

## СОСТОЯНИЕ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС И КРЫСЯТ, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ВНУТРИУТРОБНОЙ ГИПОКСИИ

Иванова А.С.

*ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, e-mail: adm@isma.ivanovo.ru*

Цель работы – определить концентрацию кальция в сыворотке крови у беременных крыс, плодов, крысят при экспериментальном нарушении маточно-плацентарного кровообращения (НМПК), а также на фоне введения донатора оксида азота и антиоксиданта альфа-токоферола. Животные были разделены на 6 групп: 1) небеременные крысы-самки; 2) животные с нормальной беременностью; беременные крысы с экспериментальным нарушением маточно-плацентарного кровообращения; 4) животные с НМПК, получавшие донатор оксида азота; 5) животные с НМПК, которым вводили альфа-токоферол с момента операции до окончания гестации; 6) ложнопериованные беременные крысы-самки (группа сравнения). У небеременных животных, на 20-й день беременности, у плодов на 22-й день, в постнатальном онтогенезе (на 2-й, 15-й и 30-й дни жизни) оценивали содержание кальция в крови. Было выявлено, что внутриутробная гипоксия существенно нарушает кальциевый гомеостаз как матери, так и плода, что приводит к изменению его регуляции в постнатальном онтогенезе и повышает риск развития остеопороза. Использование донатора оксида азота или введение альфа-токоферола на фоне экспериментальной патологии беременности предотвращают изменение концентрации кальция в крови как в материнском организме, так и у крысят в постнатальном периоде развития.

Ключевые слова: кальций, беременность, нарушение маточно-плацентарного кровообращения, гипоксия плода, оксид азота, альфа-токоферол.

## CALCIUM HOMEOSTASIS IN PREGNANT RATS AND RATS THAT HAD DEVELOPED UNDER CONDITIONS OF FETAL HYPOXIA

Ivanova A.S.

*FSBEI HE «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo, e-mail: adm@isma.ivanovo.ru*

The aim of this work is to determine the concentration of calcium in blood serum in pregnant rats, fetuses, pups in the experimental violation of the utero-placental circulation (VUPC) and on the background of administration of donor of nitric oxide and the antioxidant alpha-tocopherol. The animals were divided into 6 groups: 1) non-pregnant female rats; 2) animals with normal pregnancy; pregnant rats with experimental disorders of utero-placental blood circulation; 4) animals with VUPC receiving nitric oxide donator; 5) animals with VUPC administered alpha-tocopherol from the moment of surgery until the end of gestation; 6) falsely operated pregnant female rats (comparison group). In non-pregnant animals, on the 20th day of pregnancy, in fetuses on the 22nd day, in postnatal ontogenesis – on the 2nd, 15th and 30th days of life, the calcium content in the blood was estimated. It was found that intrauterine hypoxia significantly violates calcium homeostasis, both mother and fetus, which leads to a change in its regulation in postnatal ontogenesis and increases the risk of osteoporosis. The use of a nitric oxide donator or the introduction of alpha-tocopherol against the background of experimental pathology of pregnancy prevents changes in the concentration of calcium in the blood, both in the mother's body and in the postnatal period of development.

Keywords: calcium, pregnancy, insufficiency of uteroplacental blood circulation, fetus hypoxia, nitric oxide, alpha-tocopherol.

Кальций является распространенным макроэлементом в организме млекопитающих. Он входит в состав костной ткани, необходим для мышечного сокращения, процесса свертывания крови, передачи гормонального сигнала и множества других функций. Уровень  $Ca^{2+}$  в клетке регулирует активацию факторов транскрипции, синтез и восстановление ДНК, регуляцию клеточного цикла, апоптоз, поэтому определение его концентрации имеет важное значение для оценки состояния организма.

