

Забродина Виктория Владимировна

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ
ПОВРЕЖДЕНИЙ И НАРУШЕНИЙ ПРЕ- И
ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ У ПОТОМСТВА КРЫС В УСЛОВИЯХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИАБЕТА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Научно-исследовательском институте фармакологии имени В.В. Закусова»
(ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор, член-корр. РАН

Дурнев Андрей Дмитриевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор, член-корр. РАН,
заведующий кафедрой
фармакологии и биофармации ФУВ
ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный
медицинский университет» Минздрава России

Тюренков Иван Николаевич

доктор биологических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник
отдела генетической токсикологии
ФБУН «Федеральный научный центр
гигиены им. Ф.Ф.Эрисмана» Роспотребнадзора

Ревазова Юлия Анатольевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины
имени Е.Д. Гольдберга»

Защита состоится « ____ » _____ 2016 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.024.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова») по адресу: 125315 Москва, ул. Балтийская, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ученой части ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова») по адресу: 125315 Москва, ул. Балтийская, д.8 и на сайте www.academpharm.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Вальдман Елена Артуровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Диабет – социально значимое, мультифакторное заболевание с генетической предрасположенностью, характеризующееся широкой распространенностью. По данным Международной федерации диабета (IDF) на 2013 год, в мире 382 миллиона людей страдают сахарным диабетом (СД) (<http://www.idf.org/publications/annual-report>). В РФ по данным Государственного регистра сахарного диабета (ГРСД) на 31.12.2012 г. общее число зарегистрированных по обращаемости больных, включая детей и подростков с СД 1 и 2 типа, составило 3 779 423 человек.

При условии должной диетической и медикаментозной предгравидарной подготовки, диабет не является противопоказанием для беременности, однако число невынашиваний беременности при этом заболевании достигает 29 %. Характерным осложнением является многоводие, которое связано с увеличением концентраций глюкозы в околоплодных водах и наблюдается в 20-30% случаев. Симптомокомплекс «диабетическая фетопатия» новорожденных от матерей с СД1 выявляется у 75%, а при гестационном сахарном диабете (ГСД) – у 25 % обследованных. Частота детей с врожденными пороками составляет 6-8%, что в 2-3 раза выше по сравнению с женщинами без диабета, около 2% новорожденных имеют тяжёлые пороки, несовместимые с жизнью (Неонатология: национальное руководство. Под ред. Н.Н. Володина. Из-во: ГЭОТАР-Медиа. 2009. 848 с.). Имеются отдельные указания на негативное влияние диабета беременных на постнатальное развитие потомства (SimeoniU., BarkerDJ. *Seminarsinfetalandneonatalmedicine*. 2009. 14(2). P. 119-124; Metzger B.E. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2007. 50(4). P. 972-979; Hani J., Shojae F., Vafae-Nezhad S., et al. *Worldjournalofdiabetes*. 2015. 6(3). P. 412-422).

Беременность часто сопровождается развитием гестационного диабета, считалось, что он возникает в 1-3% случаев. Сегодня его частота оценивается не менее чем в 20 %, а к 2030 году прогнозируется рост этой патологии до 4 % (Болотская Л.Л., Есаян Р.М., Олейник О.В. Сахарный диабет. 2011. № 2. С. 131-132). Очевидно, что спорадический характер возникновения ГСД ограничивает возможность его профилактики и сопряженных нарушений развития ребенка с помощью традиционных приемов-предгравидарной подготовки, что требует разработки новых подходов.

Степень разработанности проблемы. Диабет – заболевание, ведущую роль в патогенезе которого играют нарушения свободно-радикального окисления (Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Лечение сахарного диабета и его сосудистых

осложнений. Руководство для врачей. М: Медицина. 2005. 512 с.). Окислительный стресс неизбежно сопровождается повреждениями ДНК соматических клеток. (Середенин С.Б., Дурнев А.Д. Фармакологическая защита генома. М.: ВИНТИ. 1992. 161 с.). Известны наблюдения, показывающие увеличение поврежденности ДНК в клетках пациентов, страдающих диабетом, а также отмечены корреляционные связи между гипергликемией и уровнями повреждений ДНК (Song F., Jia W., Yao Y., et al. *Clinical Science*. 2007. 112. P. 599–606; Arifa M., Islama M.R., Waisea T.M.Z., et al. *Diabetes and Metabolism*. 2010. 36. P. 51–57).

У больных СД1 и СД2 выявляется дефицит когнитивных функций, таких как память и внимание (Sims-Robinson C., Kim B., Feldman E.L. *Diabetes and cognitive dysfunction*. In: *Neurobiology of Brain Disorders: Biological Basis of Neurological and Psychiatric Disorders*. Zigmond M.J., Rowland L.P., Coyle J.T. Elsevier Inc. 2015. P. 189-201), а в экспериментах на мышах показана сопряженность повреждений ДНК в клетках головного мозга и нарушений поведения (Kaefer V., Semedo J.G., Silva Kahl V.F., et al. *Journal of applied toxicology*. 2010. 30(8). P. 745-753).

Наконец, в нашем коллективе усилиями О.В. Шредер (2009), А.С. Соломиной (2011) и Е.Д. Шредер (2014), установлена взаимосвязь между повреждениями ДНК в эмбриональных и плацентарных клетках и нарушениями пре- и постнатального развития потомства крыс, выражающихся, в том числе, в поведенческих нарушениях. Те же авторы, на моделях табакокурения, циклофосамидного тератогенеза и алкогольной интоксикации, показали возможность фармакологической коррекции постнатальных поведенческих нарушений, связанных с эффектами повреждения ДНК в эмбриональных клетках, с помощью афобазола, который, помимо основной анксиолитической активности, обладает антимуtagenными и цитопротекторными свойствами (Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Середенин С.Б. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009. Т. 72. 1. С. 46-51).

Вышеперечисленные факты позволили предположить, что антимутагены могут явиться фармакологическими корректорами различного рода нарушений пре- и постнатального развития в условиях экспериментального сахарного диабета.

При выборе антимуtagenных препаратов, помимо афобазола, внимание привлек растительный метаболит, криопротектор растительных клеток бетаин, который в сходном с афобазолом диапазоне доз, продемонстрировал выраженную антимуtagenную активность *in vivo* (Кобелев К.В., Орещенко А.В., Дурнев А.Д., Жанатаев А.К.

Способ антимуtagenного воздействия на организм. Патент на изобретение РФ 2261704).

В качестве потенциально пригодной базовой экспериментальной модели была избрана индукция диабета у крыс с помощью стрептозотоцина, которая опытным путем была адаптирована для оценки корригирующего влияния фармакологических препаратов на пре- и постнатальное развитие потомства в условиях гипергликемии во время беременности.

Таким образом, известны экспериментальные исследования, доказывающие возможность фармакологической коррекции афобазолом пре- и постнатальных нарушений в потомстве крыс, подвергнутых действию различных повреждающих факторов. Однако отсутствуют какие-либо экспериментальные свидетельства о возможности фармакологической коррекции генотоксических эффектов и связанных нарушений пре- и постнатального развития потомства у животных с индуцированным сахарным диабетом. Подобного рода исследования являются необходимым этапом доклинических исследований при разработке фармакологических средств защиты здоровья детей у матерей, страдающих СД.

Цель исследования. Оценка влияния афобазола и бетаина на генотоксические повреждения в плацентарных и эмбриональных клетках и нарушения пре- и постнатального развития у потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом.

