

ФАРМАКОЛОГИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ МАГНИЯ L-АСПАРАГИНАТА С ВИТАМИНОМ В₆ НА ПРОЦЕССЫ ОРГАНОГЕНЕЗА, РЕГИСТРИРУЕМЫЕ В АНТЕНАТАЛЬНОМ И ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДАХ РАЗВИТИЯ

А. А. Спасов, Л. И. Бугаева, Т. М. Коржова, С. А. Лебедева, А. Ю. Гетманенко, С. П. Воронин¹

В экспериментах на беременных крысах-самках установлено, что комбинация магния L-аспарагината с пиридоксином при внутрижелудочном введении с 6 по 16 дни беременности в дозах 70 и 700 мг/кг существенно не влияла на состояние беременных самок и процессы органо- и фетогенеза, регистрируемые в антенатальный период развития плодов. В постнатальном периоде у потомства от самок, получавших изучаемую комбинацию во время беременности, прослеживалось отставание прироста массы тела в период молочного вскармливания и активация прироста массы тела после перехода на дефинитивное питание; при этом нарушений в процессах физического развития не наблюдали.

Ключевые слова: магний L-аспарагинат; витамин В₆; органогенез; эмбриотоксичность; фетотоксичность; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Дефицит ионов магния, часто встречающийся у беременных женщин, может способствовать угрозе прерывания беременности, развитию патологического прелиминарного периода, дискоординированной родовой деятельности, фетоплацентарной недостаточности и т.п. [17]. Использование препаратов магния (магния лактат, оротат, аспарагинат, цитрат, аскорбинат) с целью профилактики преждевременных родов было рассмотрено в ряде работ [3, 6, 14, 15, 16], в которых доказана эффективность магниальной терапии в предотвращении самопроизвольного прерывания беременности в поздние сроки и в лечении гестоза. Дальнейшими исследованиями установлено, что сочетание магния и витамина В₆ не только снижает риск развития дефицита магния, но и дополняет их физиологические эффекты в организме [11]. Это послужило основой для разработки и клинического применения новых комбинированных пероральных лекарственных средств, содержащих магний и витамин В₆, среди которых наиболее известен препарат Магне В₆ (Sanofi, Франция). В настоящее время ведутся работы по созданию нового отечественного препарата на основе L-аспарагината магния в сочетании с витамином В₆. Установлено, что данная комбинация обладает высокой степенью биодоступности (что, вероятно, обуслов-

лено наличием L-стереоизомера аспарагиновой кислоты в ее составе) и низкой токсичностью [7, 10]. ЛД₅₀ при пероральном введении данной комбинации у крыс составляет 9657 мг/кг [9], а экспериментально доказанная средняя эффективная доза — 70 мг/кг, что соответствует рекомендуемой средней терапевтической разовой дозе для человека.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния комбинации магния L-аспарагината с пиридоксином на процессы органогенеза и фетогенеза, регистрируемые в антенатальный и постнатальный периоды развития плодов крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 75 нелинейных виргинных белых крысах-самках массой 180 – 220 г (питомник Научного предприятия Противочумного института МЗ РФ, Волгоград) и 30 пометах крысят, полученных от этих самок, в виварии НИИ фармакологии (Вологоград). Исследования проводили поэтапно согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (2012) [5] с учетом Правил лабораторной практики (GLP), разработанных в соответствии с Федеральным законом “Об обращении лекарственных средств” № 61-ФЗ [13] и принципов, принятых Международной конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986).

В исследованиях была использована комбинация вещества L-аспарагината магния в сочетании с витамином В₆, содержащая 76 % магния L-аспарагината (в расчете на безводную соль) и 0,67 % пиридоксина гидрохлорида, производства ОАО “Биосинтез” (Пенза).

¹ ГБОУ Волгоградский государственный медицинский университет, Россия, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.
ГБУ Волгоградский медицинский научный центр Министерства здравоохранения Волгоградской области, Россия, 400081, Волгоград, ул. Рокоссовского, д. 1Г.
ЗАО «Биоамид», Россия, 410033, Саратов, ул. Международная, д. 27.

