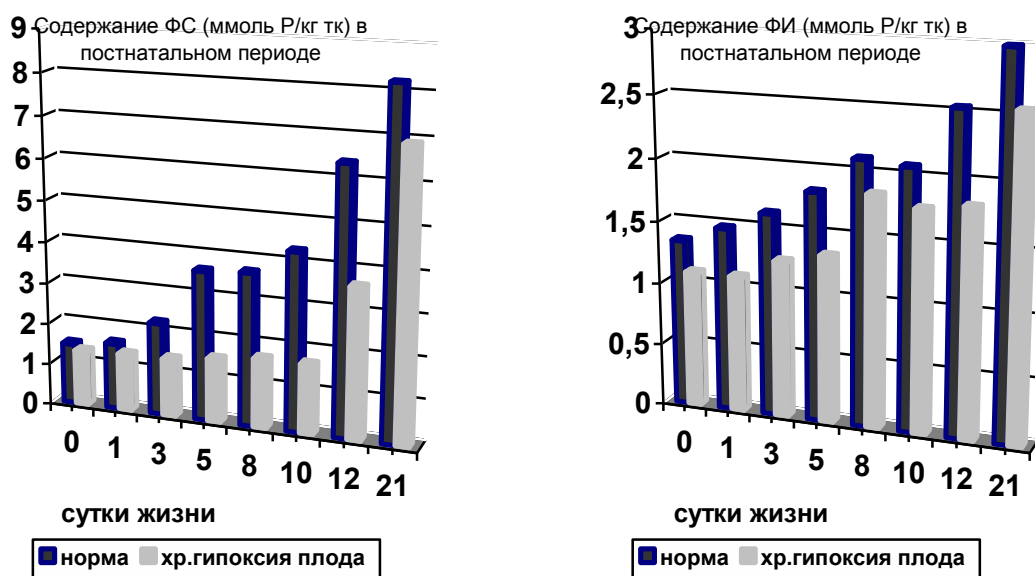


Рис. 3. Содержание ФС (ммоль Р/кг ткани) и ФИ (ммоль Р/кг ткани) в ткани мозга в постнатальном периоде в норме и после гипоксии плода.

Таким образом, полученные результаты изучения фосфолипидного состава мозговых тканей и уровня генерации АФК в различные сроки постгипоксического периода свидетельствуют о следующих изменениях индивидуальных фосфолипидов. Наибольшие отклонения от нормальных показателей молярной доли (%) ФЛ наблюдались для ФИ (в 1,2 раза) – на 5 сутки; ФС (в 2,1 и 2,3 раза) – на 5 и 10 сутки; для ФХ (в 1,2 раза) – 8 сутки; СФМ (в 1,3 раза) – на 3, 8, 12 сутки; ЛФХ (1,8 раза) – на 0 и 8 сутки; КЛ (в 3,3 раза) – на 10 сутки; ФЭА (в 1,3 раза) – на 5, 8 и 12 сутки; ФК (в 1,6 раза) – на 1 и 12 сутки постгипоксического периода. Относительно контроля уровень МДА был наибольшим на 1 сутки жизни (увеличение в 2,0 раза), активность

СОД наиболее интенсивно снижалась на 5 сутки (в 1,5 раза), каталаза – на 10 и 12 сутки – в 1,7 и 1,8 раза соответственно. Как видно из этих данных, увеличение МДА в первые сутки жизни предшествовало изменению ФЛ состава мозговых тканей, проявившемуся сначала (на 5 сутки) нарушениями содержания функционально значимых ФИ и ФС на фоне угнетения активности СОД, а затем – структурных – ФХ, ФЭА (8 сутки). Ремоделирование и нарушения биосинтеза ФЛ отмечались уже с момента рождения и продолжались в течение периода реоксигенации, на что указывает увеличение СФМ, ЛФХ и ФК. На 10 сутки жизни отмечалось максимально выраженное снижение содержания КЛ, что создает предпосылки для нарушения развития митохондрий и энергообмена в мозговых тканях. Возможно, это привело к торможению биосинтеза фосфолипидов и их взаимопревращений на 12 сутки жизни, о чем свидетельствует увеличение молярной доли ФК, ФЭА, СФМ. Наличие нескольких пиков в отклонениях параметров СФМ, ЛФХ и ФК от нормы и нелинейность их изменений свидетельствует длительности патологических сдвигов в отдаленные сроки постгипоксического периода в мозге. Если изменения индивидуальных фракций ФЛ косвенно свидетельствуют о нарушении определенных функциональных характеристик, в реализации которых принимает участие конкретная ФЛ фракция, то в целом, изменения ФЛ состава проявлялись снижением соотношения кислых ФЛ (ФИ+ФС+ФК+КЛ) к нейтральным (ФХ+ФЭА) в 1,4 раза и снижением количества легкоокисляемых ФЛ (ФС, ФИ) в 1,9 относительно контроля на 5 сутки жизни. Это указывает на выраженные изменения структурно-функциональных характеристик мембран мозговых тканей, что может быть обусловлено нарушениями биосинтеза ФЛ в условиях нарушенного редокс-статуса мозговых тканей в виду угнетения ферментативного звена защиты от АФК, также наиболее заметного на 5 сутки жизни. Ферменты защиты от АФК были угнетены длительно, причем в отдаленные сроки реоксигенации наиболее выражено было угнетение активности каталазы. Это позволяет предположить наличие некоего регуляторного механизма, направленного на устранение токсичной перекиси водорода при наличии определенного количества супероксида, необходимого для развития мозговых функций.

Таким образом, после перенесенной внутриутробной гипоксии плода в мозговой ткани имеют место изменения ФЛ состава, которые можно рассматривать как морфологический субстрат для формирования структурно-функциональных нарушений, свойственных перенесенной гипоксии: нарушению формирования рецепторной и сигнальной функций, нейропластичности и роста мозга. В отдаленные сроки это обуславливает нарушение когнитивных функций, отставание нервно-психического развития, снижение памяти, развитие аутизма и других проявлений нарушений высших мозговых функций (Anastario M et al, 2012).

Установлено, что к 21 суткам жизни восстановления до уровня контроля как суммарных, так и индивидуальных фракций ФЛ не происходит, что диктует необходимость коррекции, направленной на снижение окисления ФЛ, стимуляцию их биосинтеза, а также подавление апоптоза и некроза в мозговой ткани. Это согласуется с литературными данными, где показано, что гипоксия плода нарушает развитие мозга, при этом важное значение имеет активация гипоксия-индуцибельных генов, последующий дисбаланс металлопротеиназ и их ингибиторов, нарушение экспрессии генов коллагена, что ведет к aberrантным перестройкам в мозговых тканях и торможению их роста (Tong W, Zhang L., 2012).

Введение антиоксидантов в нанодозах предотвращает накопление в мозге токсичного МДА, обеспечивая условия для нормального развития мозга, т.к. способствует снижению уровня генерации АФК в мозговых тканях, модуляции активности СОД и каталазы, восстановлению баланса ФЛ фракций, что, однако в различной степени выражено при использовании фенозана и альфа-токоферола (табл. 2).

Таблица 2.

Динамика уровня МДА в мозговых тканях при коррекции антиоксидантами в нанодозах

Концентрация МДА (нмоль/мг белка x мин)								
Группа животных	при рождении	24 часа	3 сут	5 сут	8 сут	10 сут	12 сут	21 сут
Контрольная группа (n=8-9), P1	3,86 ±0,09	4,10 ±0,11	4,21 ±0,12	4,15 ±0,12	4,53 ±0,11	5,42 ±0,10	5,43 ±0,08	5,50 ±0,09
Опытная группа (n=8-9), P2	5,33 ±0,09	8,34 ±0,09	7,67 ±0,07	7,83 ±0,08	6,12 ±0,06	5,80 ±0,12	5,70 ±0,07	5,57 ±0,07
Группа наблюдения (фенозан) (n=12-16), P3	-	8,00 ±0,12	6,17 ±0,08	6,19 ±0,07	5,73 ±0,08	5,51 ±0,06	5,49 ±0,05	5,54 ±0,05
Группа сравнения (альфа-токоферол) (n=8-12), P4	-	8,12 ±0,11	6,87 ±0,11	6,80 ±0,14	5,90 ±0,11	5,86 ±0,15	5,53 ±0,11	5,56 ±0,09
P 1:2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,05	>0,05
P 1:3	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05
P 1:4	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05
P 2:3	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05
P 2:4	-	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
P 3:4	-	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05

При введении нанодоз водорастворимого антиоксиданта фенозана снижение уровня МДА до контрольного уровня наблюдается раньше – к 10 суткам, при введении жирорастворимого альфа-токоферола – на 12 сутки. Активность СОД при введении нанодоз фенозана восстанавливается значительно быстрее, становясь сравнимой с контролем, начиная с 5 суток жизни, активность каталазы – с 8 суток жизни, тогда как при введении альфа-токоферола активность СОД и каталазы становилась сравнимой с контролем лишь на 21 сутки жизни. Причем, у крыс, получавших фенозан, активность

каталазы достоверно отличается от показателей в опытной группе во все сроки наблюдения; при введении альфа-токоферола эти отличия достоверны, лишь, начиная с 8 суток жизни. Это доказывает высокую эффективность действия фенозана на ферментативное звено АОС в мозговой ткани.