Основные задачи исследования. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать условия экспериментального стрептозотоцинового диабета у беременных крыс, позволяющие регистрировать анализируемые пре- и постнатальные нарушения на уровнях, достаточных для оценки влияния на них фармакологических корректоров.
2. Оценить влияние афобазола в дозах 1, 10 и 50 мг/кг и бетаина в дозах 10, 50 и 100 мг/кг на уровень глюкозы в крови и моче крыс с экспериментальным диабетом и у их потомства.
3. Охарактеризовать поврежденность ДНК в плацентарной и эмбриональной тканях эмбрионов, развивающихся у крыс с экспериментальным диабетом, и оценить влияние афобазола в дозах 1, 10 и 50 мг/кг и бетаина в дозах 10, 50 и 100 мг/кг на генотоксические эффекты с помощью щелочной версии метода «ДНК-комет».
4. С использованием комплекса классических методов оценки репродуктивной токсичности и поведенческих тестов оценить пре- и постнатальные отклонения упо-

томства крыс с экспериментальным диабетом, получавших в период беременности перорально, ежедневно афобазол в дозах 1, 10 и 50 мг/кг или бетаин в дозах 10, 50 и 100 мг/кг.

5. Оценить корреляцию между содержанием глюкозы в крови и моче с генотоксическими эффектами в плацентарной и эмбриональной тканях крыс с экспериментальным диабетом при разных сроках наблюдения, корреляцию между поврежденностью ДНК в плацентарной и эмбриональной тканях с нарушениями развития и когнитивными нарушениями у потомства крыс с экспериментальным диабетом, получавших афобазол или бетаин.

Научная новизна. Предложена модификация экспериментальной модели стрептозотоцинового диабета, пригодная для оценки генотоксических эффектов в плацентарных и эмбриональных клетках, пре- и постнатальных нарушений развития потомства и их коррекции фармакологическими веществами.

Впервые установлено значимое увеличение поврежденности ДНК в плацентарных и эмбриональных тканях крыс, с индуцированным стрептозотоциновым диабетом. Показано, что потомство этих животных характеризуется набором признаков, сходных с таковыми при симптомокомплексе «диабетическая фетопатия»; пастозность, гиперемия кожных покровов, нарушения становления рефлексов и когнитивных функций у потомства.

Впервые, продемонстрирована возможность фармакологической коррекции генотоксических эффектов в эмбриональных и плацентарных клетках крыс с экспериментальным диабетом с помощью афобазола и бетаина, показано снижение морфологических и/или когнитивных нарушений потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом, внутриутробное развитие которых протекало на фоне введения афобазола или бетаина. Антигенотоксические свойства бетаина в плацентарных и эмбриональных тканях установлены впервые.

Выявлены достоверные корреляции между уровнями глюкозы и повреждением ДНК в плацентарных и эмбриональных тканях крыс, поврежденностью ДНК в этих тканях и когнитивными нарушениями у потомства.

Впервые установлено, что афобазол в отдельных дозах снижает содержание глюкозы в крови беременных крыс с экспериментальным диабетом, а бетаин в разных дозах оказывает разнонаправленное действие на этот показатель и увеличивает выведение глюкозы с мочой.

Теоретическая и практическая значимость. Совокупность полученных результатов свидетельствует в пользу ранее сформулированной гипотезы о самостоятельной значимости повреждений ДНК в формировании пре- и постнатальных нарушений у потомства при действии различных повреждающих факторов (Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Середенина В.С. Молекулярная медицина. 2013. 3. С. 3-19) и подтверждают предположение о том, что антимуагены могут явиться фармакологическими корректорами ряда нарушений пре- и постнатального развития в условиях гипергликемии. Это создает необходимую основу для разработки способов антимуагенной профилактики осложнений беременности у больных диабетом.

Выявление способности афобазола или бетаина в отдельных дозах нормализовать гликемический статус 90-дневных крысят-самцов (афобазол) или крысят-самок (бетаин) открывает принципиальные возможности поиска фармакологических способов снижения риска развития диабета у потомства матерей, страдающих этим заболеванием.

Методология и методы исследования. Применена классическая методология поиска фармакологических средств коррекции патологических состояний с использованием экспериментальных моделей на животных. Используются современные верифицированные методы учета генотоксических поражений, эмбриотоксических эффектов и нарушений постнатального развития потомства, включая общепринятые поведенческие методики. Исследование соответствует пунктам 1 и 4 паспорта специальности «фармакология, клиническая фармакология», шифр 14.03.06.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У животных с диабетом, индуцированным однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина в дозе 40 мг/кг в первый день беременности, наблюдаются гипергликемия, увеличение поврежденности ДНК в плацентарных и эмбриональных клетках, в потомстве этих животных выявляются нарушения пре- и постнатального развития.
2. Между гипергликемией и повреждениями ДНК в эмбриональных и плацентарных клетках, повреждениями ДНК в указанных клетках и нарушениями когнитивных функций в потомстве крыс со стрептозотоциновым диабетом существуют значимые корреляции.
3. Афобазол в дозах 1, 10 и 50 мг/кг или бетаин в дозах 10, 50 и 100 мг/кг ежедневно, перорально вводимые беременным крысам со стрептозотоциновым диабе-

том, значимо снижают поврежденность ДНК в плацентарных и эмбриональных клетках.

4. Замедление становления безусловных рефлексов, морфологические, поведенческие и когнитивные нарушения значимо снижаются или отсутствуют в потомстве крыс со стрептозотоциновым диабетом, перорально получавших в период беременности афобазол в дозах 10 и 50 мг/кг или бетаин в дозах 50 и 100 мг/кг.

5. Афобазол или бетаин в отдельных дозах снижают гипергликемию у беременных крыс со стрептозотоциновым диабетом, бетаин увеличивает выведение глюкозы с мочой. У крысят-самцов крыс со стрептозотоциновым диабетом, пренатально получавших афобазол 10 мг/кг, и у крысят-самок, пренатально получавших бетаин 100 мг/кг, нормализуется содержание глюкозы в крови на 90 день развития.

Степень достоверности. Исследование выполнено на достаточном экспериментальном материале с использованием адекватных методов оценки и статистической обработки полученных данных.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в получении исходных данных, их систематизации и апробации результатов исследования. Автором лично выполнена экспериментальная и аналитическая часть диссертации, сформулированы положения и выводы, подготовлены публикации по результатам диссертационного исследования.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены на IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 18–21 сентября 2012 года), «Science-based assessment of laboratory animal welfare» RUS-LASA-ICLAS (Санкт-Петербург, 2014), «12th World Congress of Biological Psychiatry» (Афины, 14 – 18 июня 2015 года), Всероссийской конференции молодых ученых с Международным участием, посвященной 150-летию со дня рождения академика Н.П. Кравкова (Рязань, 22 –23 октября 2015 года), 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Клязьма, 9 – 13 ноября 2015 года), а также представлены на расширенном заседании конференции лаборатории лекарственной токсикологии 3 декабря 2015 года.

Публикации. Результаты исследования опубликованы в 3 статьях в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 главе в книге, изданной за рубежом, 5 тезисах докладов в материалах российских и международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 132 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов экспериментов, их обсуждения, выводов, списка сокращений и литературы. Иллюстрирована 36 таблицами, 18 рисунками и 2 схемами. Библиографический указатель включает 63 отечественных и 121 иностранный источник.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на беспородных белых крысах питомника «Столбовая» РАМН массой 200-250 г. Животных содержали на брикетированном корме (ООО «Мэст», Россия), воде *ad libitum*, при естественном освещении. Содержание животных в виварии соответствовало Приказу МЗ РФ 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Общее количество животных, использованных в экспериментах, составило: взрослых 240 самок и 50 самцов, инфантов 100 самок и 100 самцов, 2109 эмбрионов. Для достижения беременности самок и самцов саживали по схеме 2:1, день обнаружения сперматозоидов в вагинальных мазках принимали за 1-й день беременности.