Таблица 1. Влияние магния L-аспарагината с пиридоксином (70 и 700 мг/кг внутрижелудочно, 6 – 16 дни беременности) на процессы зачатия и эмбрионального развития плодов ($M \pm m$)

Исследуемый параметр (на 1 самку)	Контроль (интактный)	Магния L-аспарагинат с пиридоксином (70 мг/кг)	Магния L-аспарагинат с пиридоксином (700 мг/кг)
Желтые тела, количество	11,1 ± 0,26	10,6 ± 0,45	10,6 ± 0,55
Места имплантаций, количество	8,0 ± 0,76	8,5 ± 0,61	6,3 ± 0,48
Резорбции, количество	0,13 ± 0,09	0,13 ± 0,09	0
Доимплантационная гибель плодов, %	28,4 ± 6,46	18,1 ± 5,48	36,9 ± 5,78
Послеимплантационная гибель плодов, %	1,14 ± 0,78	1,56 ± 1,07	0
Количество плодов (на 1 самку)	7,9 ± 0,74	8,4 ± 0,63	6,3 ± 0,48
Краниокаудальные размеры плодов, см	3,7 ± 0,06	4,0 ± 0,1*	4,0 ± 0,1*
Масса плодов, г	4,0 ± 0,06	4,4 ± 0,32	4,4 ± 0,31

* Результаты достоверны относительно контроля при $p < 0,05$.

На первом этапе изучали эмбрио- и фетотоксическое действие комбинации магния L-аспарагината с пиридоксином (далее именуемой “комбинация”), регистрируемое в антенатальный период развития. Были сформированы 3 группы беременных самок по 15 особей в каждой: 2 опытные группы, которым вводили комбинацию интрагастрально в виде водной суспензии с 6 по 16 дни беременности (в период органогенеза), и 1 контрольная группа — интактная. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке у самок, накануне спаренных с самцами. Комбинацию вводили самкам 1-й опытной группы в дозе 70 мг/кг (экспериментально доказанная эффективная доза), 2-й опытной группе — 700 мг/кг (10-кратная эффективная доза). У самок определяли массу тела (в г) на 1, 6, 16 и 20 дни беременности. На 20 день беременных самок подвергали эвтаназии с использованием метода дислокации шейных позвонков [4, 5]. На вскрытии у самок выделяли рога матки и яичники. В яичниках подсчитывали число желтых тел беременности, в рогах матки — количество живых, мертвых и резорбированных плодов. На

основании полученных данных вычисляли показатели доимплантационной и послеимплантационной гибели плодов. Выделенные плоды осматривали для определения внешне видимых аномалий развития, измеряли массу тела (г) и краниокаудальные размеры (см), определяли пол. Затем для изучения состояния внутренних органов 1/3 часть плодов фиксировали в жидкости Буэна по методу Вильсона, а для изучения состояния скелета оставшуюся часть (2/3) фиксировали в 96 % этаноле с последующим окрашиванием скелета ализарином по методу Доусона [5, 12].

На втором этапе изучали возможное антенатальное повреждающее действие комбинации, регистрируемое в постнатальном периоде развития. Исследования проведены на 30 пометах крысят, разделенных на 2 группы: опытная группа — 15 пометов, матерям которых комбинацию вводили внутрижелудочно в дозе 700 мг/кг с 6 дня беременности до родов, и контрольная группа — 15 пометов, полученных от интактных беременных самок.

После родоразрешения самок оценивали общее состояние помета, подсчитывали число крысят в помете.

Таблица 2. Влияние магния L-аспарагината с пиридоксином (70 и 700 мг/кг внутрижелудочно самкам с 6 по 16 дни беременности) на процессы оссификации плодов ($M \pm m$)

Точка оссификаций (на 1 самку)	Контроль (интактный)	Магния L-аспарагинат с пиридоксином (70 мг/кг)	Магния L-аспарагинат с пиридоксином (700 мг/кг)
Грудина	4,9 ± 0,03	4,9 ± 0,06	4,6 ± 0,09*
Ребра	13,0 ± 0,02	13,0 ± 0,02	12,9 ± 0,03
Позвонки	22,0 ± 0,11	22,0 ± 0,06	22,0 ± 0,1
Верхняя конечность			
Лопатка	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
Ключица	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
Конечность	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
Пястна	3,7 ± 0,06	3,5 ± 0,06	3,2 ± 0,06*
Нижняя конечность			
Тазовые	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
Конечность	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
Плюсна	4,0 ± 0,0	3,9 ± 0,02	3,9 ± 0,03

* Результаты достоверны относительно контроля при $p < 0,05$.

