



В. И. Бугаев, В. В. Леонов,
Л. Г. Кашенко

Сумской государственный
университет

© Коллектив авторов

КВЕРЦЕТИН КАК ИНГИБИТОР БИОСИНТЕЗА ЛЕЙКОТРИЕНОВ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ХИРУРГИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО- КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ)

Резюме. Исследованы некоторые механизмы влияния Кверцетина на биосинтез лейкотриена C₄ в полиморфоядерных лейкоцитах донорской крови человека, хемотаксис и хемокинез нейтрофилов крыс и реакцию розеткообразования Т-лимфоцитов в эксперименте.

Показано, что кверцетин комплексно влияет на клеточные процессы которые определяют гиперэргический компонент общей реакции воспаления. Противовоспалительное действие Кверцетина дает возможность использовать его в комплексном лечении раневой хирургической инфекции.

Ключевые слова: лейкотриены, кверцетин, послеоперационные раневые осложнения.

Введение

Лейкотриены – вещества с чрезвычайно высокой биологической активностью были открыты в 1979 году. Получены убедительные данные о существенной роли лейкотриенов как медиаторов воспаления и аллергии. Доказано участие лейкотриенов в ключевых моментах формирования воспалительной реакции как аллергической, так и неаллергической природы. Следует полагать, что рациональная фармакологическая коррекция биосинтеза лейкотриенов при комплексном лечении гнойной хирургической инфекции несомненно является перспективной.

Наиболее эффективно ингибирующее действие на биосинтез лейкотриенов проявляются у некоторых веществ из группы флавоноидов. Одним из них является известное фармакопейное лекарственное средство Кверцетин. Проведенные специальные исследования показали возможность Кверцетина блокировать ключевой фермент каскада биосинтеза лейкотриенов арахидонат–5–липоксигеназу. Однако, количественные параметры данного эффекта флавоноида и степень его реализации на целых клетках требует специальной дополнительной оценки.

Кверцетин, как и другие флавоноиды, не только ингибирует окислительное превращение арахидоновой кислоты, но и блокирует функции целого ряда других Са–зависимых ферментов: сальмодулина и некоторых протеинкиназ, обеспечивающих реализацию клеточных воспалительных реакций. В литературе встречаются единичные сообщения о применении Кверцетина в хирургической практике для лечения гнойно–воспалительных заболеваний и послеоперационных осложнений.

Материалы и методы исследований

Нами исследованы некоторые механизмы воздействия Кверцетина на биосинтез лейкотриенов в эксперименте. Эти исследования включали определение влияния препарата на биосинтез лейкотриена C₄ в полиморфоядерных лейкоцитах донорской крови человека, хемотаксис и хемокинез крысиных нейтрофилов, а так же реакцию розеткообразования Т-лимфоцитов мышей.

Для прямой оценки интенсивности биосинтеза лейкотриена C₄ использовали суспензию человеческих полиморфоядерных лейкоцитов, выделенных из донорской крови, содержащую 2×10^7 клеток в одном мл физиологического раствора. Жизнеспособность клеток в пробе контролировали 0,8 % водным раствором эозина. В работе использовали 1 мл суспензии, содержащей не менее 90 % живых лейкоцитов.

В контрольные (без препарата) и опытные (содержащие Кверцетин) образцы лейкоцитарных суспензий вносили 10 мкл водно-спиртового раствора Са-ионэфора А 23187 («Sigma») до конечной концентрации в пробе $1,25 \times 10^{-5}$ моль/л. Стимуляцию биосинтеза лейкотриенов ионофором осуществляли инкубацией при 37 °С в течение 5 минут. Определение содержания лейкотриена C₄ в пробах осуществляли обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ).

Изучение воздействия Кверцетина на спонтанную и стимулированную стандартным хемоаттрактантом (fMLP) подвижность нейтрофилов крыс проводили модифицированным методом (Bueffer H. et al 344, 1989) на клетках, выделенных из крови самцов белых беспородных крыс массой 200-250 гр. Нейтрофилы получали путем дефференцированного

центрифугирования цельной крови, полученной декапитацией крыс. Полученную суспензию гранулоцитов трижды отмывали средой № 199. В одном см³ суспензии содержалось 5–8×10⁵ клеток. Для оценки миграционных свойств нейтрофилов была использована тест-система по Boyden [3].

При изучении спонтанной подвижности нейтрофилов (хемокинез) в нижнюю камеру вносили гомологичную плазму, разбавленную фосфатным буфером (1:4), а стимулированную подвижность (хемотаксис) изучали при наличии в нижней камере стандартного хемоаттрактанта fMLP в концентрации 1×10⁷ моль/дм³. В нижнюю камеру тест-системы вносили 1,6 см³ раствора хемоаттрактанта (опытная проба) или 1,6 см³ гомогичной плазмы (контрольная проба). В верхнюю камеру тест-системы вносили 0,5 см³ взвеси интактных клеток (контроль) или 0,5 см³ взвеси клеток, предварительно проинкубированных с Кверцетином.