Как показали результаты наших исследований, наиболее уязвимыми в отношении усиления генерации активных форм кислорода являются крысы на 5 день жизни. Если к 10 дню уровень генерации АФК в ткани мозга снижается, то к 21 дню происходит полная нормализация концентрации МДА. Это согласуется с утверждением о том, что у крыс на 4-7 день жизни чувствительность к эксайтотоксическим аминокислотам минимальна и увеличивается к 8-12 дню, а к 18 дню от NMDA эксайтотоксичности погибает до 90% нейронов (Haddad GG, Shan PYu, 2009). В мозге предиктором выхода кальция и запуска NMDA-токсического каскада, а также предиктором нарушения мембранного потенциала с развитием нарушения поглощения кислорода клеткой и ее гибелью является активация генерации АФК в митохондриях незрелых нейронов. Нейроны способны остановить нарушенный кальциевый гомеостаз, если он непродолжителен – несколько дней, если нарушение длится более недели – то это невозможно и клетки погибают. Мы полагаем, что введение нанодоз антиоксидантов фенозана и альфа-токоферола позволяет купировать активацию генерации АФК в эти критические периоды и обеспечить нормальное развитие клеток мозговой ткани, о чем можно судить по результатам изучения фосфолипидного состава.

На 5 и 12 сутки жизни под действием нанодоз антиоксидантов происходила частичная и полная нормализация фосфолипидного спектра мозговых тканей, что доказывает их эффективность, однако механизмы действия фенозана и альфа-токоферола в мозговых тканях были различны.

Под действием нанодоз фенозана в мозговых тканях изменение в сторону нормализации молярной доли индивидуальных ФЛ начинается с 3 суток жизни, когда имеются достоверные отличия показателей СФМ, ФХ, ФЭА, КЛ между опытной группой, и группой, получавшей фенозан в нанодозе. Не смотря на это, статистически сравнима с контролем в этот срок только молярная доля ФИ. На 5 сутки жизни, являющиеся критическими для развития постгипоксических изменений в мозге, молярные доли ФС и ФИ увеличиваются, однако не достигают контрольных величин, при этом достоверно отличаясь от показателей в опытной группе. Эта разница также достоверна для молярной доли ЛФХ, ФЭА, ФК.

Фенозан и альфа-токоферол в нанодозах приводят к нормализации количественного содержания суммарных и индивидуальных ФЛ к 12 суткам жизни, что создает морфологическую основу для нормального развития мозга и формирования нейропластичности. При введении нанодоз фенозана содержание молярной доли ЛФХ, ФХ, ФЭА, КЛ, ФК на 12 сутки жизни достоверно не отличается от контрольного. Молярная доля СФМ при этом

значительно ниже, чем в контрольной (в 1,6 раза) и опытной группе (1,2 раза). Вероятно, это обусловлено замедлением превращений ФХ в СФМ, либо перераспределением ЦДФ-холина в пользу синтеза ФХ, молярная доля которого превышает контрольные показатели на 11%, хотя это различие статистически недостоверно. При введении нанодоз альфа-токоферола отмечаются разнонаправленные сдвиги содержания единичных фракций ФЛ в течение 1-10 суток; на 12 сутки постнатального периода происходит достоверное увеличение до уровня контроля молярной доли ЛФХ, ФХ, ФИ, ФЭА, КЛ, ФК (табл. 3) и содержания МДА, тогда как активность СОД и каталазы нормализуются к 21 суткам жизни. Это указывает на специфическое взаимодействие нанодоз альфа-токоферола с фосфолипидами мозговой ткани. При использовании нанодоз водорастворимого антиоксиданта фенозана в мозговых тканях в постгипоксическом периоде происходит достоверное восстановление активности СОД – на 5 сутки, снижение до уровня контроля МДА – на 10 сутки, чем обусловлены положительные сдвиги содержания отдельных ФЛ фракций: ЛФХ, ФХ, ФЭА, КЛ, ФК на 12 сутки постгипоксического периода (табл.3).

Таблица 3.

Содержание ФЛ фракций в мозговых тканях при введении нанодоз антиоксидантов на 12 сутки постнатального периода (%), сумма – 100%

Группа животных	ЛФХ	СФМ	ФХ	ФС	ФИ	ФЭА	ДФГ	ФК
Контрольная группа (n=6), P1	0,92± 0,12	4,32± 0,32	42,22± 3,51	12,27± 0,45	4,86± 0,37	28,72± 5,24	4,12± 0,32	2,57± 0,19
Опытная группа (n=8), P2	1,34± 0,02	3,33± 0,15	37,99± 0,31	9,00± 0,15	4,49± 0,06	35,87± 0,34	3,91± 0,07	4,07± 0,17
Группа наблюдения (фенозан) (n=8), P3	1,03± 0,02	2,73± 0,22	47,03± 0,63	13,87± 0,40	3,39± 0,10	26,37± 0,53	3,50± 0,24	2,08± 0,28
Группа сравнения (альфа-токоферол) (n=8), P4	1,11± 0,01	3,36± 0,03	36,24± 0,49	9,27± 0,08	5,60± 0,05	37,41± 0,29	3,55± 0,03	3,46± 0,03
P1:2	<0,01	<0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001
P 1:3	>0,05	<0,01	>0,05	<0,05	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05
P1:4	>0,05	<0,01	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	<0,01
P 2:3	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001
P 2:4	<0,001	>0,05	<0,05	>0,05	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01
P 3:4	<0,01	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	<0,01

Полученные результаты свидетельствуют о преимущественном влиянии фенозана на ферментативное звено защиты от АФК в мозговой ткани, способствующей снижению окисления ФЛ в течение постнатального периода и созданию благоприятных условий для развития мозга. Примечательно, что в процессе коррекции нанодозами антиоксидантов происходит нормализация молярной доли и оптимизация до нормы соотношения фосфолипидных фракций, тогда как их абсолютное содержание (ммоль Р/кг ткани) не восстанавливается. Это указывает на стимуляцию компенсаторных свойств

мозга и восстановление клеточного гомеостаза за счет ремоделирования мембран на фоне снижения интенсивности биосинтеза ФЛ. Полученные нами результаты различной эффективности фенозана и альфа-токоферола в мозговых тканях согласуются с ранее выявленными фундаментальными представлениями о механизмах действия фенозана и зависимости их от дозы.

Существуют данные, что эффекты фенозана в нанодозах обусловлены его прямым влиянием на ферменты, суперактивацией протеинкиназы С, а также реакцией с пероксирадикалами, активными формами кислорода, рецепторными взаимодействиями, параметрическим резонансом, структурной памятью воды. Возможно, обнаруженное нами увеличение активности СОД и каталазы указывает на его модулирующие свойства в отношении этих ферментов. Понижение концентрации конечного продукта липопероксидации МДА под действием фенозана, возможно, обусловлено снижением его образования за счет обрыва цепи в результате реакции самонейтрализации (рекомбинации) свободных радикалов, что в свою очередь может быть обусловлено свойствами особых структур воды, упорядоченной фенозаном. Мы полагаем, что нормализация редокс-статуса в мозговых тканях под действием фенозана приводит к снижению переокисления ФЛ и оптимизации их биосинтеза, что проявляется нормализацией содержания отдельных ФЛ фракций.

Мы предполагаем, что определенный вклад в восстановление антиоксидантного статуса в мозговых тканях вносит также стабилизация генерации АФК и снижение пероксидации в печени, поскольку используемые антиоксиданты оказывают системное действие. Имеются данные, что фенозан в широком диапазоне концентраций ($10^{-3} - 10^{-23}$ М) обладает стабилизирующим эффектом на поверхностные слои и глубоко лежащие области липидов плазматической мембраны и мембран эндоплазматической сети гепатоцитов.