Экспериментальную модель сахарного диабета создавали однократным внутрибрюшинным (в/б) введением стрептозотцина (*Streptozocin*, Sigma) в цитратном буфере (*Citrate buffer solution*, 0.09M, Sigma) в 1 день беременности крыс в дозе 40 мг/кг, объем введения составлял 0,5 мл / 200 г массы тела.

В качестве фармакологических корректоров применяли афобазол и бетаин.

Афобазол (2-[2-(морфолино)этилтио]-5-этоксibenзимидазола дигидрохлорид) – оригинальный селективный анксиолитик с антигенотоксическими свойствами, разработанный в ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова» (Рег. ЛС-000861 от 03.11.2005, МНН Фабомотизол). Субстанцию афобазола растворяли в дистиллированной воде для получения раствора нужной концентрации. Афобазол вводили перорально в дозах 1, 10 и 50 мг/кг, объем введения составлял 0,5мл/200г массы тела.

Бетаин - триметильное производное глицина - триметилглицин, или триметиламиноуксусная кислота (внутренняя соль). Субстанцию бетаина (*Betainemonohydrate*, Sigma) растворяли в дистиллированной воде для получения раствора нужной концентрации. Бетаин вводили перорально в дозах 10, 50 и 100 мг/кг, объем введения составлял 0,5мл/200г массы тела.

Беременных крыс делили на 8 групп. Крысам первой (контрольной) группы в 1 день беременности в/б, однократно вводила физиологический раствор и с 1 по 19 день – дистиллированную воду, *peros*. Крысам второй группы (модельная, экспериментальный диабет) в 1 день беременности однократно в/б вводили стрептозотоцин 40 мг/кг и с 1 по 19 день – дистиллированную воду, *peros*. Крысам третьей, четвертой и пятой опытных групп в 1 день беременности в/б, однократно вводили стрептозотоцин 40 мг/кг и с 1 по 19 день – афобазол, *peros*, в одной из трех доз: 1, 10 и 50 мг/кг. Крысам шестой, седьмой и восьмой опытных групп в 1 день беременности в/б, однократно вводили стрептозотоцин 40 мг/кг и с 1 по 19 день – бетаин, *peros*, в одной из трех доз: 10, 50 и 100 мг/кг. В каждой группе было не менее 7 экспериментальных животных.

Анализ уровня глюкозы в крови и моче крыс проводили на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе ChemWell 2910 Combi.

Принципы и методы эмбриотоксических исследований соответствовали требованиям методических рекомендаций (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.). Самок выводили из эксперимента на 20 день беременности декапитацией. Регистрировали число желтых тел, мест имплантации, живых и мертвых плодов, наличие аномалий развития, массу и кранио-каудальный размер. Анализ аномалий развития внутренних органов и скелета плодов осуществляли методами Вильсона и Доусона в модификации Дыбана (Дыбан А.П. Вестник АМН СССР. 1967. 1. С. 18-30. Дыбан А.П. Очерки патологической эмбриологии человека. М: Государственное издательство медицинской литературы. 1959. 228 с.). Для дифференцированного окрашивания скелета (кости и хрящи) использовали метод двойного окрашивания Петерса (Peters, P. W. J. 1977. Double staining of fetal skeletons for cartilage and bone. In *Methods in Prenatal Toxicology*. D. Neubert, H.J. Merker, T. E. Kwasigroch, editors. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. P. 153-154). Для анализа ДНК-повреждений в клетках плацент и эмбрионов, животных выводили из эксперимента на 14 и 20 дни беременности. В группах, в которых предусматривалось введение афобазола или бетаина, последняя обработка корректором происходила за 24 часа.

Анализ ДНК в тканях плацент и эмбрионов проводили методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод «ДНК-комет») в соответствии с рекомендациями (Жанатаев А.К., Никитина В.А., Воронина Е.С., Дурнев А.Д. Методиче-

ские аспекты оценки ДНК-повреждений методом ДНК-комет. Прикладная токсикология. 2011. 2(4). С. 28-37).

Регистрировали показатели генотоксичности «% ДНК в хвосте» и «апоптотические кометы». Общая схема метода включала приготовление геле-слайдов, получение микропрепаратов, лизис, щелочную денатурацию, электрофорез, нейтрализацию/фиксацию, окрашивание и микроскопический анализ. С каждого микропрепарата анализировали не менее 100 клеток.

Формирование сенсорно-двигательных рефлексов проводили на 5 день развития крысят в тестах «переворачивание на плоскости» и «избегание края», мышечную силу оценивали в тесте «горизонтальная веревочка» (НПК «Открытая Наука», Россия).

Оценку ориентационно-исследовательской деятельности потомства проводили в тесте «Открытое поле» (НПК «Открытая Наука», Россия) на 30 и 60 дни развития, оценивали вертикальную двигательную активность (ВА), которая представлена стойками с опорой на стену и без опоры; периферическую активность (ПА); центральную активность (ЦА); общую двигательную активность (ОДА), которую оценивали, как сумму ПА, ЦА и ВА.

Уровень тревожности у потомства в возрасте от 2 до 3 месяцев исследовали в соответствии с общепринятой методикой в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (НПК «Открытая Наука», Россия) по показателям: время нахождения в центральной камере, в открытом и закрытом рукаве, количество входов в открытый рукав (ОР) и в закрытый рукав (ЗР), общую двигательную активность (входы в ОР + входы в ЗР).

Исследование когнитивной деятельности потомства в возрасте от 2 до 3 месяцев проводили на модели формирования пищедобывательного навыка в условиях свободного выбора в «Ж-образном лабиринте» (НПК «Открытая Наука», Россия). В течение 5 дней животные совершали по 5 побегов длительностью 5 минут (300 сек). Пищевая депривация перед началом эксперимента составляла 24 ч. Когнитивная задача состояла в целенаправленном достижении пищевого подкрепления в условиях свободного выбора (результат обучения), находящегося в кормушке одного из рукавов лабиринта, в пределах фиксированного времени проведения эксперимента (скорость достижения цели).

Способность избегать стресс-ситуацию исследовали у потомства в возрасте от 2 до 3 месяцев в установке «Тест экстраполяционного избавления» (НПК «Открытая Наука», Россия) и фиксировали время латентного периода нахождения в стакане, под-

ныривания, периода плавания, до момента выхода на лестницу и количество дефекаций.

Все показатели поведенческих тестов фиксировали отдельно для самцов и самок. Регистрацию и обработку показателей поведенческих тестов осуществляли с помощью программного обеспечения Real Timer (НПК «Открытая Наука», Россия).