Количественную оценку реакции клеток производили путем подсчета количества клеток, полностью прошедших через мембранный фильтр, в десяти полях зрения при 160-кратном увеличении микроскопа.

Клиническая часть работы включала анализ результатов лечения 33 больных с воспалительными инфильтратами послеоперационных ран, оперированных в ургентном порядке по поводу острой хирургической патологии живота. Основную группу составили 20 больных в возрасте от 20 до 65 лет. Холецистэктомия выполнена 11 больным, 6 – аппендэктомия, 3 – операция Гартмана при раке ректосигмоидного отдела толстой кишки. Комплексное общепринятое лечение дополняли аппликациями спиртовым раствором Кверцетина (3 г сухого вещества + 15 мл 96 % этилового спирта) в низкомолекулярном декстрате. Группу сравнения составили 13 больных, которым проводилось общепринятое лечение воспалительных инфильтратов послеоперационных ран.

Результаты исследований и их обсуждение

Ранее было установлено [2], что Кверцетин непосредственное ингибирующее действие на

5-липооксигеназу оказывает в диапазоне концентраций 1×10⁶–1×10⁵ моль/л (ЕС₅₀ = 3,6×10⁻⁶ моль/л). Степень реализации данного эффекта в виде снижения валового выхода лейкотриена, продуцируемого стимулированными лейкоцитами, до настоящего времени не определялась. Однако известно, что для ингибиторов биосинтеза лейкотриенов действующие концентрации, как правило, на целых клетках в 2-3 раза выше, чем ЕС₅₀ на очищенном ферменте [2]. В связи с этим опыты по изучению влияния Кверцетина на биосинтез лейкотриена С₄ в полиморфноядерных лейкоцитах человека, стимулированных Са-ионофором А 23187, проводили с тремя концентрациями: 1×10⁻⁵, 3,3×10⁻⁶ и 1,0×10⁻⁶ моль/л [1]. Такой подбор концентраций, для которых значение – LgC составляет 5,0; 5,5; 6,0 соответственно, облегчает последующий расчет величины ЕС₅₀ пробит-анализом.

Проведенные исследования показали, что в указанном диапазоне концентраций Кверцетин подавляет биосинтез лейкотриена С₄ более чем на 50 % (табл. 1).

Таким образом, в данной серии экспериментов прослеживается тот факт, что в отличие от других ингибиторов 5-липооксигеназы Кверцетин более эффективно действует на целые клетки, чем на очищенный фермент. Это свидетельствует в пользу перспективности его местного применения для лечения раневой хирургической инфекции.

Для оценки дополнительных клеточных механизмов действия Кверцетина было проведено изучение влияния препарата на активную подвижность нейтрофилов и Т-лимфоцитарное розеткообразование. Было установлено (табл. 2), что в концентрациях 1×10⁻⁶ моль/л Кверцетин более чем в двое снижает как спонтанную, так и индуцированную подвижность нейтрофилов.

При анализе результатов экспериментов по изучению влияния Кверцетина на процессы розеткообразования установлено, что препарат приводит к торможению образования Т-лимфоцитарных розеток (табл. 3).

Таблица 1

Влияние Кверцетина на биосинтез лейкотриена С₄ в полиморфноядерных лейкоцитах человека, стимулированных ионофором А 23187

Характер эксперимента		Валовый выход лейкотриена (Н ₂ на 10 ⁶ клеток суспензии), М±m; p	Ингибирующий эффект (% к контролю), М±m
Без Кверцетина (контроль)	(n = 6)	56,7 ± 3,25 p < 0,01	100,0
30-минутная инкубация лейкоцитов с Кверцетином в концентрации (моль/л)	1×10 ⁻⁶ (n = 6)	24,9 ± 2,22 p < 0,05	43,9 ± 3,8
	3,3×10 ⁻⁶ (n = 6)	18,0 ± 2,74 p < 0,01	31,8 ± 4,7
	1×10 ⁻⁵ (n = 6)	11,3 ± 3,45 p < 0,01	19,9 ± 6,1



Таблица 2

Влияние Кверцетина на активную подвижность нейтрофилов крови крыс

Характер эксперимента		Количество клеток, проникающих в поры фильтра, $M \pm m$; p	Эффект (% к контролю), $M \pm m$
Спонтанная подвижность (хемокинез)	Без препарата (контроль) (n = 8)	$14,6 \pm 2,51$ $p < 0,05$	100,0
	Кверцетин (1×10^{-6} моль/л) (n = 8)	$6,8 \pm 1,08$ $p < 0,01$	$46,6 \pm 7,1$
Ингибированная подвижность (хемотаксис)	Без препарата (контроль) (n = 8)	$27,3 \pm 3,33$ $p < 0,05$	100,0
	Кверцетин (1×10^{-6} моль/л) (n = 8)	$12,9 \pm 2,75$ $p < 0,01$	$47,2 \pm 9,8$

Таблица 3

Сравнительная оценка влияния Кверцетина на розеткообразующую активность Т-лимфоцитов крови мышей