В четвертой главе представлены результаты собственных исследований влияния фенозана в нанодозах в сравнении с альфа-токоферолом на становление антиоксидантной системы, уровень генерации АФК, динамику фосфолипидного спектра в митохондриальной фракции печени после внутриутробной гипоксии плода.

В норме МХ печени новорожденных крыс характеризуются высоким содержанием ФЭА и низким – КЛ, которые изменяются разнонаправленно в постнатальном периоде. Известно, что оба этих ФЛ участвуют в регуляции состояния МХ и морфогенезе крист в комплексе с прохибитами (Osman S et al, 2009). Содержание суммарных ФЛ в МХ фракции печени возрастает от момента рождения к 21 суткам в 1,2 раза. В процессе развития МХ происходит прогрессивное увеличение содержания КЛ, которое превышает показатели при рождении в 2,5 раза на 21 сутки исследования, молярная доля ФХ и ФИ достоверно не изменяется, а доля ФК достоверно снижается после 10 суток жизни. В норме изменение активности СОД в течение

постнатального периода было на 32%, а каталазы – на 8%, что указывает на более выраженную зрелость антипероксидной защиты относительно антирадикальной в МХ печени. С другой стороны, более низкая активность СОД на фоне высокой активности каталазы у новорожденных особей свидетельствует о физиологической роли супероксида в развитии МХ печени, тогда как токсическая перекись водорода эффективно обезвреживается каталазой, сдерживая повреждающий эффект АФК. Гипоксия плода способствует нарушению нормального развития митохондриальной фракции печени, поскольку вызывает существенные перестройки в составе фосфолипидов уже к моменту рождения (табл.4) на фоне увеличения концентрации МДА в 1,3 раза по сравнению с нормой.

Таблица 4.

Содержание индивидуальных ФЛ фракций в МХ печени к моменту рождения (%),
сумма – 100%

Группа животных	ЛФХ	СФМ	ФХ	ФС	ФИ	ФЭА	КЛ	ФК
Контрольная группа (n=6), P1	0,6± 0,05	2,4± 0,12	41,30 ±1,20	1,90± 0,07	4,00±0, 08	41,50 ±1,40	6,20± 0,13	2,10± 0,04
Опытная группа (n=8), P2	1,00± 0,04	3,20± 0,10	37,30 ±1,10	1,70± 0,05	3,50±0, 06	47,80 ±1,20	3,10± 0,16	2,40± 0,06
P 1:2	<0,001	<0,01	<0,05	>0,05	<0,01	<0,01	<0,001	<0,01

Усиление генерации АФК в МХ фракции печени приводит к усилению липопероксидации, о чем свидетельствует увеличение молярной доли ЛФХ в 1,6 раза относительно контроля к моменту рождения. Наиболее значимые изменения молярной доли отдельных ФЛ фракций отмечались на 3 сутки постгипоксического периода. В этот срок снижение ФХ было на 15%, ФС – в 1,6 раза; ФИ – в 1,3 раза; увеличение ФЭА – в 1,25 раза; снижение ФК на 15% относительно контроля. Это позволило нам рассматривать 3 сутки постгипоксического периода как срок наибольшей уязвимости МХ фракции печени. Примечательно, что молярная доля маркера МХ - КЛ была резко снижена относительно контроля на протяжении всего постнатального периода у животных опытной группы: в 2,0; 2,5; 2,8; 3,0; 3,3; 1,9; 1,6 раз соответственно на 1,3,5,8,10,12,21 сутки жизни (рис. 4).

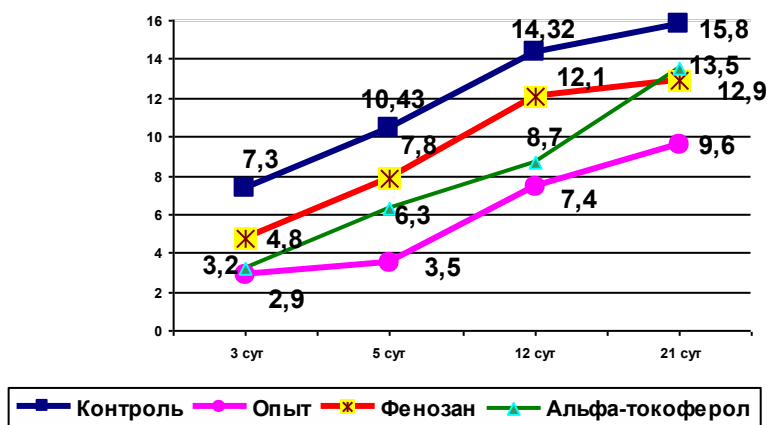


Рис. 4. Изменения молярной доли кардиолипина (%) в МХ печени в постнатальном периоде при введении антиоксидантов в нанодозах.

При введении нанодоз антиоксидантов содержание КЛ имело положительную динамику. Мы полагаем, что столь выраженное изменение содержания КЛ вызвано его окислением, либо нарушением биосинтеза. КЛ чувствителен к действию АФК из-за высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот. Окисление КЛ нарушает работу МХ мембран, их жидкость, ионную проницаемость, структурно-функциональное состояние компонентов ЦПЭ, что ведет к снижению окислительного фосфорилирования и апоптозу (Bayer H et al, 2006). Гиперпродукция АФК в МХ – это не побочный эффект дезинтеграции МХ, а самостоятельный процесс, имеющий значение для апоптоза. Это связано с тем, что в МХ имеется пул кардиолипина, связанный с цитохромом с и действующий как кардиолипиноксигеназа, активируемая при апоптозе. Она утилизирует образуемые АФК и обуславливает селективное окисление кардиолипина, который необходим для освобождения проапоптотических факторов из МХ в цитозоль. Этот механизм с участием цитохрома с запускается раньше, чем другие реакции образования апоптосомы и активации каспаз. В цитозоле цитохром с взаимодействует с анионным ФЛ – ФС, катализирует его окисление в аналогичной оксигеназной реакции. Окисление ФС облегчает его экстернализацию, а наличие ФС на наружной поверхности плазматической мембраны служит сигналом для узнавания макрофагами апоптотической клетки. При использовании нанодоз фенозана содержание КЛ достигает уровня контроля на 12 сутки, однако достоверно отличается от показателей в опытной группе во все сроки наблюдения, начиная с 3 суток жизни.

Введение фенозана в нанодозах способствует нормализации молярной доли ЛФХ, ФХ, ФС, ФИ, ФК на 3 сутки жизни, что устраняет дисбаланс ФЛ в МХ фракции печени, обусловленный гипоксией.

В норме в постнатальном периоде увеличение молярной доли СФМ в МХ фракции печени незначительно, а при гипоксии – резко возрастает, что по срокам совпадает со снижением доли ФХ, КЛ, ФС. Эти данные косвенно указывают на избыточное усиление апоптоза гепатоцитов до середины второй недели постнатального периода после перенесенной гипоксии плода, что подтверждается морфологически. Под действием фенозана молярная доля СФМ становится сравнимой с контролем на 8 сутки жизни, что указывает на его антиапоптотное действие, подтвержденное снижением количества p53 и увеличением bcl-2 в гепатоцитах. Молярная доля ФК в постгипоксическом периоде в МХ печени крыс была достоверно увеличена во все сроки наблюдения, что может быть обусловлено активацией фосфолипазы Д (ФЛД) и деградацией ФХ, либо активацией неканонических фосфолипаз – представителей семейства ФЛД, локализующихся на поверхности МХ – мито-ФЛД. Активация мито-ФЛД приводит к гидролизу КЛ и последующему изменению проницаемости МХ мембран (Brindley DN et al, 2009). ФК, образованная при деградации КЛ, облегчает проникновение в

МХ белков митофузинов и последующее повреждение МХ, их проницаемости и энергосинтеза. На поверхности МХ ФК стимулирует местно продукцию ФИ-4,5-дифосфата, облегчающего проницаемость МХ и субклеточный трафик ионов кальция, и последующий апоптотический каскад. Содержание ФИ в МХ фракции печени у животных опытной группы было снижено на 3 сутки в 1,3 раза, а затем увеличено в 1,4 раза относительно контроля на 12 сутки постгипоксического периода.