Статистический анализ данных проводился с использованием лицензионного пакета компьютерного программного обеспечения Statistika 10, StatSoft, Inc (Серия 0411-R). Проверку нормальности распределения количественных данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилкса. Для оценки степени гетерогенности переменных и, соответственно, адекватности проведения ANOVA использовали тест Левена. Для всех показателей генотоксикологических, эмбриотоксикологических и поведенческих исследований с нормальным распределением данных проводились межгрупповые сравнения при помощи t-критерия Стьюдента. Для множественных сравнений ординальных или интервальных показателей с распределением, отличающимся от нормального, использовался ранговый критерий Крускайла-Уоллиса. При оценке частотных показателей использовали критерий χ^2 . Для установления взаимосвязи между уровнем глюкозы, генотоксическими и поведенческими показателями использовали коэффициент корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Модель стрептозотоцинового диабета и контроль содержания глюкозы

При отработке модели диабета стрептозотин в цитратном буфере вводили внутрибрюшинно в дозах 20, 40, 50, 60 и 80 мг/кг. Препарат в дозах 60 и 80 мг/кг вызывал 90% гибель самок с 14 по 19 дни беременности, в дозе 50 мг/кг – 50% гибель плодов на 14 день гестации, при его использовании в дозе 20 мг/кг наблюдалось отсутствие гипергликемии. Только при введении стрептозотина в дозе 40 мг/кг была зарегистрирована гипергликемия, не сопровождавшаяся гибелью животных. В этой связи, в дальнейших экспериментах по моделированию диабета стрептозотин использовали в дозе 40 мг/кг в цитратном буфере. В ходе выполнения экспериментов было показано, что цитратный буфер персене оказывал влияния на показатели, регистрируемые в исследовании, поэтому сравнительную оценку данных проводили относительно контрольной группы.

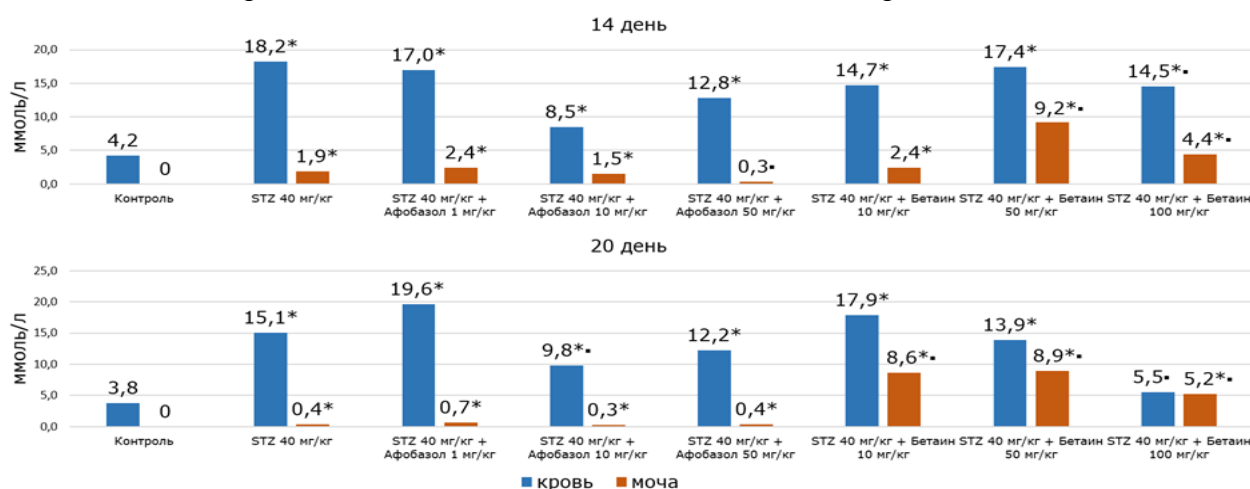
У животных, получавших помимо стрептозотоцина, афобазол в дозе 50 мг/кг концентрация глюкозы на 14 день беременности была значимо снижена в моче, а под действием препарата в дозе 10 мг/кг в крови животных на 20 день беременности.

У крыс, получавших бетаин в дозе 100 мг/кг, содержание глюкозы в крови значимо снизилось на 20 день беременности.

Бетаин в дозах 50 и 100 мг/кг и в дозах 10, 50 и 100 мг/кг увеличивал содержание глюкозы в моче самок на 14 и 20 дни беременности.

Рисунок 1.

Влияние афобазола и бетаина на уровень глюкозы в моче и крови беременных крыс со стрептозотоциновым диабетом на 14 и 20 дни беременности



* - Статистически значимые различия ($P < 0,05$) по сравнению с контролем

• - Статистически значимые различия ($P < 0,05$) по сравнению со стрептозотоциновой моделью

2. ДНК-повреждения в эмбриональных и плацентарных клетках крыс со стрептозотоциновым диабетом на 14 день беременности, влияние афобазола и бетаина

На 14 день эмбриогенеза на фоне экспериментального диабета зарегистрировано значимое увеличение показателей поврежденности ДНК в плацентарных и эмбриональных клетках по сравнению с контролем (табл. 1).

Афобазол в дозах 1 и 50 мг/кг значимо снижал поврежденность ДНК в плацентах, а в дозах 1, 10, 50 мг/кг в клетках эмбрионов крыс. В тканях эмбрионов афобазол в дозах 1 и 10 мг/кг снижал показатель «% ДНК в хвосте» до контрольных значений. Количество «апоптотических комет» под действием афобазола в дозах 10 и 50 мг/кг было значимо снижено только в клетках плацент.

Бетаин снижал уровень ДНК повреждений в клетках плацент и эмбрионов только при использовании в дозе 100 мг/кг.

3. ДНК-повреждения в эмбриональных и плацентарных клетках крыс со стрептозотоциновым диабетом на 20 день беременности, влияние афобазола и бетаина

На 20 день беременности у крыс со стрептозотоциновым диабетом было выявлено значимое повышение поврежденности ДНК. При этом, показатели «% ДНК в хвосте» мало отличались от зарегистрированных на 14-ый день беременности, а показатель «апоптотические кометы» возрос почти в 10 раз (табл. 2).

Таблица 1.

Влияние афобазола и бетаина на ДНК-повреждения в плацентарных и эмбриональных тканях крыс со стрептозотоциновым диабетом на 14 деньвнутриутробного развития

Группа	Клетки	Кол-во клеток	«% ДНК в хвосте», М±SD	«Апоптотических комет», М±SD
Контроль	плацента	1148	2,35±1,03	1,69±0,49
	эмбрион	1054	2,89±0,57	1,74±0,71
Стрептозотозин 40 мг/кг	плацента	2950	8,35±1,09*	1,97±0,66
	эмбрион	2908	11,63±2,69*	1,09±1,02
Стрептозотозин 40 мг/кг + Афобазол 1 мг/кг	плацента	1472	6,39±1,93*▪	2,58±1,87
	эмбрион	2291	4,47±2,31▪	0,49±0,35*
Стрептозотозин 40 мг/кг + Афобазол 10 мг/кг	плацента	2859	6,96±3,14*	1,02±1,15▪
	эмбрион	1560	3,87±1,45▪	1,05±0,66*
Стрептозотозин 40 мг/кг + Афобазол 50 мг/кг	плацента	1159	5,09±1,61*▪	1,14±1,27▪
	эмбрион	1228	4,30±0,99*▪	1,53±0,60
Стрептозотозин 40 мг/кг + Бетаин 10 мг/кг	плацента	2111	8,82±0,72*	2,08±0,22
	эмбрион	2787	11,47±2,40*	0,90±0,63
Стрептозотозин 40 мг/кг + Бетаин 50 мг/кг	плацента	1234	6,99±3,47*	2,01±1,02
	эмбрион	1005	10,34±1,41*	1,63±0,72
Стрептозотозин 40 мг/кг + Бетаин 100 мг/кг	плацента	770	5,03±2,95*▪	2,54±1,24
	эмбрион	2033	5,26±1,25*▪	1,10±0,68

* - Статистически значимые различия (P < 0,05) по сравнению с контролем

▪ - Статистически значимые различия (P < 0,05) по сравнению со стрептозотоциновой моделью

Афобазол во всех дозах снижал показатель «% ДНК в хвосте» в клетках плаценты, в дозе 10 мг/кг в клетках мозга эмбрионов, в дозе 50 мг/кг в клетках крови эмбрионов и во всех дозировках уменьшал количество «апоптотических комет» в клетках плацент и мозга эмбрионов, а в дозах 1 и 50 мг/кг также в клетках крови эмбрионов.

