

МЕХАНІЗМИ ПОШКОДЖЕННЯ СЕРЦЯ ЩУРІВ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ КВЕРЦЕТИНОМ

У роботі досліджено стабільність розвитку адреналіново-кальцієвої моделі кардіосклерозу і його корекцію кверцетином. Патологія супроводжується розвитком оксидативного, карбонільного, нітрооксидативного стресу, посиленням окиснювальної модифікації білків і змінами антиоксидантного захисту міокарда. Кверцетин створює кардіопротекторний ефект, збільшує антиоксидантний захист.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кардіосклероз, щури, оксидативний стрес, антиоксидантна система.

ВСТУП. Однією з причин розвитку серцево-судинної недостатності є інфаркт міокарда. Він є динамічним процесом і завершується заміною змертвої частини міокарда фіброзним рубцем. Пошкоджується міокард за рахунок ішемічного некрозу і запальних механізмів, що обмежує зону ішемічного некрозу [14]. Перебіг запальної реакції впливає на процеси розвитку ремоделювання і фіброзу при інфаркті міокарда [12, 13].

Оксидантнонітрозамінний стрес, підвищений рівень оксиду азоту призводять до втрати тканини міокарда при його пошкодженні, що спричиняє некроз та апоптоз клітин, значна роль відводиться і накопиченню кальцію.

З огляду на основні патогенні ланки, доцільним є вивчення ефективності препаратів з кардіопротекторною дією. До таких засобів можна віднести кверцетин, який має антиоксидантні, спазмолітичні, протизапальні, антисклеротичні властивості [10].

Тому метою даної роботи було визначити зміни пероксидного окиснення ліпідів і білків, оксиду азоту й антиоксидантного захисту в щурів-самців з адреналіново-кальцієвою моделлю (АКМ) ураження міокарда та вплив на них кверцетину.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на 103 щурах-самцях лінії Вістар віком 5–6 місяців. Тварин було поділено на 10 груп (табл. 1). Щурам вводили одноразово внутрішньом'язово

© А. М. Мусієнко, О. В. Денефіль, 2016.

0,18 % розчин адреналіну гідротартрату з розрахунку 0,5 мг/кг маси (фармацевтична фірма "Дарниця", Україна) і внутрішньочеревно 5 % розчин глюконату кальцію ("Дніпрофарм", Україна) з розрахунку 10 мл/кг маси тварини. Для корекції вводили інтраперитонеально розчин кверцетину з розрахунку 200 мг/кг маси.

Усі експерименти проводили в першій половині дня в спеціально відведеному приміщенні при температурі 18–22 °С, відносній вологості 40–60 % і освітленості 250 лк. Досліди виконано з дотриманням норм Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) і наказу МОЗ України від 23.09.2009 р. № 690.

Евтаназію щурів проводили шляхом тотального кровопускання із серця після попереднього тіопентал-натрієвого наркозу (60 мг·кг⁻¹ маси тварини внутрішньочеревно). Для подальшого експериментального дослідження забирали кров і серце. У гомогенаті серця визначали концентрацію дієнових кон'югатів (ДК), трієнових кон'югатів (ТК), шиффових основ (ШО) [8], ТБК-активних продуктів [2], активність супероксиддисмутази (СОД) [9], каталази [5], вміст церулоплазміну (ЦП) [3], у сироватці крові – пероксидазну активність крові (ПАК) [6], відновлений глутатіон (ВГл) [15], активність глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіонредуктази (ГР) [4], показники окисної модифікації білків (ОМБ₃₇₀ і ОМБ₄₃₀) [1], нітрит-аніон [11], циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) [7].

Таблиця 1 – Розподіл тварин за групами

Група	Кількість тварин, взятих в експеримент	
	усього	смертність, %
Контроль	10	–
7 діб АКМ	10	–
14 діб АКМ	10	–
21 доба АКМ	10	–
28 діб АКМ	12	16,67
Кверцетин	10	–
7 діб АКМ+кверцетин	10	–
14 діб АКМ+кверцетин	10	–
21 доба АКМ+кверцетин	10	–
28 діб АКМ+кверцетин	11	8,33

Статистичну обробку цифрових даних виконано у відділі системних статистичних досліджень Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського за допомогою програмного забезпечення Excel ("Microsoft", США) і STATISTICA 6.0 ("Statsoft", США). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали при нормальному розподілі за критерієм Стьюдента, в інших випадках – з використанням непараметричних методів.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Через 7 діб після АКМ ураження міокарда значно зросли показники ДК, ТК, ТБК-активні продукти і ШО