При введении нанодоз фенозана молярная доля ФИ достоверно не отличалась от контроля на 3,10,12,21 сутки жизни. Использование альфа-токоферола способствовало нормализации молярной доли ЛФХ - на 12 сутки, ФХ – на 10 сутки, легкоокисляемых фракций ФЛ: ФС и ФИ – на 3 сутки, а уровень СФМ, ФХ, ФС, ФК восстанавливался до контрольных значений на 10 сутки жизни, что значительно позже, чем при ведении фенозана.

Как показали результаты изучения ФЛ спектра МХ фракции печени, в постгипоксическом периоде введение нанодоз фенозана способствует полному восстановлению ФЛ спектра МХ на 12 сутки и частичной нормализации содержания молярной доли отдельных ФЛ фракций при введении альфа-токоферола. Динамика содержания МДА при введении нанодоз антиоксидантов указывает на нормализацию его уровня на 5 и 8 сутки постнатального периода при введении альфа-токоферола и фенозана соответственно. Увеличение активности СОД в МХ фракции печени под действием фенозана и альфа-токоферола носят статистически недостоверный характер в течение всего постнатального периода. У крыс опытной группы с 10 по 21 день эксперимента активность СОД достоверно ниже контроля в 2,2-2,3 раза, что указывает на стойкое угнетение активности фермента под действием АФК, уровень генерации которых в эти сроки увеличен, а введение антиоксидантов все же оказывает положительный эффект (рис.5).

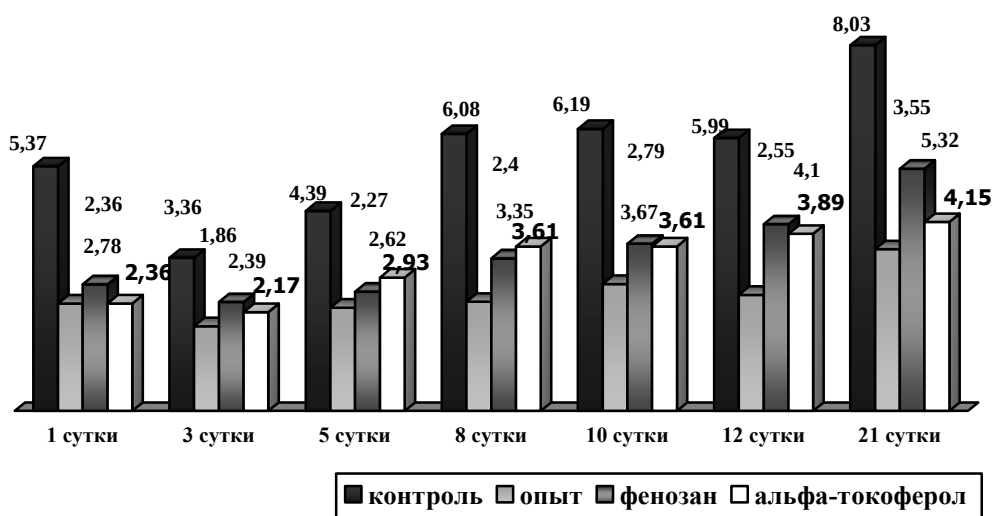


Рис. 5. Активность СОД (Е/мг белка) в МХ печени в постгипоксическом периоде на фоне введения нанодоз антиоксидантов.

Активность каталазы достоверно повышается на 8 сутки под действием нанодоз альфа-токоферола, а фенозан способствует достоверному увеличению активности каталазы относительно показателя в опытной группе лишь на 21 сутки жизни.

Таким образом, как видно из полученных нами результатов, 3 сутки постнатального периода являются критическим сроком ФЛ перестроек и ремоделирования МХ мембран в норме и сроком наибольшей уязвимости МХ печени в постгипоксическом периоде. На 3 сутки выявлены наиболее значимые изменения молярной доли ФХ, ФЭА, ФС, ФИ, ФК и уровня генерации АФК. На 12 сутки постгипоксического периода под действием нанодоз фенозана происходит нормализация всех фракций ФЛ в МХ фракции печени, чему предшествует снижение до контрольного уровня концентрации МДА на 8 сутки жизни. При этом восстановления активности СОД и каталазы не происходит, что позволяет предположить нормализацию динамического равновесия ПОЛ/АОС за счет непосредственного антирадикального и протекторного действия фенозана на ФЛ в МХ печени, его антиапоптозных свойств, подтвержденных увеличением bcl2 и снижением p53 в гепатоцитах.

В пятой главе представлены результаты собственных исследований влияния нанодоз антиоксидантов различных классов на становление антиоксидантной системы, уровень генерации АФК, динамику фосфолипидного спектра в микросомальной фракции печени после внутриутробной гипоксии плода.

Как показали результаты наших исследований, МС фракция печени у новорожденных крысят отличается более низким уровнем генерации АФК относительно крыс 21 дневного возраста. Так, при рождении уровень МДА был ниже аналогичного показателя на 5 сутки жизни в 1,8 раза. К 8 суткам постнатального периода отмечалось увеличение содержания МДА с последующей стабилизацией к 10-12 суткам жизни. Активность ферментов антиоксидантной защиты в МС фракции печени в раннем постнатальном периоде была на очень низком уровне, начиная с момента рождения до 3 суток жизни (табл. 5), что, вероятно, обусловлено, незрелостью микросомальной окислительной системы и слабой интенсивностью генерации АФК микросомальными оксигеназами.

Таблица 5.

Активность СОД (Е/мг белка) в постнатальном онтогенезе в МС фракции печени

Сутки жизни	0 (P1)	1 (P2)	3 (P3)	5 (P4)	8 (P5)	10 (P6)	12 (P7)	21 (P8)
СОД	1,02 ±0,07	1,12 ±0,14	1,15 ±0,05	1,37 ±0,09	1,67 ±0,12	2,40 ±0,13	3,09 ±0,20	5,18 ±0,87
P	-	P 1:2	P 1:3	P 1:4	P 1:5	P 1:6	P 1:7	P1:8
	-	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,001	<0,001	<0,01

В МС печени крыс опытной группы наблюдается резкое увеличение уровня МДА относительно контроля – в 1,9; 6,5; 3,8; 3,2; 3,1; 1,9; 1,8; 1,4 раза соответственно срокам при рождении, на 1, 3, 5, 8, 10, 12 и 21 сутки (рис.7).

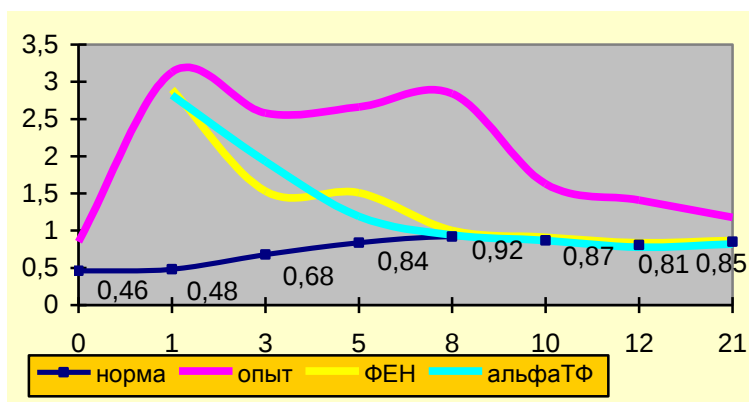


Рис.6. Динамика МДА (нмоль/мг белка x мин) в МС печени в постгипоксическом периоде при действии нанодоз антиоксидантов разных классов.

Введение водорастворимого антиоксиданта способствует значительному снижению уровня МДА в МС фракции печени, начиная с 8 суток. Так, отсутствует достоверная разница между показателями МДА в группе, получавшей фенозан, и контроле на 8, 10, 12 и 21 сутки жизни.

Введение альфа-токоферола способствует нормализации уровня МДА в МС - фракции на 8 сутки до уровня, достоверно не отличающегося от контроля. Также он способствует восстановлению активности СОД на 21 сутки, чего не наблюдается при действии фенозана.

В опытной группе в МС фракции печени активность СОД понижена во все сроки исследования в 2,3-4,3 раза, причем пик угнетения ее активности приходится на 12 сутки (в 4,7 раза), а на 21 день жизни активность СОД остается пониженной в 3,5 раза. При введении фенозана активность СОД также остается пониженной, однако интенсивность понижения составляет 1,9-1,3 раза относительно контроля. К 21 дню жизни при введении фенозана активность СОД увеличивается, но не до уровня контроля.