О качестве постнатального развития судили по приросту массы тела крысят, срокам физического развития и формирования сенсорно-двигательных рефлексов. Оценивали также поведенческую активность и мнестические реакции.

Динамику прироста массы тела у крысят регистрировали с 8 дня жизни до возраста 2 мес. Массу тела выражали в г.

Скорость физического развития (отлипание ушной раковины, появление волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, опускание семенников, открытие влагалища) и формирование сенсорно-двигательных рефлексов (переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, избегание обрыва (с визуальным стимулом и без него), переворачивание в свободном падении, зрачковый рефлекс, мышечная сила) оценивали согласно общепринятым методическим подходам [2, 8].

Двигательную и поведенческую активность, а также способность к обучению и памяти у крысят исследовали в тестах “открытое поле” и “УРПИ” [1]. Тестирование крысят в “открытом поле” проводили на 20 и 45 дни жизни. Наблюдения вели в течение 3 мин. Отмечали число пересеченных квадратов (горизонтальная активность), вставаний на задние лапки (вертикальная активность), заглядываний в напольные отверстия (исследовательская активность), актов груминга и дефекаций (по числу болюсов) (эмоциональная активность). Тест “УРПИ” проводили на 2 мес жизни. На этапе обучения отмечали латентный период захода в темную камеру, пороги чувствительности и вокализации (мА); на этапе воспроизведения — латентный период, количество заходов и время нахождения в темной камере.

Таблица 3. Влияние магния L-аспарагината с пиридоксином на динамику массы тела (г) крысят (матерям которых комбинацию вводили в дозе 700 мг/кг внутрижелудочно с 6 дня беременности по день родов) в постнатальный период развития ($M \pm m$)

Период измерений	Группа животных	
	контроль (интактный)	магния L-аспарагинат с пиридоксином (700 мг/кг)
Самцы		
8 день	13,4 ± 0,54	11,6 ± 0,44*
14 день	22,4 ± 0,58	17,6 ± 0,75*
1 мес	62,9 ± 0,74	59,4 ± 0,74*
1,5 мес	74,5 ± 0,67	75,0 ± 0,71
2 мес	96,1 ± 0,70	93,6 ± 1,31
Самки		
8 день	12,1 ± 0,42	10,7 ± 0,37*
14 день	20,4 ± 0,72	16,9 ± 0,42*
1 мес	60,3 ± 0,98	54,8 ± 0,48*
1,5 мес	73,6 ± 0,96	73,2 ± 0,87
2 мес	93,3 ± 0,97	90,1 ± 0,85

* Результаты достоверны относительно контроля при $p < 0,05$.

Результаты экспериментов подвергали статистической обработке в программе Microsoft Excel-2007 с использованием t -критерия Стьюдента и поправкой Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам первого этапа исследований достоверных различий в приросте массы тела у беременных самок в опытных группах относительно контроля не обнаружено.

После эвтаназии и вскрытия у беременных самок также не обнаружено грубых нарушений в процессах эмбрионального развития плодов. Из результатов, представленных в табл. 1, видно, что у самок 1-й опытной группы число желтых тел несущественно снижалось относительно контроля на 4,5 % ($p > 0,05$), количество мест имплантаций повышалось на 6,3 % ($p > 0,05$), тогда как число резорбций не различалось с контролем. В связи с этим при расчёте доимплантационная гибель у них оказалась ниже контрольных значений на 36,5 % ($p > 0,05$), а послеимплантационная — соответствовала контролю. У крыс 2-й опытной группы число желтых тел также снижалось на 4,5 % ($p > 0,05$), при этом количество мест имплантации уменьшалось на 21,1 % ($p > 0,05$), а резорбции отсутствовали. За счёт этого доимплантационная гибель у этой группы крыс повышалась на 29,9 % ($p > 0,05$), а послеимплантационная гибель не фиксировалась.

При обследовании выделенных плодов у контрольной и опытных групп крыс не обнаружено аномалий развития, уродств или обширных внутренних геморрагий. Краниокаудальные размеры плодов в обеих опытных группах превышали контрольные значения на 8 % ($p < 0,05$), а масса тела — на 10 % ($p > 0,05$). При подсчете у плодов точек оксификации скелета (табл. 2) выявлено, что их число у 1-й опытной группы значимо не различалось с показателями контрольной группы, а у плодов во 2-й опытной группе достоверно уменьшалось в области грудины (7,8 %) и пястных (13,3 %).