Характер эксперимента		Количество Е-РОК на 100 подсчитанных лимфоцитов, $M \pm m$; p	Эффект (% к контролю), $M \pm m$
Без добавления препарата (контроль)	(n = 8)	$31,5 \pm 0,93$ $p < 0,01$	100,0
После инкубации с Кверцетином	(1×10^{-5} моль/л) (n = 8)	$16,25 \pm 0,88$ $p < 0,01$	$51,6 \pm 0,28$
После инкубации с Димедролом	(1×10^{-5} моль/л) (n = 8)	$28,2 \pm 0,31$ $p < 0,05$	$89,2 \pm 0,09$
После инкубации с Эмбихином	(1×10^{-5} моль/л) (n = 8)	$11,3 \pm 2,33$ $p < 0,01$	$36,1 \pm 0,73$

Таким образом, проведенные исследования показали, что Кверцетин оказывает выраженное комплексное влияние на клеточные процессы, определяющие гиперэргический компонент воспалительной реакции. Это позволяет рассчитывать, что использование этого вещества при лечении раневого процесса будет способствовать улучшению микроциркуляции, снижению интенсивности гнойно-некротических процессов, а так же обеспечивать адекватный уровень местных иммунологических тканевых реакций.

Аппликационное применение раствора Кверцетина у 17 больных основной группы позволило получить abortивное течение воспалительного процесса в области послеоперационной раны. Эффект от применения препарата наблюдали уже с первых суток его использования. Уменьшался отек, гиперемия кожи в области краев раны, стихали боли. К 4-м суткам плотность тканей, окружающих рану, заметно уменьшалась, температура нормализовалась, боли практически не беспокоили. К 6-м суткам инфильтрат в области раны едва опреде-

лялся. Эти результаты расценены как хорошие. В 3-х наблюдениях признаки инфильтрации краев раны сохранялись до момента выписки (7-9 сутки), однако нагноения ран в этой группе не наблюдали. Результат расценен как плохой. У всех больных группы сравнения на протяжении наблюдения в клинике до 8-10 суток несмотря на проводимое лечение инфильтрация тканей в области послеоперационной раны сохранялась.

Выводы

1. Кверцетин, являясь ингибитором биосинтеза лейкотриенов, модулятором клеточных реакций иммунитета; обладает патогенетически обоснованным противовоспалительным действием, что позволяет предложить его использование в комплексном лечении раневой хирургической инфекции.

2. Полученный положительный эффект антилейкотриеновой терапии Кверцетином в лечении воспалительных инфильтратов позволяет рекомендовать предложенный способ для использования в клинике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дослідження токсичних та протизапальних властивостей композиції на основі аміноцукрів-похідних глюкозаміну та флавоноїду кверцетину / І. А. Зупанець, С. Б. Попов, В. Ф. Усенко, І. А. Отрішко // Клінічна фармація.— 2009. — С. 50–53.
2. Кухарь В. П. Химия биорегулярных процессов / В. П. Кухарь, А. О. Луйк А.О. — К.: «Наукова думка», 1991.— 368 с.
3. Corey E. J. Chemical studies on slow reacting substances leukotrienis / E. J. Corey // Experientia.— 1982.— Vol. 38, № 11.— P. 1259–1275.

КВЕРЦЕТИН ЯК
ІНГІБІТОР БІОСИНТЕЗУ
ЛЕЙКОТРИЄНІВ
У КОМПЛЕКСНОМУ
ЛІКУВАННІ
ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНИХ
ХІРУРГІЧНИХ
УСКЛАДНЕНЬ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-
КЛІНІЧНЕ
ОБґРУНТУВАННЯ)

*В. І. Бугайов, В. В. Леонов,
Л. Г. Кащенко*

Резюме. Досліджені деякі механізми впливу Кверцетину на біосинтез лейкотриєну C₄ у поліморфоядерних лейкоцитах донорської крові людини, хемотаксис і хемокінез нейтрофілів шурів та реакцію розеткоутворення Т-лімфоцитів у експерименті.

Показано, що Кверцетин комплексно впливає на клітинні процеси які визначають гіперергічний компонент загальної реакції запалення. Протизапальна дія Кверцетину дає можливість використовувати його у комплексному лікуванні раневої хірургічної інфекції.

Ключові слова: лейкотрієни, кверцетин, післяопераційні рани, ускладнення.

QUERCETIN AS AN
INHIBITOR OF THE
BIOSYNTHESIS OF
LEUKOTRIENES IN
TREATMENT OF
POSTOPERATIVE
SURGICAL COMPLICATIONS
(EXPERIMENTALLY-
CLINICAL
SUBSTANTIATION)

*V. I. Bugaev, V. V. Leonov,
L. G. Kashenko*

Summary. We studied the influence of some mechanisms of quercetin on the biosynthesis of leukotriene C₄ in polymorphonuclear leukocytes in human blood donor, chemotaxis and chemokinesis of neutrophils and rat reaction rosette T-lymphocytes in the experiment. It has been shown that quercetin affects cellular processes which define the hyperergic component of overall reaction inflammation. Anti-inflammatory effects of quercetin makes it possible to use it in treatment of surgical wound infection.

Key words: leukotrienes, Quercetin, postoperative wound complications.