Достоверное увеличение активности каталазы в МС печени происходит при действии нанодоз фенозана – на 12 сутки, альфа-токоферола – на 3 сутки, в дальнейшем отмечается нормальная каталазная активность до 21 дня эксперимента. Возможно, столь выраженная активность антиоксидантов в МС фракции печени крыс, перенесших внутриутробную гипоксию, обусловлена тем, что альфа-токоферол и фенозан проявляют антиокислительные свойства именно в мембранах эндоплазматического ретикулума. Это согласуется с данными Бурлаковой Е.Б., где отмечена высокая эффективность фенозана и альфа-токоферола в эндоплазматической сети (ЭПР) в широком диапазоне концентраций. И природный (альфа-токоферол), и синтетический (фенозан) антиоксиданты обладают

стабилизирующим эффектом на глубоко лежащие области липидов плазматической мембраны и мембраны ЭПР (Алексеева О.М., 2010).

Изменения индивидуальных фракций ФЛ выявили резкое увеличение ЛФХ в течение всего постнатального периода с максимумом на 5 сутки (в 3,5 раза), увеличение молярной доли СФМ с максимумом на 3 и 5 сутки (в 1,4 раза), увеличение доли ФЭА – на 1 и 3 сутки (в 1,3 раза) относительно контроля. Было зарегистрировано однократное увеличение молярной доли ФК на 10 сутки жизни; снижение ФХ в течение 1-5 суток в 1,25 раза, отсутствие достоверных изменений ФС, достоверное понижение ФИ на 3 и 5 сутки жизни. Активность СОД в МС печени была резко угнетена с максимумом на 12 сутки, а каталазы – на 3 сутки постнатального периода. Выявленные нарушения ФЛ спектра и уровня генерации АФК в МС фракции печени позволяют рассматривать 3-8 сутки жизни как наиболее значимые в плане изменений ФЛ состава при перманентно нарушенной активности АОС. Использование нанодоз антиоксидантов обнаружило их высокую эффективность в МС печени: эффект в отношении нормализации уровня ЛФХ отчетливо проявлялся у фенозана – на 3, а у альфа-токоферола – на 5 сутки жизни, сохраняясь до конца периода наблюдения, не смотря на прекращение их введения на 5 день жизни (рис.7).

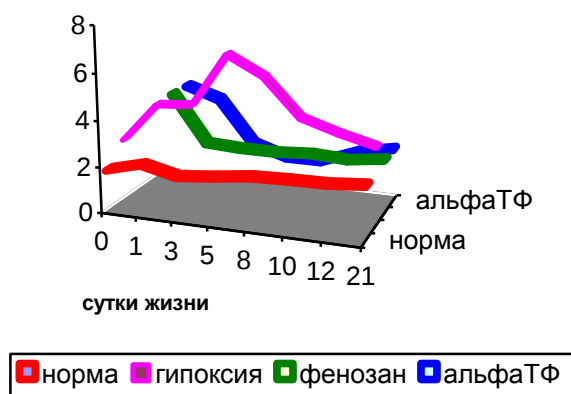


Рис. 7. Содержание ЛФХ в МС печени в постгипоксическом периоде при коррекции нанодозами антиоксидантов, %.

Спонтанного восстановления содержания ФХ в МС печени крыс, перенесших гипоксию плода, не наблюдалось, а при введении фенозана и альфа-токоферола изменялось однонаправлено в сторону нормализации до уровня контроля на 8 сутки жизни. Достоверная нормализация содержания ФЭА при использовании нанодоз антиоксидантов отмечалась на 5 сутки жизни, чего не происходило без введения антиоксидантов. Введение фенозана способствовало нормализации молярной доли СФМ на 8 сутки, а альфа-токоферола – на 10 сутки постнатального периода, что способствовало увеличению жидкостности мембраны, необходимой для адекватного функционирования мембраносвязанных ферментов. Сравнительный анализ эффективности фенозана и альфа-токоферола обнаружил более раннее

развитие эффекта в МС печени у альфа-токоферола – нормализация содержания молярной доли большинства индивидуальных ФЛ происходила на 5 сутки, когда уровень ЛФХ, ФС, ФЭА, ФК достоверно не отличался от контроля на фоне нормальной активности каталазы и СОД. При использовании фенозана достоверная нормализация отмечалась для ЛФХ, СФМ, ФХ – на 8 сутки жизни, ФЭА – на 5 сутки. На 12 сутки эксперимента содержание всех фракций ФЛ, за исключением ФК, на фоне коррекции было на уровне контрольных величин, а активность каталазы и СОД достоверно восстанавливалась на 12 и 21 сутки жизни (табл. 6).

Таблица 6.

Молярная доля индивидуальных ФЛ МС фракции печени на 12 сутки постнатального периода в зависимости от вида коррекции антиоксидантами

Группа животных	ЛФХ	СФМ	ФХ	ФС	ФИ	ФЭА	КЛ	ФК	Сум ма
Контрольная группа (n=7), P1	2,17± 0,04	7,9± 0,06	54,83± 1,32	3,00± 0,05	8,60± 0,30	21,70± 0,70	0	1,80± 0,05	100
Опытная группа (n=8), P2	3,80± 0,06	10,10± 0,10	47,50± 0,80	3,00± 0,10	8,20± 0,30	25,20± 0,40	0	2,20± 0,06	100
Группа наблюдения (фенозан) (n=12), P3	2,20± 0,05	8,10± 0,15	52,30± 1,10	3,00± 0,30	8,90± 0,10	23,30± 0,40	0	2,20± 0,04	100
Группа сравнения (альфа-токоферол) (n=8), P4	2,10± 0,05	8,10± 0,22	54,30± 1,14	3,00± 0,22	8,50± 0,10	21,90± 0,50	0	2,10± 0,04	100
P1:2	<0,001	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05	-	<0,01	
P 1:3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-	<0,001	
P1:4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-	<0,01	
P 2:3	<0,001	<0,001	<0,01	>0,05	>0,05	<0,05	-	>0,05	
P 2:4	<0,001	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05	<0,01	-	>0,05	
P 3:4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	-	>0,05	

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности фенозана и альфа-токоферола в МС печени крыс в постнатальном периоде, обеспечивающей стабилизацию биомембран МС печени до уровня контроля, начиная со второй недели жизни. Это указывает на то, что последствия перенесенной гипоксии сильно отражаются на состоянии печени, которая в поздние сроки реоксигенации сама является источником образования МДА, поддерживая патологический процесс. Это подтверждается увеличением уровня МДА в крови во все сроки постгипоксического периода.

В шестой главе представлены данные об эффективности нанодоз антиоксидантов разных классов на уровень окислительного стресса и активность ферментов АОС в крови. В периферической крови пик увеличения концентрации МДА при гипоксии плода приходится на 3 сутки постнатального периода с последующим снижением до контрольного уровня

на 21 сутки. При введении фенозана понижение концентрации МДА в крови отмечается уже с 3 суток жизни, достигая контроля к 12 суткам, а при введении альфа-токоферола нормализация отмечалась на 5 сутки жизни. Активность СОД в крови у крыс опытной группы резко понижена уже при рождении - в 5,14 раза относительно контроля, и продолжает снижаться, к концу 1 суток становясь в 7,9 раз ниже, чем в контрольной группе. Начиная с 3 суток эксперимента, активность СОД несколько возрастает, однако не достигает уровня контроля даже на 21 день жизни, оставаясь сниженной в 1,4 раза по отношению к нему. Спонтанной нормализации активности СОД в крови не происходит во все сроки наблюдения, а введение фенозана и альфа-токоферола способствует повышению активности фермента на 21 и 8 сутки жизни соответственно. Введение альфа-токоферола способствует нормализации активности каталазы крови к 21 дню жизни и достоверному ее увеличению относительно опытной группы в остальные сроки наблюдения.