Бетаин в дозах 10, 50 и 100 мг/кг снижал количество «апоптотических комет» в клетках плацент и мозга эмбрионов и в дозах 50 и 100 мг/кг в клетках крови эмбрионов, в дозе 100 мг/кг уменьшал «% ДНК в хвосте» в клетках крови эмбрионов.

4. Эмбриотоксические эффекты у крыс со стрептозотоциновым диабетом, влияние афобазола и бетаина

У контрольных крыс не отмечено пред- и постимплантационной гибели эмбрионов, у крыс со стрептозотоциновым диабетом она составила 13,9 и 15,3 %, соответственно. На фоне введения афобазола в дозе 10 мг/кг, эти показатели составили 6,5

% и 6,0 %, в дозе 50 мг/кг 1,2 % и 1,2 %, бетаина в дозе 50 мг/кг 4,4 % и 3,0 % и в дозе 100 мг/кг 1,0 % и 4,1 %. Указанные показатели не различались с контролем ($P < 0,05$).

У крыс со стрептозотоциновым диабетом было зарегистрировано появление эмбрионов с аномалиями развития гипертрофического характера, с пастозностью и отечностью мягких тканей с выраженным поражением сосудов 3,9 % и 12,3 %, соответственно (рис. 2), а также выявлялись задержка оссификации и нарушения развития внутренних органов, в виде гидроцефалии (37 %) и аномалий сердца (35 %). Афобазол в дозах 10 и 50 мг/кг и бетаин в дозах 50 и 100 мг/кг нормализовали оссификацию скелета и во всех использованных дозах снижали количество указанных аномалий развития мозга и сердца ($P < 0,05$).

Таблица 2.

Влияние афобазола и бетаина на ДНК-повреждения в плацентарных и эмбриональных тканях крыс со стрептозотоциновым диабетом на 20 день внутриутробного развития

Группа	Клетки	Кол-во клеток	«% ДНК в хвосте», mean±SD	«Апоптотических комет», mean±SD
Контроль	плацента	563	5,58±1,26	4,85±1,56
	мозг эмбриона	1018	6,65±0,85	4,98±1,03
	кровь эмбриона	1139	5,60±0,70	4,72±0,97
Стрептозотозин 40 мг/кг	плацента	549	12,12±4,39*	13,00±4,78*
	мозг эмбриона	423	11,26±4,45*	13,03±4,45*
	кровь эмбриона	590	8,78±3,24*	9,01±3,89*
Стрептозотозин 40 мг/кг + Афобазол 1 мг/кг	плацента	523	9,51±1,96*■	2,76±1,30*■
	мозг эмбриона	1518	7,89±2,35	6,87±4,58■
	кровь эмбриона	422	8,33±4,37	4,62±2,42■
Стрептозотозин 40 мг/кг + Афобазол 10 мг/кг	плацента	561	7,03±1,95■	2,55±1,83■
	мозг эмбриона	1236	5,50±1,62■	1,37±0,85*■
	кровь эмбриона	466	6,63±3,08	6,22±2,20
Стрептозотозин 40 мг/кг + Афобазол 50 мг/кг	плацента	459	3,75±0,90*■	2,06±1,87*■
	мозг эмбриона	1128	6,48±3,48	1,43±0,81*■
	кровь эмбриона	369	4,52±1,85■	5,02±1,74■
Стрептозотозин 40 мг/кг + Бетаин 10 мг/кг	плацента	433	15,70±5,09*	7,51±2,34*■
	мозг эмбриона	1006	10,40±3,20*	3,42±2,60■
	кровь эмбриона	621	6,95±1,66*	9,54±3,02*
Стрептозотозин 40 мг/кг + Бетаин 50 мг/кг	плацента	514	14,01±4,16*	7,53±3,20■
	мозг эмбриона	1642	6,95±1,75	1,93±1,10*■
	кровь эмбриона	428	6,22±2,13	3,60±2,90■
Стрептозотозин 40 мг/кг + Бетаин 100 мг/кг	плацента	469	8,96±2,26*	6,31±2,82■
	мозг эмбриона	1209	7,53±2,24	1,76±1,55*■
	кровь эмбриона	1012	3,95±1,87*■	1,34±0,73*■

* - статистически значимые различия ($P < 0,05$) по сравнению с контролем

■ - статистически значимые различия ($P < 0,05$) по сравнению со стрептозотоциновой моделью

5. Динамика массы, становление сенсорно-двигательных рефлексов и мышечной силы потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом, влияние афобазола и бетаина

У потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом отмечено снижение массы тела потомства, задержка становления сенсорно-двигательных рефлексов на 5 день раз-

вития. Так рефлекс «избегание края» был сформирован только у 85% самок F₁ и 72 % самцов F₁, а «переворачивание на плоскости» – у 77 % самок F₁ и 78 % самцов F₁, а также было снижено времени удерживания на «горизонтальной веревочке» (P < 0,05). Афобазол в дозах 10 и 50 мг/кг и бетаин в дозах 50 и 100 мг/кг нормализовали эти показатели до контрольных значений.

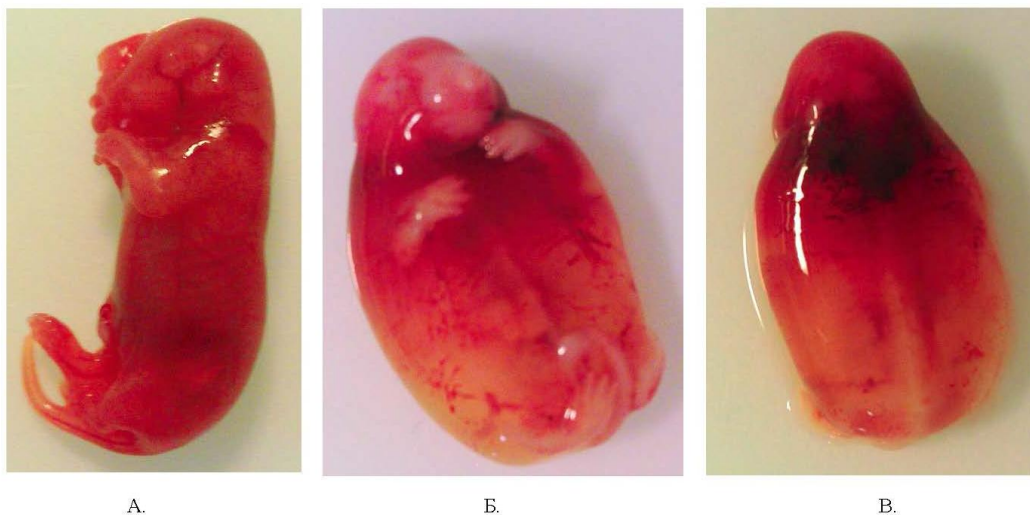


Рисунок 2. Нарушение развития эмбрионов у крыс со стрептозотоциновым диабетом.

А. Протрузия языка. БВ. Пастозность и гиперемия кожных покровов с поражением мягких тканей (кровоизлияния, гематомы).