Таким образом, на основании результатов первого этапа исследований можно заключить, что комбинация магния L-аспарагината с пиридоксином при введении крысам-самкам в дозе 70 мг/кг в период с 6 по 16 дней беременности не повреждает процессы органогенеза. При введении комбинации крысам-самкам в тот же период в дозе 700 мг/кг патологического влияния на процессы органогенеза также не зарегистрировано, вместе с тем под действием данной комбинации прослеживается тенденция к повышению доимплантационной гибели плодов и снижению плодовитости; краниокаудальные размеры и масса плодов не снижаются, тогда как процессы оксификации скелета несколько замедляются. Выявленные эффекты, вероятно, могут быть обусловлены особенностями всасывания, распределения и изменениями магний-кальциевого равновесия в организме беременной самки, способствующими замедлению процессов формирования

Таблица 4. Влияние магния L-аспарагината с пиридоксином на процессы обучаемости и памяти крысят (матерям которых комбинацию вводили в дозе 700 мг/кг внутривентрикулярно с 6 дня беременности по день родов) в тесте “УРПИ” ($M \pm m$)

Исследуемый параметр	Группа животных	
	контроль (интактный)	магния L-аспарагинат с пиридоксином (700 ± мг/кг)
Воспроизведение (самцы)		
Латентный период, с	110,8 ± 13,92А	145,6 ± 10,43*
Время нахождения в камере, с	69,2 ± 13,92	34,4 ± 10,43*
Количество заходов	0,6 ± 0,12	0,7 ± 0,21
Воспроизведение (самки)		
Латентный период, с	106,8 ± 13,40	150,0 ± 10,06*
Время нахождения в камере, с	72,9 ± 13,44	30,0 ± 10,06*
Количество заходов	0,7 ± 0,11	0,6 ± 0,17

* Результаты достоверны относительно контроля при $p < 0,05$.

скелета у плода. С учетом этих данных на втором этапе исследования сочли целесообразным проанализировать влияние комбинации в дозе 700 мг/кг на процессы антенатального развития, регистрируемые в постнатальный период.

В исследованиях второго этапа установлено, что в период введения комбинации динамика прироста массы тела беременных крыс в контрольной и опытной группах достоверно не различалась. Отношение самок к появившемуся потомству было обычным. Случаев отказа от вскармливания матерью новорожденных крысят не наблюдали.

При исследованиях крысят существенных различий в общем состоянии животных опытной и контрольной групп не прослеживалось. В то же время выявлено, что в период молочного вскармливания у крысят опытной группы достоверно отставал прирост массы тела относительно контроля: на 8 день — на 13,4 % у самцов и на 11,5 % у самок; на 14 день — на 21,4 % у самцов и на 17,1 % у самок; на 30 день — на 5,6 % у самцов и на 9,1 % у самок. С переходом данных крысят на дефинитивное и самостоятельное питание прирост массы тела у них активизировался и по окончании 2 мес наблюдений соответствовал контрольным значениям (табл. 3).

Скорость физического развития и созревания сенсорно-двигательных рефлексов у крысят опытной группы не различалась с контролем.

По результатам тестирования двигательного поведения у 20- и 45-дневных крысят в тесте “открытое поле” достоверных различий между опытной и контрольной группами также не зафиксировано.

При исследовании мнестических реакций у 2-месячных крысят (тест “УРПИ”) в опытной группе, по сравнению с контролем, на этапе воспроизведения выработанного навыка отмечено достоверное увеличение латентного периода захода в темную камеру (на

31 % у самцов и на 40 % у самок) и уменьшение длительности нахождения в ней (на 50,3 % у самцов и на 59,9 % у самок), что может свидетельствовать об облегчении процессов обучения и запоминания у данной группы потомства (табл. 4).

Таким образом, у потомства крыс-самок, получавших в период беременности комбинацию магния L-аспарагината с пиридоксином в дозе 700 мг/кг, не выявлено отрицательных эффектов, связанных с физическим развитием и созреванием сенсорно-двигательных рефлексов. Не отмечено также изменений и в двигательной активности. При этом у крысят, находившихся на молочном вскармливании, прослеживалось отставание в приросте массы тела, нивелирующееся с переходом на самостоятельное питание.