В седьмой главе представлены результаты сравнительного анализа адаптации новорожденных к церебральной ишемии при внутриутробной гипоксии в зависимости от уровня генерации АФК и активности ферментов АОС. В зависимости от активности ферментов АОС обследованные пары (мать/ребенок) были разделены на четыре группы. У обследованных 1-й группы (как у рожениц, так и в пуповинной крови) установлена достаточно высокая (в сравнении с другими группами) активность СОД и каталазы при нормальном уровне МДА. Высокая активность СОД и каталазы соответствовала хорошей адаптации организма ребенка к внеутробной жизни, церебральная ишемия не развивалась. У обследованных (беременных и новорожденных) 2-й и 3-й групп обращала на себя внимание разнонаправленная активность исследуемых ферментов при высоком уровне МДА. Во 2-й группе на фоне достаточной активности каталазы отмечена сниженная активность СОД. В 3-й группе на фоне нормальной активности каталазы определялась относительно низкая активность СОД. У новорожденных 2-й и 3-й групп, процессы, происходящие на клеточном уровне и установленные с помощью определения ферментативной активности, проявлялись рядом клинических особенностей. Так, у всех детей было отмечено затянувшееся (до 8-10 дней) течение транзиторных состояний. Кроме того, у большинства новорожденных из 2-й и 3-й групп, в первые 7-10 дней жизни отмечались поражения ЦНС с синдромами гипервозбудимости или угнетения, что характеризует смену фаз церебральной дисфункции и трактуется как признак церебральной ишемии II степени. У пар 4 группы имелось резкое угнетение как активности СОД, так и каталазы при сильно повышенном уровне МДА. В этой группе наблюдалась прогрессирующая потеря церебральной активности, церебральная гипертензия и были зарегистрированы неблагоприятные исходы заболевания. По результатам клинического наблюдения с учетом данных нейровизуализации за новорожденными с признаками церебральной

ишемии и изучения анамнестических и биохимических параметров в крови у их матерей и пуповинной крови составлена шкала субоптимальности перинатального риска для неблагоприятных факторов. В ней предложены степени риска развития церебральной ишемии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы.

1. Хроническая внутриутробная гипоксия сопровождается накоплением МДА в мозговых тканях на протяжении всего постнатального периода, последовательным снижением молярной доли легкоокисляемых, затем структурных ФЛ на фоне угнетения активности СОД, после чего снижается содержание КЛ и происходит увеличение молярной доли ФК, ФЭА, СФМ. Выраженность указанных изменений максимальна на 5, 8, 10 и 12 сутки жизни соответственно, что ведет к снижению количества суммарных ФЛ и создает неблагоприятные условия для развития мозговых тканей в постнатальном периоде.

2. При использовании нанодоз водорастворимого антиоксиданта фенозана в мозговых тканях в постгипоксическом периоде происходит достоверное восстановление активности СОД – на 5 сутки, снижение до уровня контроля МДА – на 10 сутки, чем обусловлены положительные сдвиги содержания отдельных ФЛ фракций: ЛФХ, ФХ, ФЭА, КЛ, ФК на 12 сутки постгипоксического периода. Это свидетельствует о преимущественном влиянии фенозана на ферментативное звено АОС в мозговых тканях, способствующем снижению окисления ФЛ в течение постнатального периода и оптимизации условий для развития мозга.

3. В МХ фракции печени 3 сутки постнатального периода являются сроком наиболее интенсивного ремоделирования МХ мембран в норме и периодом наибольшей уязвимости МХ печени после перенесенной гипоксии плода, т.к. в этот срок выявлены наиболее значимые изменения молярной доли ФХ, ФЭА, ФС, ФИ, ФК и уровня генерации АФК. Достоверное снижение содержания маркера МХ кардиолипина и суммарных ФЛ во все сроки постгипоксического периода на фоне угнетения ферментативного звена АОС указывает на изменения структуры МХ в гепатоцитах и их апоптоз, подтвержденный морфологически. Это доказывает вклад окисления КЛ в запуск МХ пути апоптоза в гепатоцитах при гипоксии плода.

4. В МХ фракции печени на 12 сутки постгипоксического периода под действием нанодоз фенозана происходит нормализация всех фракций ФЛ, чему предшествует снижение до контрольного уровня концентрации МДА на 8 сутки жизни. Восстановления активности СОД и каталазы не происходит, что позволяет предположить нормализацию динамического равновесия ПОЛ/АОС за счет непосредственного антирадикального и протекторного действия фенозана на ФЛ в МХ, а также его антиапоптозных свойств.

5. Введение нанодоз альфа-токоферола приводит к частичной нормализации содержания молярной доли отдельных ФЛ фракций при достоверном

снижении до контрольного уровня концентрации МДА на 5 сутки жизни и увеличении активности СОД и каталазы на 8 сутки жизни, демонстрируя модулирующий эффект альфа-токоферола на активность ферментативного звена АОС в МХ фракции печени.

6. В МС фракции печени изменения индивидуальных фракций ФЛ наиболее выражены на 3-8 сутки постгипоксического периода, при постоянной персистенции до 21 суток высокой концентрации МДА, ЛФХ и угнетении активности СОД. Наличие проявлений пероксидации в отдаленные сроки после реоксигенации предполагает вклад печени в развитие эндотоксемии, вызывающей отсроченное повреждение мозговых тканей, что сопровождается увеличением уровня МДА в крови в постнатальном периоде.

7. В МС фракции печени нанодозы жирорастворимых антиоксидантов способствуют достоверной нормализации ФЛ состава на 12 сутки постгипоксического периода, с преимущественным эффектом альфа-токоферола на ферментативное звено АОС в ранние сроки, а фенозана – на фосфолипиды МС мембран печени.

8. Выраженность окислительного стресса и генерации активных форм кислорода у женщин с анемией и фетоплацентарной недостаточностью перед родами и в пуповинной крови имеет одинаковую направленность изменений. По состоянию активности СОД и каталазы, уровню МДА в пуповинной крови можно судить о напряженности защитных систем организма при гипоксии/реоксигенации и определить степень риска развития гипоксического поражения новорожденного.

9. Наличие модулирующего эффекта нанодоз антиоксидантов на активность ферментов АОС, фосфолипидный состав мозговых тканей и субклеточных фракций печени в постгипоксическом периоде является биохимическим обоснованием для нового подхода к терапии гипоксических поражений у новорожденных.

Практические рекомендации

1. Шкала субоптимальности перинатальных факторов риска, учитывающая уровень генерации АФК, активности ферментов антиоксидантной системы в пуповинной крови, в крови рожениц в совокупности с параметрами изменения мозгового кровотока у новорожденного рекомендуется для прогнозирования риска церебральной ишемии у новорожденных.

2. Использование антиоксидантов в нанодозах в виду их положительного модулирующего эффекта на ферментативное звено антиоксидантной системы и фосфолипидный состав мозговых тканей и печени может быть рекомендовано с первого дня постгипоксического периода после внутриутробной гипоксии плода.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Монографии и пособия

1. Саатов Т.С., У.К. Ибрагимов, З.Р. Хайбуллина. Биологик системаларда кислороднинг эркин радикалларнинг таъсири ва химоя механизмлари, **монография**// Типография ТашПМИ, 2009.-80с.
2. У.К. Ибрагимов, З.Р. Хайбуллина. Биологические мембраны, **монография**// Типография ТашПМИ, 2009.- 134с.
3. Хайбуллина З.Р. Гипоксия плода: эффективность нанодоз антиоксидантов. **Методические рекомендации** для биохимиков, патофизиологов, практических врачей.-Ташкент,2011 – 15с.
4. Хайбуллина З.Р. Прогностические критерии развития гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных. **Информационное письмо**. Ташкент,2011 – 8с.
5. Ибрагимов У.К., Хайбуллина З.Р. Апоптоз (**учебное пособие** для магистров и клинических ординаторов) // Ташкент, типография ТашПМИ, 2007г.- 81с.
6. Ибрагимов У.К., Хайбуллина З.Р. Апоптоз (узб) (**укув кулланма** магистр ва клиник ординатор учун) // Ташкент, ТашПМИ, М.Ч.Ж. «Маъсулиятли матбаа», 2008 г. -68с.
7. Саатов Т.С., У.К. Ибрагимов, Хайбуллина З.Р., Султанходжаев У.Л., Каримова Ш.Ф., Зиямутдинова З.К., Акбарходжаева Х.Н. Механизмы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты (**учебно-методическое пособие** для магистров и клинических ординаторов) // Ташкент, ТашПМИ, М.Ч.Ж. «Маъсулиятли матбаа», 2006 г.- 54с.
8. Ибрагимов У.К., Хайбуллина З.Р. Жигар биокимеси (**учебно-методическое пособие**) // Ташкент, 2010 -73с.