6. Поведение потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом, влияние афобазола и бетаина

В исследовании использованы тесты «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «Ж-образный лабиринт» и «экстраполяционное избавление».

При оценке ориентационно-исследовательского поведения потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом на 30 и 60 дни развития в тесте «открытое поле» было выявлено значимое снижение общей двигательной активности, за счет центральной и периферической, у самок самцов F₁ по сравнению с контрольными животными. Афобазол в дозах 10 и 50 мг/кг и бетаин в дозах 50 и 100 мг/кг значимо повышали общую двигательную активность на 30 и 60 дни развития потомства.

У самок F₁, пренатальное развитие которых протекало на фоне стрептозотоцинового диабета, в тесте «экстраполяционное избавление», было отмечено значимое увеличение показателей «время в стакане» в 3,5 раза, «время плавания» в стакане в 5,7 раз и «время замирания» в 8,5 раз, у самцов F₁ эти показатели были увеличены в 10,4, 5,9 и 3,5 раз, соответственно, по сравнению с контролем. Афобазол в дозах 10 и 50 мг/кг и бетаин в дозах 50 и 100 мг/кг нормализуют регистрируемые показатели до значений, наблюдаемых в контроле.

При исследовании поведения инфантовпотомства крыс со стрептозотоциновым диабетом в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», отмечено снижение времени нахождения в центре и значимое увеличение времени нахождения в закрытых рукавах, свидетельствующее об повышенной тревожности животных. Применение афобазола в дозах 10 и 50 мг/кг или бетаина в дозах 50 и 100 мг/кг нормализовало регистрируемые показатели до контрольных значений.

В«Ж-образном лабиринте» у потомства животных модельной группы отмечены спонтанные побежки по локусам лабиринта и удлинение латентного периода обучения(табл. 3, 4).

В потомстве животных со стрептозотоциновым диабетом, получавших во время беременности афобазол в дозах 10 и 50 мг/кг (табл.3) или бетаин 50 и 100 мг/кг (табл. 4) отмечено значимое снижение времени достижения пищевого подкрепления, и, следовательно, увеличение количеств целенаправленных побегов и взятий пищевого подкрепления,наблюдался сходный с контрольными животными характер поведенческих реакций и формирования когнитивной деятельности.

7. Влияние афобазола и бетаина на содержание глюкозы в крови 90-дневного потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом

У потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом отмечено значимое снижение уровня глюкозы в крови на 90 день развития, по сравнению с контролем. Это важный прогностический признак развития диабета (Damm P. International journal of gynecology and obstetrics. 2009. 104(1). P. 25-26).

У животных, получавших во время внутриутробного развития, на фоне стрептозотоцинового диабета, афобазол в дозе 10 мг/кг или бетаин в дозе 100 мг/кг содержание глюкозы в крови соответствовало контрольным значениям.

8. Корреляционный анализ полученных результатов

Весь массив экспериментальных данных, полученных в работе, был подвержен корреляционному анализу. В табл. 6 и 7 представлены результаты, полученные при оценке связей между показателями генотоксических эффектов в эмбриональных и плацентарных тканях крыс и когнитивных нарушений в потомстве.

На 14 день внутриутробного развития выявлены корреляции между показателем «% ДНК в хвосте» в плацентарных тканях и временем достижения пищевого подкрепления на 1, 2, 3, 5 дни и числом взятий пищевого подкрепления на 1, 2, 3, 4, 5 дни обучения ($p < 0,05$), на 20 день внутриутробного развития выявлены связи между показателем «% ДНК в хвосте» в плацентарных тканях и временем достижения пищево-

го подкрепления на 1, 2, 3, 5 дни и числом взятий пищевого подкрепления на 1, 2, 5 дни обучения ($p < 0,05$).

Также, выявлены корреляции между показателем «апоптотические кометы» в плацентарных и эмбриональных тканях на 14 и 20 дни внутриутробного развития, содержанием глюкозы в крови беременных крыс и нарушениями когнитивных функций потомства.

Совокупность результатов проведенного исследования позволяет заключить, что экспериментальный стрептозотоциновый диабет индуцирует ДНК-повреждения в эмбриональных и плацентарных тканях крыс, вызывает пре- и постнатальные нарушения развития, выражающиеся в аномалиях развития гипертрофического характера и поражениях мозга, сердца и сосудов, приводит к поведенческим и когнитивным нарушениям у потомства.

Установлены корреляции между повреждениями ДНК и формированием пре- и постнатальных нарушений у потомства, развивающегося на фоне экспериментального стрептозотоцинового диабета.

Выявленные нарушения пре- и постнатального развития могут быть уменьшены и / или предупреждены применением на протяжении беременности антигенотоксикантов афобазола и бетаина.

Таблица3.

Влияние афобазола на формирование пищедобывательного навыка у потомства крыс с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом

Группа	n	Время достижения пищевого подкрепления, сек (Медиана (25%-75%))					Число взятий пищевого подкрепления, абс.зн., (Медиана (25%-75%))				
		1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
<i>Самки (F₁)</i>											
Контроль	10	97,3 (74,1÷113,8)	56,7# (34,1÷71,1)	35,7# (20,3÷49,1)	17,8# (16,0÷32,2)	20,0# (14,2÷23,4)	5 (4÷5)	5 (5÷5)	5 (5÷5)	5 (5÷5)	5 (5÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг	10	130,5 (83,0÷213,8)	114,1* (86,4÷137,2)	115,1* (88,8÷118,0)	15,8# (6,2÷21,3)	28,3# (19,7÷43,7)	4 (2÷5)	4* (3÷5)	5# (4÷5)	5# (5÷5)	5* (4÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг + Афобазол 10 мг/кг	10	111,4 (68,5÷157,7)	75,7# (37,0÷141,2)	66,5# (27,4÷89,6)	20,8# (8,9÷38,8)	20,2# (7,5÷39,2)	5 (4÷5)	5* (4÷5)	5 (5÷5)	5 (5÷5)	5 (5÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг + Афобазол 50 мг/кг	10	108,0 (60,5÷118,9)	56,7# (32,5÷60,3)	31,3# (21,6÷42,6)	30,4*# (24,0÷47,9)	22,6# (11,6÷34,6)	5 (5÷5)	5# (5÷5)	5 (5÷5)	5 (5÷5)	5# (5÷5)
<i>Самцы (F₁)</i>											
Контроль	10	134,0 (118,8÷174,0)	84,0# (69,8÷100,0)	51,2# (28,0÷78,0)	23,4# (13,8÷29,2)	22,1# (12,2÷29,4)	5 (4÷5)	5# (5÷5)	5# (5÷5)	5# (5÷5)	5# (5÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг	10	193,2* (163,9÷224,7)	149,3# (57,2÷206,7)	92,1# (26,6÷95,9)	39,1# (11,6÷42,8)	117,2*# (117,2÷137,7)	4* (2÷4)	5* (3÷5)	5*# (4÷5)	5# (5÷5)	5*# (4÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг + Афобазол 10 мг/кг	10	167,4 (126,6÷218,6)	129,3# (63,2÷162,8)	66,8# (39,3÷120,8)	49,1*# (36,0÷60,1)	54,4*# (39,0÷65,5)	3* (3÷4)	5*# (4÷5)	5# (5÷5)	5# (5÷5)	5*# (5÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг + Афобазол 50 мг/кг	10	109,3# (91,2÷151,4)	110,4 (75,4÷160,7)	118,2* (94,4÷163,4)	62,0*# (28,7÷102,6)	15,1# (9,2÷33,7)	5*# (4÷5)	5 (5÷5)	5* (4÷5)	5 (5÷5)	5# (5÷5)

Примечание:

n – количество животных в группе

* - статистически значимые различия (P < 0,05) по сравнению с контролем

- статистически значимые различия (P < 0,05) по сравнению со стрептозотоциновой моделью

- статистически значимые различия (P < 0,05) по сравнению с 1 днем обучения

Таблица4.