порівняно з контролем, а значення ДК та ШО були максимальними весь час експерименту (табл. 2). Через 14 діб показники ДК, ТК, ТБК-активні продукти і ШО залишалися вищими від контрольних значень, але ДК та ШО знижувалися порівняно із 7 добою, а ТБК-активні продукти зростали. Через 21 добу, порівняно з попереднім терміном, знижувалися всі показники, але порівняно з контролем ДК, ТК і ТБК-активні продукти були більшими, а ШО – меншими. Через 28 діб, порівняно з попереднім терміном, знижувалися всі показники, але порівняно з контролем ТБК-активні продукти були вищими, а ТК і ШО – меншими.

Кверцетин спричинив значне зниження всіх досліджуваних показників. Викликання АКМ

Таблиця 2 – Зміни показників пероксидного окиснення ліпідів у серці тварин (M±m)

Показник			
дієнові кон'югати, ум. од. · г ⁻¹	трієнові кон'югати, ум. од. · г ⁻¹	ТБК-активні продукти, мкмоль/кг	шиффові основи, ум. од.
Контроль (n=10)			
1,002±0,002	1,003±0,002	0,991±0,007	1,833±0,041
7 діб АКМ (n=10)			
4,622±0,099*	4,755±0,095*	1,511±0,009*	5,153±0,136*
14 діб АКМ (n=10)			
1,913±0,027*. [#]	4,730±0,028*	3,924±0,069*. [#]	3,075±0,019*. [#]
21 доба АКМ (n=10)			
1,451±0,009*. [#]	2,747±0,010*. [#]	2,163±0,049*. [#]	1,617±0,018*. [#]
28 діб АКМ (n=10)			
1,006±0,021 ^{###}	0,941±0,016*. ^{###}	1,323±0,007*	0,809±0,047*. ^{###}
Кверцетин (n=10)			
0,901±0,016*	0,968±0,009*	0,178±0,004*	1,194±0,018*
7 діб АКМ+кверцетин (n=10)			
1,088±0,012*. ^{###}	1,142±0,014*. ^{###}	1,221±0,009*. ^{###}	1,150±0,017*. ^{###}
14 діб АКМ+кверцетин (n=10)			
0,906±0,012*. ^{###}	0,792±0,019*. ^{###}	2,214±0,027*. ^{###}	1,133±0,007*. ^{###}
21 доба АКМ+кверцетин (n=10)			
0,845±0,011*. ^{###}	0,965±0,011*. ^{###}	1,406±0,005*. ^{###}	1,179±0,005*. ^{###}
28 діб АКМ+кверцетин (n=10)			
1,062±0,013*. ^{###}	1,119±0,014*. ^{###}	1,061±0,004*. ^{###}	1,202±0,028*. ^{###}

Примітки. Тут і в усіх наступних таблицях:

- * – показники достовірні порівняно з контролем.
- ** – показники достовірні порівняно з кверцетином.
- # – показники достовірні порівняно з попереднім терміном дослідження.
- ### – показники достовірні порівняно з результатами без корекції.

ураження міокарда на його фоні зумовило значно менше накопичення всіх досліджуваних показників пероксидного окиснення ліпідів через 7, 14 і 21 доби. Тільки через 28 днів показники ДК, ТК і ШО були вищими в групі тварин, яким проводили корекцію.

При дослідженні показників ОМБ та нітрит-аніона (табл. 3) виявлено найбільше накопичення ОМБ₃₇₀ та ОМБ₄₃₀ через 7 днів, нітрит-аніона – через 14 днів, ЦІК – через 7 і 14 днів. Показники ОМБ₃₇₀ і ОМБ₄₃₀ до кінця експерименту не перевищували контрольних значень, а нітрит-аніон і ЦІК залишалися все ще значно більшими.

Кверцетин спричинив зменшення продуктів ОМБ та нітрит-аніона. Викликання АКМ ураження міокарда на фоні кверцетину зумовило менше накопичення ОМБ₃₇₀, нітрит-аніона, ЦІК у всі досліджувані терміни. Показник ОМБ₄₃₀, порівняно з групою без корекції, був нижчим через 7 і 28 днів, не відрізнявся через 14 днів та перевищував результати через 21 добу.

Показники антиоксидантного захисту також змінювалися протягом експерименту (табл. 4). Порівняно з попереднім терміном дослідження через 14 днів активність СОД зменшилася на 38,11 % (p<0,001), через 21 добу зросла у 2,7 раза (p<0,001) і через 28 днів знову зменшилася на 4,46 % (p>0,05).