Оригинальные статьи в журналах

1. Zarina R. Khaybullina. Intrauterine hypoxia of fetus – influence of ultra-low doses of antioxidant (experimental research) // Medical and Health Science Journal, MHSJ, Vol.8, 2011, pp.41-49.
2. Zarina R. Khaybullina, Utkur K. Ibragimov, Guzal T. Khodjaeva, Nargiza T. Sidikova. The comparative analysis of the adaptation ability of an organism to intra-uterine hypoxia and cerebral ischemia in newborn according to investigation of the level of ROS generation and activity of ROS- scavenger enzymes // Medical and Health Science Journal, MHSJ, Vol.7, 2011, pp. 61-68.
3. Хайбуллина З.Р. Сравнительный анализ эффективности альфа-токоферола и фенозана в сверхмалых дозах в ткани мозга и крови при экспериментальной гипоксии плода // Здоровье ребенка (Украина).- 2011.-№6.-С. 137-142.
4. Хайбуллина З.Р. Влияние антиоксидантов различных классов при внутриутробной гипоксии плода на уровень окислительного стресса в

- субклеточных фракциях печени // Врач-аспирант (Россия).-2011.-№4.1(47).-С.204-212.
5. Алимов А.В., Ахмедова Д.И., Сигатуллина М.И., Хайбуллина З.Р. Этиопатогенетические и клинические особенности гипоксически-ишемической энцефалопатии у доношенных новорожденных // Вестник врача.-2009.-№3, II часть.-С.75-77.
 6. Хайбуллина З.Р., Ходжаева Г.Т., Ибрагимов У.К. Состояние мозгового кровотока и интенсивности окислительного стресса при гипоксически-ишемической энцефалопатии у глубоко недоношенных новорожденных детей // Вестник врача.-2009.-№3, I часть.- С.141-143.
 7. Алимов А.В., Ахмедова Д.И., Рахматуллаев А.К., Ибрагимов У.К. Хайбуллина З.Р. Чакалокларда ривожланиш хусусиятларининг асоратланган хомиладорликка боғлиқ октбатларини баҳолаш // Педиатрия.-2009.-№3-4.-С.95-97.
 8. Хайбуллина З.Р. Интенсивность окислительного стресса и количественные изменения в составе крови при экспериментальной общей гипобарической гипоксии // Мед журнал Узбекистана.-2009.-№6.-С.89-93.
 9. Хайбуллина З.Р. Течение окислительного стресса у новорожденных крысят, подвергнутых хронической внутриутробной гипоксии // Мед. Журнал Узбекистана, 2010.-№4.-С.91-94.
 10. Хайбуллина З.Р., Ибрагимов У.К., Салихова С.Р., Муфаздалов Ш. А. Реакция клеточных элементов крови на общую гипоксию организма // Патология.-2010.-№1.-С.27-36.
 11. Хайбуллина З.Р. Активность ферментов антиоксидантной системы организма при хронической внутриутробной гипоксии и реоксигенации в эксперименте // Патология, 2010.-№2.-С.35-39.
 12. Хайбуллина З.Р. Влияние внутриутробной гипоксии на фосфолипидный спектр тканей мозга в неонатальном периоде // Педиатрия, 2010.-№3-4.-С.109-113.
 13. Хайбуллина З. Р., У.К. Ибрагимов, В.П. Аскаръянц, Бабаджанова Ф.А., У.А.Хамраев. Современная концепция механизма действия антиоксидантов и некоторые аспекты использования кислорода в живых клетках // Вестник врача, Самарканд.-2010.-№3-4.-С.100-102.
 14. Хайбуллина З.Р. Ибрагимов У.К. Фосфолипидный состав тканей мозга в возрастном аспекте, статья // МЖ РУз.-2010.-№5.-С. 74-78.
 15. Хайбуллина З.Р. Влияние хронической гипоксии плода на созревание митохондриальной фракции печени в постнатальном периоде в эксперименте // Инфекция, иммунитет и фармакология.-2011.-№6.-С. 62-66.

Обзоры

1. Хайбуллина З.Р., Ибрагимов У.К. Известные молекулярные механизмы нейронального повреждения при гипоксии мозга плода // Медицинский журнал Узбекистана.-2009.-№2.-С.64-72.
2. Хайбуллина З.Р., У.К. Ибрагимов. К вопросу о механизме действия токоферолов //Медицинский журнал Узбекистана.- 2005.-№4.- С. 81-86.
3. Хайбуллина З.Р., Т.С. Саатов, У.К. Ибрагимов, Ш.Ф.Каримова, З.К.Зиямутдинова Антиоксидантная система организма // Медицинский журнал Узбекистана.- 2006.-№3.- С.107 – 113.
4. Хайбуллина З.Р., У.К. Ибрагимов, З.К. Зиямутдинова, Ш.Ф. Каримова, Т.С. Саатов, В.П. Аскарьянц, У.А. Хамраев. Витамины–антиоксиданты в педиатрической практике // Вестник врача общей практики.-2008.- №1.-С.100-103.

Статья в сборнике

1. Хайбуллина З.Р. Оценка адаптации новорожденных к гипоксии по уровню образования активных форм кислорода в крови // Мат. Конференции «Медико-организационные аспекты оказания помощи детям», 23 марта 2011 года. С. 86-91.

Тезисы

1. Рашитов О., Хайбуллина З.Р. Фосфолипидный спектр нейроцитов при ишемической гипоксии головного мозга в эксперименте, тезис// Материалы III Международной (XII Всероссийской) Пироговской конференции студентов и молодых ученых. Вестник РГМУ (Москва).- 2008.-№2 (61).-С. 326-327.
2. Хайбуллина З.Р., Ходжаева Г.Т. Интенсивность окислительного стресса при гипоксически-ишемическом поражении мозга у новорожденных, тезис// Материалы IV международной конференции молодых ученых. Винница, 2-3 апреля 2008 г.- С.309.
3. Ахмедова Д.И., Хайбуллина З.Р., Ибрагимов У.К. Развитие оксидантного стресса при экспериментальной ишемии мозга у крыс // Материалы IV съезда неврологов Узбекистана Ж. Неврология.-2008.- №3-4. –С.255.
4. Ибрагимов К.У., Хайбуллина З.Р. Состояние микросомальной и митохондриальной фракций печени при экспериментальной ишемии мозга у крыс // Материалы IV Международной Пироговской конференции студентов и молодых ученых, Москва, 19 марта 2009г. Вестник РГМУ (Москва).-2009.-№3 (61).-С.243.
5. Хайбуллина З.Р.,У.К. Ибрагимов, Г.З. Талимбекова, А. Абдураззаков, Б. Салимов, Д. Киряков. Влияние гипоксии на состав периферической крови в эксперименте, тезис // Мат. VI Съезда педиатров, Ташкент, 5-6 ноября 2009г.-С. 462.
6. Ибрагимов У.К., Хайбуллина З.Р. Фосфолипидный спектр тканей мозга в условиях окислительного стресса при внутриутробной гипоксии,

- стендовый доклад, тезис// УШ Международная конференция «Биоантиоксидант», Москва, 4-6 окт.2010г. С. 174-176.
7. Хайбуллина З.Р. Ибрагимов У.К. Изменения активности ферментов антирадикальной и антиоксидантной защиты в ткани мозга при внутриутробной гипоксии, стендовый доклад, тезис// УШ Международная конференция «Биоантиоксидант», Москва, 4-6 окт.2010г. С. 484-486.
8. Хайбуллина З.Р., Ибрагимов У.К., Ходжаева Г.Т., Сигатуллина М.И. Состояние антирадикальной и антипероксидной защиты при экспериментальной хронической внутриутробной гипоксии, тезис // Сборник трудов НПК с Междунар. участием, посвященной 25-летию Ин-та иммунологии АН РУз «Клиническая иммунология, иммуногенетика – междисциплинарные проблемы». Ташкент.-11-12 октября, 2010.-С.119.
9. Алимов А.В., Хайбуллина З.Р., Ибрагимов У.К., Ходжаева Г.Т., Сидикова Н.Т. Прогностическая значимость биохимических показателей пуповинной крови в оценке течения гипоксически - ишемической энцефалопатии // Республиканская научно-практическая конференция «Основные направления в формировании гармонично развитого поколения в Республике Узбекистан», Ташкент, 11 ноября 2010г., Сборник тезисов.- С. 47.
- 10.Ахмедова Д.И., Ибрагимов У.К., Хайбуллина З.Р., Сигатуллина М.И. Использование модифицированной шкалы субоптимальности в прогнозировании ГИЭ у детей // Республиканская научно-практическая конференция «Основные направления в формировании гармонично развитого поколения в Республике Узбекистан», Ташкент, 11 ноября 2010г., Сборник тезисов .- С. 50.
- 11.Хайбуллина З.Р., Ибрагимов У.К., Ходжаева Г.Т., Сигатуллина М.И. Прогнозирование нарушений нервно-психического развития детей с гипоксически - ишемической энцефалопатией// Республиканская научно-практическая конференция «Основные направления в формировании гармонично развитого поколения в Республике Узбекистан», Ташкент, 11 ноября 2010г., Сборник тезисов.- С. 122.