Во время беременности потребности в кальции резко возрастают, что абсолютно необходимо для роста и формирования нервной системы, костной ткани, зубов, мышц и сердца плода. Этот макроэлемент поступает к плоду через плаценту, процесс переноса осуществляется согласованной работой транспортных механизмов, связывающих белков, гормонов. Недостаточное поступление кальция во время беременности негативно влияет на состояние здоровья как матери, так и плода. Дефицит кальция способствует патологическому течению беременности и родов, неблагоприятно влияет на формирование плаценты. У беременных женщин гипокальциемия может приводить к развитию тетании, у родильниц в послеродовом периоде возможно развитие остеопении. Дефицит кальция у плода может осложниться внутриутробным рахитом. Однако эти данные касаются алиментарного дефицита кальция во время беременности.

Более сложная ситуация возникает при развитии патологии плаценты и внутриутробной гипоксии, когда на фоне адекватного потребления этого катиона матерью возникают проблемы с его доставкой плоду. Известно, что при внутриутробной гипоксии ряд молекул, участвующих в поддержании гомеостаза кальция, изменяют свою активность, происходит избыточное поступление кальция в клетку через активацию рецепторов и каналов [1], что отрицательно сказывается на сосудистом тоне, провоцирует ишемию. В литературе имеются противоречивые данные о влиянии данной патологии беременности на уровень кальция в крови [2].

Экспериментальной моделью, позволяющей получить внутриутробную гипоксию плода, является нарушение маточно-плацентарного кровообращения (НМПК). В условиях внутриутробной гипоксии для улучшения кровообращения необходимо повышение концентрации сосудорасширяющих веществ. В наших предыдущих работах было выявлено, что НМПК изменяет морфологию сосудов плаценты, приводит к нарушению выработки оксида азота – важнейшего вазодилататора в организме беременных животных, т.е. провоцирует развитие эндотелиальной дисфункции [3, 4]. Ишемия плаценты активирует саногенетические механизмы, направленные на улучшение кровообращения. Этот орган начинает выделять сосудосуживающие вещества, что приводит к еще большему возрастанию эндотелиальной дисфункции и прогрессированию ишемии, т.е. формируется классический порочный круг. Также в этих условиях нами отмечались усиление свободнорадикальных процессов и развитие окислительного стресса. Активация перекисного окисления липидов истощает запасы эндогенных антиоксидантов, первым расходуется альфа-токоферол. Поэтому, с нашей точки зрения, целесообразно провести коррекцию возможных нарушений обмена кальция донатором оксида азота и антиоксидантом альфа-токоферолом.

Цель исследования – определить содержание кальция в крови у беременных крыс и плодов при нарушении маточно-плацентарного кровообращения, а также в постнатальном периоде развития после проведения экспериментальной терапии донатором оксида азота и альфа-токоферолом.

### **Материал и методы исследования**

Исследование было одобрено на заседании локального этического комитета ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ РФ и проводилось с учетом правил лабораторной практики в РФ (ГОСТ Р-53434-2009) и директив Европейской Конвенции (1986 г.) на 60 взрослых белых беспородных крысах-самках. Животные находились на стандартном рационе питания. Определение первого дня беременности осуществляли по появлению сперматозоидов во влагалищных мазках.

Животные были разделены на 6 групп:

1) небеременные крысы-самки (n=10);

2) животные с нормальной беременностью (n=10);

3) беременные крысы с экспериментальным НМПК (n=10). Операцию НМПК проводили по методике, предложенной М.М. Вартановой (1984 г.). При этом осуществлялась перевязка трети преплацентарных сосудов. Операцию проводили на 16-й день беременности, т.е. в тот период, когда у крыс завершается процесс плацентации и внутриутробное кровообращение происходит через плаценту. Перед операцией животных наркотизировали золетилом в дозе 30 мг на 1 кг массы;

4) животные с НМПК, получавшие с момента операции донатор оксида азота. С этой целью оперированным крысам на внутреннюю поверхность ушной раковины наклеивали пластырь, содержащий нитроглицерин – Депонит-10 (Schwarz Pharma, Германия) (n=10). Пластырь меняли ежедневно до окончания периода гестации;

5) животные с НМПК, получавшие с момента операции альфа-токоферол. Использовали раствор альфа-токоферола масляный («Марбиофарм», Россия), который вводили внутримышечно в дозе 150 мг/кг 2 раза в неделю до окончания беременности (n=10);

6) ложнооперированные беременные крысы-самки (группа сравнения) (n=10).