Активність каталази через 14 днів, порівняно із 7-ю, знижувалася на 60,76 % (p<0,001) і не відрізнялася від контролю. Через 21 добу вона зросла на 21,25 % (p<0,001) і залишалася на тому ж рівні через 28 днів.

Вміст ЦП, порівняно з контролем, зріс через 7 днів у 3,34 раза (p<0,001), через 14 днів – у 21,14 раза (p<0,001) і був найвищим порівняно з іншими термінами дослідження. Через 21 і 28 доби він поступово знижувався, але був значно більшим порівняно з контрольними значеннями.

ПАК через 7 днів не відрізнялася від контрольних цифр, через 14 днів підвищилася, досягаючи максимальних значень, через 21 добу знизилася, але була більшою, ніж у контрольній групі, а через 28 днів продовжувала зменшуватися.

Кверцетин призвів до значного зростання всіх досліджуваних показників. Викликання АКМ ураження міокарда на його фоні через 7 днів викликало тільки збільшення ПАК, а всі інші показники були меншими, ніж у групі без корекції. Активність каталази, ЦП і ПАК були вищими, а СОД – не відрізнялася від контрольних цифр. Тільки каталаза зростала порівняно з показниками після введення кверцетину. Через 14 і 21 доби активність СОД і каталази збільшувалась, а активність ЦП і ПАК зменшувались. Порівняно з контролем усі показники були вищими; крім СОД, значення перевищували показники після введення кверцетину. Через 21 добу, порівняно з 14-ю, активність СОД збільшувалась, а активність ЦП і ПАК зменшувались. Через 28 днів активність каталази зростала, а активність СОД, ЦП і ПАК знижувались. Порівняно з контролем СОД і каталаза збільшувались, а ЦП і ПАК зменшувались; крім каталази, всі значення були меншими від показників після введення кверцетину.

Таблиця 3 – Зміни показників окисної модифікації білків, оксиду азоту аніон-радикала, циркулюючих імунних комплексів у щурів (M±m)

Показник			
ОМБ ₃₇₀ , ммоль/г білка	ОМБ ₄₃₀ , ммоль/г білка	NO ² , ×10 ⁻³ , мкмоль/л	ЦІК, ум. од.
Контроль (n=10)			
681,97±13,21	549,52±36,01	0,884±0,019	54,30±1,22
7 днів АКМ (n=10)			
4194,62±212,99*	4241,08±161,21*	2,151±0,042*	134,30±1,49*
14 днів АКМ (n=10)			
1218,10±18,18*.#	1365,52±6,17*.#	2,425±0,116*.#	136,40±4,52*
21 доба АКМ (n=10)			
661,03±1,76#	452,34±11,15*.#	1,742±0,056*.#	110,90±0,69*.#
28 днів АКМ (n=10)			
680,56±8,01#	524,16±3,16#	1,769±0,027*	88,50±1,61*.#
Кверцетин (n=10)			
348,23±1,40*	200,65±1,27*	0,757±0,047*	56,90±0,94
7 днів АКМ+кверцетин (n=10)			
1061,55±10,92*.*.#	720,56±18,30*.*.#	1,876±0,033*.*.#	83,70±1,74*.*.#
14 днів АКМ+кверцетин (n=10)			
864,20±2,22*.*.#	1358,59±12,56*.*.#	1,715±0,050*.*.#	81,80±1,16*.*.#
21 доба АКМ+кверцетин (n=10)			
1070,05±1,13*.*.#	1040,92±10,03*.*.#	1,273±0,053*.*.#	69,90±0,82*.*.#
28 днів АКМ+кверцетин (n=10)			
555,34±11,53*.*.#	370,75±2,68*.*.#	1,219±0,025*.*.#	81,70±1,55*.*.#

Таблиця 4 – Зміни показників антиоксидантного стану в серці тварин (M±m)