Тиббиёт фанлари доктори илмий даражасига талабгор Хайбуллина Зарина
Руслановнанинг 03.00.04 – биокимё ихтисослиги бўйича
**«Биомембраналарнинг гипоксия шароитида фаол шаклдаги кислород
таъсири остида зарарланишининг молекуляр механизмлари»**
мавзусидаги диссертациясининг

РЕЗЮМЕСИ

Таянч сўзлар: она қорнидаги гипоксия, церебрал ишемия, фенозан, альфа-токоферол, нанодозалар, кислороднинг фаол шакллари, супероксиддисмутаза, фосфолипидлар, мия, жигар митохондрилари фракцияси, жигарнинг микросомал фракцияси, апоптоз.

Тадқиқот объектлари: зотсиз оқ каламушлар: она қорнида сурункали гипоксияни кечирган янги туғилган каламушчалар; турли даражадаги церебрал ишемияли янги туғилган гўдаклар ва уларнинг оналари.

Тадқиқотнинг мақсади: ҳомила гипоксиясидан сўнг постнатал онтогенезда мия ва жигар биомембраналарининг эркин-радикал оксидланиш жадаллигига ва липид таркибига турли синфга мансуб антиоксидантларнинг ўта кам дозалари таъсирини ҳамда кислород фаол шакллари таъсири остида биомембраналар шикастланишининг молекуляр механизмларини ўрганиш.

Тадқиқот усуллари: юпқа қаватли хроматография, биокимёвий, иммунгистокимёвий, клиник, статистик усуллар, бош мия УТТ ва доплерографияси.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: постгипоксия даврининг олис муддатларида мия ва жигарнинг аъзолараро ўзаро боғлиқлиги ҳамда унинг церебрал ишемия оқибатларини чуқурлаштиришдаги ҳиссаси аниқланган. Постгипоксия даврида жигар митохондрилари фракциясидаги фосфолипидлар микдори бузилишлари ҳамда КФШ ортиқча генерациясининг қўшадиган ҳиссаси ва фенозан нанодозаларининг антиапоптоз таъсири аниқланган; постгипоксия даврининг эрта муддатларида жигар микросомалари фракцияси мембранавий компонентининг постгипоксик адаптация реакцияларидаги иштироки ва альфа-токоферол нанодозаларининг антиоксидант система (АОС) ферментларига модуловчи таъсири аниқланган. Синтетик сувда эрувчи антиоксидант фенозан нанодозаларининг мия тўқималарида АОС ферментатив бўғинига имтиёзли таъсир этиши орқали фосфолипидлар оксидланишини пасайтириши ҳамда миянинг тараққий этиши учун шарт-шароитларни мутаносиблаштириши аниқланган.

Амалий аҳамияти: чакалоқларда церебрал ишемия оғирлигини башоратлаш шкаласи ишлаб чиқилган, тажрибадаги ҳомила гипоксиясида антиоксидантлар нанодозаларини қўллаш асослаб берилган.

Жорий қилиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: олинган натижалар Акушерлик ва гинекология РИТИАМ, ТошВМОИ неонатология кафедраси, ТошПТИ биокимё, каферасида услубий тавсияномалар ва ахборот хати шаклида жорий қилинган. **Қўлланилиш соҳаси:** биокимё, педиатрия.

РЕЗЮМЕ

диссертации Хайбуллиной Зарины Руслановны на тему: **«Молекулярные механизмы повреждения биомембран под действием активных форм кислорода при гипоксии»** на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.00.04 - биохимия

Ключевые слова: внутриутробная гипоксия, церебральная ишемия, фенозан, альфа-токоферол, нанодозы, активные формы кислорода, супероксиддисмутаза, фосфолипиды, мозг, митохондриальная фракция печени, микросомальная фракция печени, апоптоз

Объект исследования: Белые беспородные крысы: новорожденные крысята, перенесшие хроническую внутриутробную гипоксию; новорожденные дети с церебральной ишемией различной степени и их матери.

Цель работы: изучение молекулярных механизмов повреждения биомембран под действием активных форм кислорода и действия сверхмалых доз антиоксидантов различных классов на интенсивность свободно-радикального окисления и липидный состав биомембран мозга и печени в постнатальном онтогенезе после гипоксии плода.

Методы исследования: тонкослойная хроматография, биохимические, иммуногистохимические, клинические, УЗИ и доплерография головного мозга, статистические.

Полученные результаты и их новизна: в отдаленные сроки постгипоксического периода установлена межорганная взаимосвязь мозга и печени и ее вклад в усугубление последствий церебральной ишемии. Установлен вклад избыточной генерации АФК и нарушений содержания фосфолипидов в митохондриальной фракции печени в развитие апоптоза гепатоцитов в постгипоксическом периоде и антиапоптозное действие нанодоз фенозана; установлено участие мембранного компонента микросомальной фракции печени в постгипоксических адаптационных реакциях и модулирующий эффект нанодоз альфа-токоферола на ферменты антиоксидантной системы (АОС) в ранние сроки постгипоксического периода. Установлен преимущественный эффект нанодоз синтетического водорастворимого антиоксиданта фенозана в мозговых тканях на ферментативное звено АОС с последующим снижением окисления фосфолипидов и оптимизации условий для развития мозга.

Практическая значимость: разработана прогностическая шкала тяжести церебральной ишемии новорожденных, обосновано применение нанодоз антиоксидантов при экспериментальной гипоксии плода.

Степень внедрения и экономическая эффективность: полученные результаты внедрены в виде методических рекомендаций и информационного письма в РСМНПЦ Акушерства и гинекологии, кафедре неонатологии ТашИУВ, кафедре биохимии ТашПМИ.

Область применения: биохимия, педиатрия.

RESUME

Thesis of Khaybullina Zarina Ruslanovna on the scientific competition of the doctor of science in medicine on specialty 03.00.04 – biochemistry subject:
«Molecular mechanisms of biomembranes destruction under the action of reactive oxygen species at hypoxia»

Key words: intra-uterine hypoxia, a cerebral ischemia, phenazan, alpha - tocopherol, ultra low doses, reactive oxygen species, superoxide dismutase, phospholipids, brain, mitochondrial fraction of liver, microsomal fraction of liver, apoptosis.

Subjects of research: White not purebred rats: offspring, transferred chronic intra-uterine hypoxia; newborn children with a cerebral ischemia of a various degree and their mothers.

Purpose of work: studying molecular mechanisms of biomembranes destruction under the action of reactive oxygen species (ROS) at hypoxia and effects of water – and fat-soluble antioxidants in ultra low doses on ROS generation in the brain tissues, mitochondrial and microsomal fractions of liver at postnatal period after intrauterine hypoxia.

Methods of research: thin layer chromatography, biochemical, immuno-histochemical, clinical, ultrasound and cerebral blood flow evaluation, statistical.

The results obtained and their novelty: it is established the interrelation of a brain and liver, its contribution to aggravation of consequences of a cerebral ischemia at last terms after intrauterine hypoxia. It is established positive effect of phenazan in ultra low doses on the ROS overproduction and phospholipids composition misbalance in the mitochondrial fraction of the liver and on the liver cells apoptosis too at last terms after intrauterine hypoxia. It is shown modulate effect of tocopherol on the ROS scavenger enzymes activity at early period after intrauterine hypoxia in liver microsomal fraction. It is established strong positive effect of synthetic water-soluble antioxidant phenazan on the ROS scavenger enzymes activity in the brain tissue, which cause the phospholipids composition normalization and provide optimal conditions to the brain development.

Practical value: The modified scale of a sub-optimality of the prenatal risk factors of cerebral ischemia in newborn was created, application of ultra low doses of antioxidants is proved at experimental search.

Degree of embed and economic affectivity: the received results are introduced as methodical recommendations and information letter in The Republican Specialized Scientific - Practical Medical Centre of Obstetrics and Gynecology, department of neonatology of the Tashkent Post graduated Medical Institute, department of biochemistry of Tashkent Pediatrician Medical Institute.

Field of application: biochemistry, pediatrics.

Автор выражает сердечную признательность за консультативную помощь заведующему лабораторией биохимии липидов Института Биохимии АН РУз академику СААТОВУ ТАЪЛАТУ СААТОВИЧУ.