У взрослых животных (небеременных крыс и у беременных на 22-й день беременности) брали кровь из подъязычного сплетения. Забор крови у плодов и крысят осуществляли путем декапитации. Оценку содержания кальция у плодов проводили на 22-й день (последний день беременности), в постнатальном периоде развития – на 2-й, 15-й и 30-й дни жизни. В сыворотке крови определяли концентрацию  $Ca_{125}$  с помощью набора производства Human. Результат выражали в ммоль/л (мМ).

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы Statistica 6,0. Учитывая характер распределения, отличный от нормального, сравнение средних

величин в группах проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . В таблице данные представлены в виде  $M \pm m$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Показатели ложнооперированных животных 6-й группы достоверно не отличаются от аналогичных показателей крыс 2-й группы. У крыс с нормальной беременностью отмечается развитие гипокальциемии по сравнению с небеременными животными (таблица).

Масса тела и концентрация кальция в сыворотке крови у взрослых крыс, плодов и крысят

	Показатели	Группы				
		1	2	3	4	5
Взрослые крысы	Концентрация кальция, мМ	1,98±0,18	1,28±0,16*	1,87±0,28 <sup>#</sup>	1,10±0,20* <sup>#</sup>	1,22±0,12* <sup>#</sup>
Плоды, 22-й день жизни	масса, г		4,94±0,12	4,79±0,20	4,92±0,18	4,60±0,28
	Концентрация кальция, мМ		2,02±0,23	2,87±0,22°	1,82±0,21 <sup>#</sup>	2,10±0,24 <sup>#</sup>
Новорожденные крысята	масса, г		5,75±0,21	6,68±0,30	7,26±0,14	5,59±0,08
	Концентрация кальция, мМ		1,41±0,07	2,10±0,20°	1,21±0,09 <sup>#</sup>	1,25±0,11 <sup>#</sup>
Крысята, 15-й день	Масса, г		20,74±0,66	17,01±1,11°	23,06±1,21 <sup>#</sup>	25,6±0,41 <sup>#</sup>
	Концентрация кальция, мМ		1,53±0,11	1,41±0,11	1,23±0,12	1,25±0,10
Крысята, 30-й день	Масса, г		37,5±1,10	36,8±1,32	49,6±1,25 <sup>#</sup>	47,8±1,46 <sup>#</sup>
	Концентрация кальция, мМ		1,32±0,03	1,73±0,09°	1,12±0,14 <sup>#</sup>	1,15±0,15 <sup>#</sup>

Примечание: \* – достоверное отличие 1-й группы от 2-й группы ( $p < 0,05$ ); ° – достоверное отличие от 2-й группы ( $p < 0,05$ ); <sup>#</sup> – достоверное отличие от 3-й группы ( $p < 0,05$ ).

Наиболее закономерным объяснением этой особенности является поступление кальция через плаценту к плоду. Однако снижение кальция в крови может быть результатом снижения его поступления в организм при беременности за счет изменения процессов моторики, секреции, всасывания в пищеварительной системе, увеличения объема циркулирующей крови и развития физиологической гемодилюции, а также увеличения скорости клубочковой фильтрации в нефронах. Следствием подобных преобразований является изменение объема распределения, интенсивности метаболизма и элиминации иона. При этом уровень  $Ca^{2+}$  у плодов значительно выше, чем в материнском организме. Подобное изменение может быть связано с более высокой паратиреоидной активностью. Кроме того, при беременности

увеличивается образование оксида азота эндотелиальной NO-синтазой, которая является кальций-зависимым ферментом, а кальций-независимый синтез играет меньшую роль, т.е. кальций используется на эти процессы.