Показник			
супероксиддисмутаза, ум. од. · мг ⁻¹	каталаза, мкат/кг	церулоплазмін, мг/л	пероксидазна активність крові, мг/л
Контроль (n=10)			
0,244±0,004	1,385±0,057	3,33±0,03	176,97±0,53
7 діб АКМ (n=10)			
0,814±0,014*	3,790±0,018*	11,14±0,12*	175,83±1,01
14 діб АКМ (n=10)			
0,504±0,004*.#	1,487±0,043#	70,48±0,57*.#	897,94±6,34*.#
21 доба АКМ (n=10)			
1,359±0,053*.#	1,803±0,066*.#	54,33±0,81*.#	654,97±0,77*.#
28 діб АКМ (n=10)			
1,298±0,061*	1,905±0,022*	7,07±0,14*.#	197,03±0,72*.#
Кверцетин (n=10)			
2,130±0,018*	1,607±0,041*	22,50±0,62*	410,57±1,08*
7 діб АКМ+кверцетин (n=10)			
0,244±0,040##	2,291±0,335*.,##	4,69±0,13*.,##	180,23±1,34*.,##
14 діб АКМ+кверцетин (n=10)			
0,746±0,019*.,##	3,444±0,065*.,##	38,31±0,77*.,##	806,86±0,59*.,##
21 доба АКМ+кверцетин (n=10)			
1,579±0,025*.,##	3,429±0,020*.,##	30,81±0,61*.,##	462,80±0,78*.,##
28 діб АКМ+кверцетин (n=10)			
0,718±0,020*.,##	4,280±0,025*.,##	3,10±0,05*.,##	125,37±1,04*.,##

При вивченні показників системи глутатіону (табл. 5) в усі досліджувані терміни АКМ ураження міокарда концентрація ВГл, ГП і ГР була меншою від контрольних значень. Такі ж самі результати отримано після введення кверцетину та розвитку патологічного процесу на його фоні. Розвиток АКМ ураження міокарда на фоні кверцетину спричинив меншу депресію показників системи глутатіону (крім ГП через 14 діб).

Таким чином, у відповідь на введення адреналіну та кальцію в щурів розвивався оксидантнітрозамінний стрес. Через 21 і 28 діб було відмічено затихання патологічного процесу. Протидіяла пошкоджувальному ефекту антиоксидантна система. Через 7 діб спостерігали значне зростання активності каталази, через 14 – вмісту ЦП та ПАК, через 21 і 28 – активності

СОД. Показники системи глутатіону знижувалися. Максимум зменшення ВГл і ГР відзначали через 14 діб, ГП – через 21 добу. Через 7 і 14 діб різко зріс вміст ЦІК, які є маркером запалення. Очевидно, запустився каскад запальних реакцій, який максимально розвинувся через 7 і 14 діб, що поєднувалося з посиленням окисної модифікації білків, активацією ліпідної пероксидації, розвитком оксидантнітрозамінного стресу. Антиоксидантний захист не був достатнім і максимально спрацьовував, тільки починаючи з 14 доби, що спричинило затихання запалення. Уведення кверцетину запобігало надмірному розвитку патологічного процесу.

ВИСНОВКИ. 1. Розвиток патологічних процесів при адреналіново-кальцієвій моделі

Таблиця 5 – Зміни показників системи глутатіону в серці тварин при розвитку некротично-проліферативних процесів (M±m)

Група	Показник		
	відновлений глутатіон, мкмоль/г	глутатіонпероксидаза, мкмоль/хв·кг	глутатіонредуктаза, мкмоль/хв·кг
Контроль	757,89±5,10	0,462±0,007	0,560±0,007
7 діб АКМ	391,23±8,69*	0,345±0,005*	0,285±0,004*
14 діб АКМ	280,70±19,39*.#	0,227±0,005*.#	0,211±0,002*.#
21 доба АКМ	308,77±12,04*	0,136±0,007*.#	0,237±0,004*.#
28 діб АКМ	657,89±8,77*.#	0,246±0,003*.#	0,264±0,009*.#
Кверцетин	443,86±13,09*	0,218±0,004*	0,246±0,003*
7 діб АКМ+кверцетин	664,91±6,64*.,##	0,537±0,002*.,##	0,536±0,002*.,##
14 діб АКМ+кверцетин	449,61±10,85*.,##	0,235±0,004*.,##	0,342±0,007*.,##
21 доба АКМ+кверцетин	542,10±7,60*.,##	0,257±0,005*.,##	0,365±0,001*.,##
28 діб АКМ+кверцетин	719,89±14,12*.,##	0,433±0,002*.,##	0,343±0,002*.,##

кардіосклерозу супроводжується розвитком оксидативного, карбонільного, нітрооксидативного стресу, посиленням окисної модифікації білків та зміною антиоксидантного захисту міокарда. Максимальне зростання продуктів окисної модифікації білків відмічено через 7 діб, нітрит-аніона – через 14 діб, продуктів пероксидного окиснення ліпідів – через 7 діб, ТК і ТБК-активних продуктів – через 14 діб.