Влияние бетаина на формирование пищедобывательного навыка у потомства крыс с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом

Группа	n	Время достижения пищевого подкрепления, сек (Медиана (25%-75%))					Число взятий пищевого подкрепления, абс.зн., (Медиана (25%-75%))				
		1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
<i>Самки (F₁)</i>											
Контроль	10	97,3 (74,1÷113,8)	56,7# (34,1÷71,1)	35,7# (20,3÷49,1)	17,8# (16,0÷32,2)	20,0# (14,2÷23,4)	5 (4÷5)	5 (5÷5)	5 (5÷5)	5 (5÷5)	5 (5÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг	10	130,5 (83,0÷213,8)	114,1*# (86,4÷137,2)	115,1* (88,8÷118,0)	15,8# (6,2÷21,3)	28,3# (19,7÷43,7)	4 (2÷5)	4* (3÷5)	5*# (4÷5)	5# (5÷5)	5* (4÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг + Бетаин 50 мг/кг	10	136,0 (98,3÷209,4)	100,7 (36,2÷139,9)	93,6* (72,3÷132,7)	41,7*# (16,4÷100,5)	15,2# (12,5÷45,4)	4 (4÷5)	5 (4÷5)	5# (5÷5)	5# (5÷5)	5# (5÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг + Бетаин 100 мг/кг	10	133,3 (116,0÷138,2)	106,5* (76,6÷157,7)	67,6*# (35,2÷88,6)	37,6*# (23,4÷46,5)	39,6*# (25,2÷52,6)	5 (3÷5)	5* (4÷5)	5 (4÷5)	5 (5÷5)	5* (5÷5)
<i>Самцы (F₁)</i>											
Контроль	10	134,0 (118,8÷174,0)	84,0# (69,8÷100,0)	51,2# (28,0÷78,0)	23,4# (13,8÷29,2)	22,1# (12,2÷29,4)	5 (4÷5)	5# (5÷5)	5# (5÷5)	5# (5÷5)	5# (5÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг	10	193,2* (163,9÷224,7)	149,3# (57,2÷206,7)	92,1# (26,6÷95,9)	39,1# (11,6÷42,8)	117,2*# (117,2÷137,7)	4* (2÷4)	5* (3÷5)	5*# (4÷5)	5# (5÷5)	5*# (4÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг + Бетаин 50 мг/кг	10	169,0 (152,4÷169,0)	123,0* (101,1÷123,0)	47,0# (47,0÷49,7)	32,0# (25,9÷41,2)	29,6*# (12,8÷44,3)	4 (3÷5)	4* (4÷5)	5# (4÷5)	5# (5÷5)	5*# (5÷5)
Стрептозотонин 40 мг/кг + Бетаин 100 мг/кг	10	132,1* (92,8÷158,3)	94,1 (52,7÷150,1)	49,3# (25,8÷85,1)	28,2# (21,3÷45,7)	17,6*# (12,1÷49,5)	5* (5÷5)	5 (5÷5)	5* (5÷5)	5 (5÷5)	5* (5÷5)

Примечание:

- n – количество животных в группе
- * - статистически значимые различия (P < 0,05) по сравнению с контролем
- - статистически значимые различия (P < 0,05) по сравнению со стрептозотоциновой моделью
- # - статистически значимые различия (P < 0,05) по сравнению с 1 днем обучения

Таблица 5.

Корреляционная зависимость между генотоксическими эффектами в плацентарных и эмбриональных тканях и когнитивными нарушениями у потомства (F₁) крыс, получавших афобазол в период беременности на фоне стрептозотоцинового диабета

Генотоксические эффекты	Время достижения пищевого подкрепления					Число взятий пищевого подкрепления					
	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	
<i>14 день внутриутробного развития</i>											
<i>Плацента</i>											
% ДНК-комет, ср. зн.	♀		R=0,36	R=0,40				R= - 0,58			R= - 0,47
	♂	R=0,54					R= - 0,35	R= - 0,41			R= - 0,43
Апоптотические кометы, %	♀										
	♂								R= - 0,32		
<i>14 день внутриутробного развития</i>											
<i>Эмбрион</i>											
% ДНК-комет, ср. зн.	♀			R=0,38				R= - 0,33			R= - 0,40
	♂					R=0,52			R= - 0,41		R= - 0,43
Апоптотические кометы, %	♀				R=0,43						
	♂					R=0,34					
<i>20 день внутриутробного развития</i>											
<i>Плацента</i>											
% ДНК-комет, ср. зн.	♀	R=0,35	R=0,47	R=0,54			R= - 0,47	R= - 0,50			R= - 0,54
	♂	R=0,49				R=0,61	R= - 0,48				R= - 0,45
Апоптотические кометы, %	♀		R=0,39	R=0,49			R= - 0,35	R= - 0,39			R= - 0,46
	♂	R=0,32			R= - 0,38						R= - 0,37
<i>20 день внутриутробного развития</i>											
<i>Мозг эмбрионов</i>											
% ДНК-комет, ср. зн.	♀										R= - 0,48
	♂					R= 0,33				R= - 0,37	R= - 0,34
Апоптотические кометы, %	♀		R=0,41	R=0,39				R= - 0,41			R= - 0,45
	♂				R= - 0,37	R= 0,32					R= - 0,43
<i>20 день внутриутробного развития</i>											
<i>Кровь эмбрионов</i>											
% ДНК-комет, ср. зн.	♀			R=0,52				R= - 0,45	R= - 0,38	R= - 0,33	R= - 0,44
	♂										R= - 0,36
Апоптотические кометы, %	♀		R=0,47	R=0,36					R= - 0,54		R= - 0,52
	♂					R=0,45		R= - 0,46			

Таблица 6.

Корреляционная зависимость между генотоксическими эффектами в плацентарных и эмбриональных тканях и когнитивными нарушениями у потомства (F₁) крыс, получавших бетаин в период беременности на фоне стрептозотоцинового диабета

Генотоксические эффекты		Время достижения пищевого подкрепления					Число взятий пищевого подкрепления				
		1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
<i>Плацента</i>		<i>14 день внутриутробного развития</i>									
% ДНК-комет, ср. зн.	♀			R=0,34							
	♂	R=0,32				R=0,38	R= - 0,38			R= - 0,32	R= - 0,38
Апоптотические кометы, %	♀			R=0,35				R= - 0,31			
	♂										
<i>Эмбрион</i>		<i>14 день внутриутробного развития</i>									
% ДНК-комет, ср. зн.	♀			R=0,45				R= - 0,36	R= - 0,38		R= - 0,53
	♂	R=0,43					R=0,50	R= - 0,41	R= - 0,40	R= - 0,42	R= - 0,38
Апоптотические кометы, %	♀										
	♂						R=- 0,38				
<i>Плацента</i>		<i>20 день внутриутробного развития</i>									
% ДНК-комет, ср. зн.	♀										
	♂										
Апоптотические кометы, %	♀		R=0,36	R=0,36					R= - 0,34		
	♂						R=0,52		R= - 0,38	R= - 0,34	
<i>Мозг эмбрионов</i>		<i>20 день внутриутробного развития</i>									
% ДНК-комет, ср. зн.	♀										
	♂						R=0,37				R=- 0,33
Апоптотические кометы, %	♀					R= - 0,52					R= - 0,45
	♂	R=0,35									R= - 0,43
<i>Кровь эмбрионов</i>		<i>20 день внутриутробного развития</i>									
% ДНК-комет, ср. зн.	♀							R= - 0,36		R= - 0,36	R= - 0,42
	♂	R=0,34					R=0,47	R= - 0,39		R= - 0,33	R= - 0,37
Апоптотические кометы, %	♀				R= - 0,42						R= - 0,43
	♂						R=0,35				R= - 0,39