ВЫВОДЫ

1. Комбинация магния L-аспарагината с пиридоксином при внутривентрикулярном введении беременным крысам-самкам в дозе 70 мг/кг в период органогенеза не оказывает тератогенного и эмбриотоксического действия.

2. При введении данной комбинации беременным крысам в дозе 700 мг/кг также не отмечено эмбриотоксических эффектов и повреждающего действия на процессы органогенеза. При этом введение комбинации магния L-аспарагината с пиридоксином способствует частичному угнетению процессов оссификации, регистрируемых в антенатальный период развития, однако не изменяет процессы физического развития в постнатальном периоде, а также способствует улучшению способности к обучению и запоминанию у крысят.

ЛИТЕРАТУРА

1. Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высшая школа, Москва (1991).
2. Т. А. Гуськова, *Хим.-фарм. журн.*, **24**(7), 10 – 15 (1990).
3. Н. Г. Кошелева, О. Н. Аржанова, Т. А. Плужникова, *Невынашивание беременности: Этиопатогенез, диагностика, клиника и лечение*, Изд-во Н-Л, Санкт-Петербург (2003).
4. А. С. Матюшин, В. С. Осняч, Т. Н. Павлова, *Деонтология медико-биологического эксперимента*, РУМК по высш. и средн. спец. образов. МЗ РСФСР, Москва (1987).
5. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов (ред.), Гриф и К, Москва (2012).
6. В. М. Сидельникова, *Акушер. и гинекол.*, № 6, 47 – 48 (2002).
7. М. К. Синолицкий, С. П. Воронин, В. Г. Дебабов и др., Патент РФ № 2229879 (2004).
8. Н. М. Смольникова, Е. М. Чиркова, И. В. Голованова и др., *Ведомости фармакол. комитета*, № 1, 13 – 20 (1998).
9. А. А. Спасов, Л. И. Бугаева, С. А. Лебедева и др., *Вестник ВолГМУ*, **54**(2), 105 – 108 (2015).
10. А. А. Спасов, В. И. Петров, И. Н. Иежица и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **70**(1), 17 – 21 (2007).
11. Н. К. Тетрашвили, *Рос. вестник акушера-гинеколога*, № 4, 62 – 64 (2007).

12. И. М. Трахтенберг, Р. Е. Сова, В. О. Шефтель, Ф. А. Оникиенко, *Проблемы нормы в токсикологии*, Медицина, Москва (1991).
13. Федеральный закон Российской Федерации об обращении лекарственных средств от 12 апреля 2010 года № 61-ФЗ, ст. 11, Москва (2010).
14. М. В. Харитоновна, М. В. Кравченко, С. А. Лебедева, *XI Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области*, Тез. докладов, Волгоград (2006), сс. 20 – 21.
15. Ю. В. Чушков, *Рус. мед. ж.*, № 17, 867 – 873 (2012).
16. M. Makrides, C. A. Crowther, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 4, CD000937 (2001).
17. P. R. Standley, C. A. Standley, *Am. J. Hypertens.*, **15**(6), 565 – 570 (2002).

Поступила 11.03.16

EFFECT OF MAGNESIUM L-ASPARTATE AND VITAMIN B6 COMBINATION UPON ORGANOGENESIS REGISTERED DURING ANTENATAL AND POSTNATAL PERIODS

A. A. Spasov, L. I. Bugaeva, T. M. Korzhova, S. A. Lebedeva,
A. Y. Getmanenko, and S. P. Voronin

¹ Volgograd State Medical University, pl. Pavshih Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

² Volgograd Medical Research Center, ul. Marshala Rokossovskogo 1G, Volgograd, 400081 Russia

³ Bioamid Company, ul. Mezhdunarodnaya 27, Saratov, 410033 Russia

Experiments on pregnant female rats demonstrated that a combination of magnesium L-asparaginate with pyridoxine upon intragastric introduction from 6th to 16th days of pregnancy at doses of 70 and 700 mg/kg did not affect significantly the condition of pregnant females and processes of organo- and fetogenesis monitored during the antenatal period of fetal development. In the postnatal period, the offspring of rats treated with the given drug combination during pregnancy showed a delay in body weight gain during the weaning period and activation of body weight increase after the passage to a definitive nutrition, while no disturbances in physical development were observed.

Keywords: magnesium L-aspartate; vitamin B6; organogenesis; embryotoxicity; fetotoxicity; rats.