У животных с нарушением маточно-плацентарного кровообращения концентрация ионов кальция достоверно увеличивается по сравнению с крысами с нормальной беременностью и почти не отличается от концентрации ионов кальция у небеременных крыс, что, вероятно, связано с ухудшением плацентарного кровотока, нарушением проницаемости микрососудов и энергетического обеспечения переноса  $Ca^{2+}$  к плоду, а также с измененной экспрессией ряда транспортных белков [5]. Кроме того, как уже указывалось выше, при данной патологии беременности нарушается кальций-зависимый синтез оксида азота и  $Ca^{2+}$  не используется для этого процесса. В то же время важную роль играет снижение потребления кальция гипоксичным плодом. Также нарушение минерализации костной ткани можно объяснить активацией в условиях гипоксии работы стресс-реализующей системы. Увеличивается выработка кортиколиберина, адренкортикотропного гормона и кортизола, последний стимулирует процесс резорбции костной ткани, нарушает дифференцировку остеобластов и стимулирует остеокласты. Но градиент кальция между матерью и плодом сохраняется.

Использование «Депонита» или альфа-токоферола на фоне НМПК не вызывает достоверных изменений в материнском организме по сравнению со 2-й группой животных. Эта особенность свидетельствует в пользу положительного влияния экзогенного оксида азота и альфа-токоферола при нарушении маточно-плацентарного кровообращения.

У 22-дневных плодов крыс и новорожденных крысят во всех группах масса тела достоверно не меняется. Отсутствие отличий в массе тела при НМПК можно объяснить активацией защитно-компенсаторных механизмов и развитием гиперперфузии внутренних органов, а также отсутствием изменений в выработке анаболических гормонов – соматотропного, тироксина, инсулиноподобного фактора роста. Экспериментальная терапия донатором оксида азота в аспекте массы тела связана с вазодилатацией и снижением выделения сосудосуживающих веществ, а введение альфа-токоферола не только уменьшает повреждение тканей свободными радикалами, но и улучшает процессы клеточной регуляции.

При этом у плодов, которые развивались в условиях нарушения маточно-плацентарного кровообращения, уровень кальция достоверно повышен по сравнению с плодами интактных крыс, это изменение сохраняется на 2-е сутки постнатального развития. По литературным данным [6], у гипоксичных плодов в структурах центральной нервной системы увеличивается содержание катехоламинов, которые являются стимуляторами образования паратгормона, снижающего минерализацию костной ткани, ингибируя

активность остеобластов. В то же время развитие гиперкатехоламинемии свидетельствует об участии гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы плода в осуществлении адаптивных реакций. Как уже упоминалось выше, глюкокортикоиды также снижают минерализацию костной ткани. Можно предположить, что при патологии беременности уменьшается образование неколлагенового кальцийсвязывающего белка, показателя формирования кости – остеокальцина [7]. В результате нарушаются процессы минерализации костной ткани. Эти изменения в организме плодов и новорожденных крысят становятся особенно актуальными в раннем неонатальном периоде, когда добавляется еще и родовый стресс. Использование «Депонита» или альфа-токоферола на фоне НМПК не вызывает достоверных изменений в организме плодов и новорожденных крысят по сравнению со 2-й группой животных. Получается, что внутриутробное улучшение кровообращения при поступлении донатора оксида азота положительно влияет на внутриутробный обмен кальция. Также внутриутробное снижение свободнорадикальных процессов посредством введения альфа-токоферола оказывает анаболическое действие на скелет, повышая минеральную плотность костей.

На 15-й день постнатального периода развития масса тела крысят, развивавшихся в условиях внутриутробной гипоксии, достоверно снижается. Такую особенность можно объяснить нарушением стимулирующего влияния оксида азота на морфогенез мышечной ткани и внутренних органов. Концентрация  $Ca^{2+}$  в этих условиях снижается и находится на уровне интактных крысят во всех группах. В данный период жизни можно предположить снижение уровня стрессовой реакции и, как следствие, остеорезорбтивного действия глюкокортикоидов, а также и нормализацией поступления кальция с материнским молоком. Использование «Депонита» или альфа-токоферола на фоне НМПК также не вызывает достоверных изменений в организме крысят на 15-й день жизни по сравнению со 2-й группой животных. Таким образом, положительная динамика, которая возникла еще во внутриутробном периоде развития, сохраняется.