ВЫВОДЫ:

1. Методом ДНК-комет установлено значимое увеличение показателей поврежденности ядерной ДНК «% ДНК в хвосте» на 14 день и показателей «% ДНК в хвосте» и «апоптотические кометы» на 20 день беременности в плацентарных и эмбриональных клетках крыс со стрептозотоциновым диабетом.
2. Показатели, характеризующие формирование сенсорно-двигательных рефлексов, а также, в поведенческих тестах, тревожность, ориентационно-исследовательскую и когнитивную функции инфантов в потомстве крыс со стрептозотоциновым диабетом значимо ухудшены по сравнению с контролем.
3. Афобазол в дозах 1, 10 и 50 мг/кг или бетаин в дозах 10, 50 и 100 мг/кг, вводимые перорально, ежедневно на протяжении беременности, значимо уменьшают показатели поврежденности ДНК плацентарных и эмбриональных клетках на 14 и 20 дни беременности крыс со стрептозотоциновым диабетом.
4. Афобазол (1 ÷ 50 мг/кг) и бетаин (10 ÷ 100 мг/кг), вводимые в течение беременности, значимо уменьшают число эмбрионов с гидроцефалией мозга и дисплазией сердца. Афобазол в дозах 10 и 50 мг/кг и бетаин в дозах 50 и 100 мг/кг значимо снижают пред- и постимплантационную гибель, нормализуют оссификацию и динамику набора массы в потомстве крыс со стрептозотоциновым диабетом.
5. В потомстве крыс со стрептозотоциновым диабетом, получавших афобазол в дозах 10 и 50 мг/кг или бетаин в дозах 50 и 100 мг/кг per os ежедневно на протяжении беременности, нормализуются показатели, характеризующие тревожность, формирование сенсорно-двигательных рефлексов, ориентационно-исследовательскую и когнитивную функции у крысят-инфантов.
6. Афобазол в дозе 10 мг/кг или бетаин дозе 100 мг/кг значимо уменьшают гипергликемию, наблюдаемую на 20-ый день беременности у крыс со стрептозотоциновым диабетом. Бетаин во всех дозах значимо увеличивает содержание глюкозы в моче на 14 и 20-й дни беременности. Афобазол в дозе 50 мг/кг или бетаин в дозе 100 мг/кг, вводимые во время беременности, устраняют гипогликемию, соответственно, у 90-дневных самцов или самок потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом.
7. Установлены значимые корреляции между содержанием глюкозы в крови и моче и уровнями поврежденности ДНК в клетках плацент и эмбрионов, между показателями поврежденности ДНК в этих клетках и когнитивными нарушениями в потомстве крыс со стрептозотоциновым диабетом, получавших афобазол или бетаин в период беременности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основе результатов проведенных исследований, рекомендуется:

1. Использование модели стрептозотоцинового диабета для поиска фармакологических средств коррекции гипергликемии у беременных и профилактики пре- и постнатальных нарушений при диабете.

2. Исследования антигенотоксикантов в качестве средств профилактики нарушений пренатального и постнатального развития, в том числе, при диабете.
3. Использование метода ДНК-комет для регистрации генотоксических эффектов в эмбриональных тканях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Забродина, В.В.** Нарушения пренатального развития и гликемического статуса у потомства крыс с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом и их коррекция афобазолом [Текст] / В.В.Забродина, Е.Д.Шредер, О.В.Шредер, А.Д.Дурнев, С.Б.Середенин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2014. – Т. 158, № 7. – С. 20-24.
2. **Забродина, В.В.** Влияние афобазола и бетаина на ДНК-повреждения в плацентарных и эмбриональных тканях крыс с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом [Текст] / В.В.Забродина, Е.Д.Шредер, О.В.Шредер, А.Д.Дурнев, С.Б.Середенин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2015. – Т. 159, № 6. – С. 731-735.
3. **Забродина, В.В.** Влияние афобазола и бетаина на нарушения когнитивных способностей у потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом и их взаимосвязь с повреждениями ДНК [Текст] / В.В.Забродина, Е.Д.Шредер, О.В.Шредер, А.Д.Дурнев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2016. – Т. 161. – №3. – С. 335.

Глава в научном издании:

1. Shreder, O.V. Effects of Afobazole on the Searching Activity and Food-Procuring Skill of the Offspring of Rats Exposed to Hypoxia during Fetal Development [Текст] / O.V.Shreder, E.D. Shreder, **V.V.Zabrodina**, A.D. Durnev // Long-Term Memory: Mechanisms, Types and Disorders / Eds. A.K. Alexandrov and L.M. Fedoseev. – N-Y, USA: Nova Science Publishers, 2012. – Ch. 5 – P. 117-131.

Тезисы:

1. **Забродина, В.В.** Исследование проникновения афобазола в плаценту и ткани эмбрионов и его влияние на биохимический состав амниотической жидкости и сыворотки крови крыс, получавших препарат в период беременности [Текст] / В.В.Забродина, Е.Д.Шредер, О.В.Шредер, А.Д.Дурнев // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», Казань, 18-21 сентября 2012 года. – Казань, 2012. - С. 66.
2. **Zabrodina, V.V.** Development of an experimental model of streptozotocin diabetes in pregnant rats [Текст] / V.V.Zabrodina, E.D.Shreder, O.V.Shreder, A.D.Durnev, S.B.Seredenin // Abstract Book «Science-based assessment of laboratory animal welfare» Rus-LASA-ICLAS, 17-19 November 2014, St. Petesburg. – СПб, 2014. - P. 101.
3. **Zabrodina, V.V.** Influence streptozotocin-induced diabetes on behavioral activity of offspring and it's correction of afobazole [Текст] / V.V. Zabrodina, E.D. Shreder, O.V. Shreder, A.D. Durnev // Abstract Book «12th World Congress of Biological Psychiatry», Athens, 14 – 18 June 2015.- Greece, Athens, 2015. – P. 87.
4. **Забродина, В.В.** Нарушение поведенческой деятельности потомства, подверженного внутриутробному влиянию стрептозотоцинового диабета, и их коррекция афобазолом [Текст] / В.В.Забродина, Е.Д.Шредер, О.В.Шредер, А.Д.Дурнев // Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых с Международным участием, посвященной 150-летию со дня рождения академика Н.П. Кравкова, 22-23 октября 2015 года, Рязань. – Рязань, 2015. - С. 113.
5. **Забродина, В.В.** Влияние афобазола и бетаина на когнитивные нарушения у потомства крыс в модели стрептозотоцинового диабета [Текст] / В.В.Забродина, Е.Д.Шредер, О.В.Шредер, А.Д.Дурнев // 6-ая Международная конференция «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам», 9 – 13 ноября 2015 года, Клязьма. – М., 2015. - С. 23.