2. Антиоксидантний захист серцевого м'яза значно зростає, крім системи глутатіону, і його окремі ланки досягають максимуму в різні терміни дослідження: активність каталази – че-

рез 7 діб, вміст церулоплазміну і пероксидазна активність крові – через 14 діб, активність супероксиддисмутази – через 21 і 28 діб. Значення системи глутатіону зменшуються.

3. Кверцетин спричинює протекторний ефект і менший розвиток оксидативного, карбонільного, нітрооксидативного стресу, зростання окисної модифікації білків та антиоксидантного захисту міокарда при розвитку кардіосклерозу.

Перспективи подальших досліджень. Для в'яснення механізмів ураження серця та кардіопротекторної дії буде проведено аналіз вегетативного забезпечення серцевого ритму.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Арчаков А. И. Модификация белков активным кислородом и их распад / А. И. Арчаков, И. М. Михосоев // Биохимия. – 1998. – **54**, № 2. – С. 179–185.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
3. Клінічна лабораторна діагностика : нормативні, директивні, правові документи / гол. ред. В. М. Забальотко. – К. : МВЦ “Медінформ”, 2003. – 856 с.
4. Круглікова Г. О. Глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна активність печінки щурів після введення селеніту натрію / Г. О. Круглікова, І. М. Штутман // Укр. біохім. журн. – 1976. – № 2. – С. 227–233.
5. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
6. Попов Т. Метод определения пероксидазной активности крови / Т. Попов, Л. Нейковська // Гигиена и санитария. – 1971. – № 10. – С. 89–93.
7. Хаєвська М. Ю. Циркулюючі імунні комплекси за умов норми та патології / М. Ю. Хаєвська // Вісн. наук. дослідж. – 2000. – № 4. – С. 37–40.
8. Хышиктуев Б. С. Методы определения продуктов перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха и их клиническое значение / Б. С. Хышиктуев, Н. А. Хышиктуева, В. Н. Иванов // Клинич. лаб. диагностика. – 1996. – № 3. – С. 13–15.
9. Чевари С. Роль супероксиддисмутази в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
10. Шеремета Л. М. Противиразкова дія ліпосомального кверцетину при субхронічній виразці шлунка в експерименті / Л. М. Шеремета // Вісн. СумДУ. Серія “Медицина”. – 2008. – № 1. – С. 43–47.
11. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids / I. C. Green, A. W. Davie, J. Golawski [et al.] // Anal. biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131–138.
12. Christia P. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction / P. Christia, N. G. Frangogiannis // Eur. J. Clin. Invest. – 2013. – **43**, № 9. – P. 986–995.
13. Frangogiannis N. G. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration / N. G. Frangogiannis // Curr. Opin. Cardiol. – 2015. – **30**, № 3. – P. 240–245.
14. Hashmi S. Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: a comparison / S. Hashmi, S. Al-Salam // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2015. – **8** (8). – P. 8786–8896.
15. Moffat J. A. Investigations into the role of sulfhydryl groups in the mechanism of action of the nitrates / J. A. Moffat, P. W. Armstrong, G. S. Marks // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 1982. – **60**, № 10. – P. 1261–1266.

МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЦА КРЫС И ЕГО КОРРЕКЦИЯ КВЕРЦЕТИНОМ

Резюме

В работе исследовано стадийность развития адреналиново-кальциевой модели кардиосклероза и его коррекцию кверцетином. Патология сопровождается развитием оксидативного, карбонильного, нитрооксидативного стресса, усилением окислительной модификации белков и изменениями антиоксидантной защиты миокарда. Кверцетин создает кардиопротекторный эффект, увеличивает антиоксидантную защиту.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кардиосклероз, крысы, оксидативный стресс, антиоксидантная система.

A. M. Musiienko, O. V. Denefil
I. HORBACHEVSKY TERNOPIIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

MECHANISMS OF HEART DAMAGE IN RATS AND ITS CORRECTION BY QUERCETIN

Summary

We investigated the staging of adrenaline-calcium model of atherosclerosis and its correction by quercetin. Pathology is accompanied by the development of oxidative, carbonyl, nitrooxidative stress, increase of oxide modification of proteins and changes in myocardial antioxidant protection. Quercetin creates a cardioprotective effect, increases antioxidant protection.

KEY WORDS: atherosclerosis, rats, oxidative stress, antioxidant system.

Отримано 26.10.16

Адреса для листування: О. В. Денефиль, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: denefil@tdmu.edu.ua.