К 30-му дню постнатального онтогенеза масса крысят, развивавшихся при внутриутробной гипоксии, возрастает до уровня интактных животных 2-й группы. Подобная положительная динамика может являться обманчивой. В постнатальном периоде развития у крысят, подвергавшихся внутриутробной гипоксии, энергетический обмен замедляется. Также возможно возникновение нарушения толерантности к глюкозе, гипоинсулинемии, гипергликемии, что сопровождается изменением уровня триацилглицеридов, холестерина и лептина. Поэтому увеличение массы тела происходит не за счет нормального морфогенеза органов, а за счет увеличения отложения жира в организме.

В то же время на 30-й день постнатального периода развития концентрация кальция повышается, т.е. к этому возрасту опять происходит декомпенсация регуляции минерального обмена. Вероятно, внутриутробно возникший дисбаланс регуляторных гормонов бесследно не исчезает и проявляется, несмотря на нормализацию поступления кальция в организм. Другой причиной этого нарушения может быть переход крысят на самостоятельное питание и нехватка вследствие этого легко усвояемого кальция материнского молока.

Использование на фоне НМПК «Депонита» или введение альфа-токоферола вызывают увеличение массы тела. Также в этот период наблюдения отмечается изменение кальциевого гомеостаза – уровень кальция ниже контрольных значений. Это, вероятно, связано с тем, что оксид азота и альфа-токоферол положительно влияют на процессы морфогенеза и функционирования органов. Также возможными механизмами могут быть уменьшение степени тяжести предшествующих гипоксии плода и активности стресс-реализующих механизмов, улучшение процесса транспорта кальция через плаценту и минерализация скелета, нормализация гормональной регуляции кальциевого обмена.

### **Выводы**

1. Внутриутробная гипоксия существенно нарушает кальциевый гомеостаз как матери, так и плода, что приводит к изменению его регуляции и возникновению нарушений кальциевого обмена в постнатальном онтогенезе.

2. Использование донатора оксида азота и альфа-токоферола при нарушении маточно-плацентарного кровообращения в постнатальном периоде развития препятствует возникновению нарушений обмена кальция.

### **Список литературы**

1. Hayward Ch.E., McIntyre K.R., Sibley C.P., Greenwood S.L., Dilworth M.R. Mechanisms Underpinning Adaptations in Placental Calcium Transport in Normal Mice and Those With Fetal Growth Restriction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018. № 9. P. 1 – 10.
2. Vayaltrikkovil S., Bashir R., Espinoza M., Irvine L., Scott J.N. Serum calcium derangements in neonates with moderate to severe hypoxic ischemic encephalopathy and the impact of therapeutic hypothermia. *Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2018. № 9. P. 1-6.
3. Иванова А.С., Перетятко Л.П., Демидов В.И., Назаров С.Б. Влияние оксида азота и альфа-токоферола на структурные изменения в плаценте при нарушении маточно-плацентарного кровообращения у белых крыс // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015. Т. 78. № 8. С. 10-13.
4. Назаров С.Б., Иванова А.С., Новиков А.А. Продукция оксида азота у беременных крыс

и особенности постнатального системогенеза у их потомства, развивавшегося при нарушении маточно-плацентарного кровообращения // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013. Т. 57. № 4. С. 59-63.

5. Liu B., Liu Y., Shi R. Feng X., Li X., Zhang W., Wu J., Li N., Zhou X., Sun M. Xu Z. Chronic Prenatal Hypoxia Down-Regulated BK Channel B1 Subunits in Mesenteric Artery Smooth Muscle Cells of the Offspring. Cell. Physiol. Biochem. 2018. Vol. 45. № 4. P. 1603-1616.

6. Мешкова Е.М., Томилова И.К., Абрамова И.В., Кислякова Т.В. Особенности обмена катехоламинов в головном мозге и печени плодов и новорожденных крысят, развивавшихся в условиях нарушения маточно-плацентарного кровообращения // Вестник Ивановской медицинской академии. 2015. Т. 20. № 1. С. 18-22.

7. Риггз Б.Л., Мелтон Л.Д. Остеопороз: Этиология, диагностика, лечение. СПб.: БИНОМ: Нев. диалект, 2000. 558 с.