

Дослідження впливу комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну на біохімічні показники тварин за умов нейрогенного ушкодження міокарда

Ель Аараж Ахмад, І.А.Зупанець, О.О.Тарасенко

Національний фармацевтичний університет
Харків, Україна

У статті наведено результати вивчення впливу комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну на біохімічні показники щурів за умов розвитку алкогольно-фуразолідонової кардіоміопатії. У ході дослідження виявлено різке зниження маркерів цитолізу кардіоміоцитів під впливом дослідної комбінації, зменшення вмісту ТБК-реактивних у сироватці крові й гомогенаті міокарда та нормалізацію показників обміну ендогенного N-ацетилглюкозаміну, що говорить про зниження інтенсивності запально-деструктивних та вільнорадикальних процесів у міокарді. При цьому за ступенем впливу дослідна комбінація вірогідно перевершувала активність своїх монокомпонентів. Аналіз отриманих результатів свідчить про виражену антицитолітичну, антиоксидантну та мембранопротекторну дію дослідної комбінації, що дозволяє її розглядати як перспективний кардіопротекторний засіб.

Ключові слова: глюкозаміну гідро хлорид, N-ацетилглюкозамін, кверцетин, алкогольно-фуразолідонова кардіоміопатія; кардіопротекторна дія.

ВСТУП

У прогресуванні ішемічної хвороби серця важливе значення мають процеси ремоделювання міокарда, що призводять до розвитку дисфункції лівого шлуночка. Ішемічне ремоделювання лівого шлуночка може розвивається як внаслідок загибелі кардіоміоцитів при інфаркті міокарда [13], так і бути результатом впливу гострої та хронічної ішемії [1].

Одним із механізмів пошкодження кардіоміоцитів в умовах ішемії є порушення їх мембранних структур внаслідок перекисного окислення

ліпідів (ПОЛ). Продукти ПОЛ відіграють ключову роль в ушкодженні ендотелію та активації запальних реакцій [6], стимулюють експресію цитокинів T-лімфоцитами та макрофагами, здатні інгібувати ендотелій-залежну релаксацію судин та викликати вазоконстрикторні реакції [18].

Природним флавоноїдом, що володіє вираженою антиоксидантною активністю є кверцетин. Він має виражені антирадикальні, мембраностабілізуючі властивості [15], чинить антиагрегантну дію [17], попереджає підвищення рівня калію усередині клітин, має вазопротекторний вплив, пов'язаний зі здатністю вивільняти оксид азоту та інгібувати протеїназу [14] і, як наслідок, має виражену кардіопротекторну активність [7].

В аспекті підвищення кардіопротекторної ефективності кверцетину певний інтерес представляє аміноцукор глюкозамін. Він входить до складу структурних компонентів клітинних мембран, що має вагомe значення в забезпеченні механічної стійкості і пластичності клітин і, зокрема, кардіоміоцитів, а також має здатність нейтралізувати вільні радикали і окисні агенти, кількість яких підвищується в умовах ішемії [2]. У ряді експериментальних досліджень доведено наявність у глюкозаміну кардіопротекторної активності, яка обумовлена мембраностабілізуючою та антиферментною дією [11]. Наявність широкого спектру фармакологічної дії, в основі якого лежать загальні протекторні властивості та здатність глюкозаміну підвищувати біодоступність кверцетину при пероральному прийомі [8], дозволяє припустити можливість його синергічної дії з кверцетином.

Метою представленого дослідження стало експериментальне вивчення динаміки біохімічних показників щурів під впливом комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну — глюкозаміну гідрохлоридом та N-ацетилглюкозаміном за умов розвитку нейрогенного ураження міокарда.

ТАБЛИЦЯ 1

Вплив експериментальної терапії на показники цитолізу в сироватці крові щурів з АФКМП, n=50

Умови досліджу	КФК-МВ, мккат/л	АсАТ, мккат/л	ЛДГ, мккат/л
Інтактний контроль (n=10)	0,43±0,02	0,55±0,03	5,76±0,28
Контрольна патологія (n=10)	1,57±0,08 *	1,15±0,06 *	10,89±0,53 *
Дослідна комбінація (n=10)	0,75±0,04 **	0,72±0,03 **	7,13±0,35 **
Суміш аміноцукрів (n=10)	1,27±0,06 **	0,87±0,04 **	8,27±0,40 **
Кверцетин (n=10)	1,42±0,07 **	0,95±0,05 **	9,09±0,44 **

Примітки: * – відмінності вірогідні відносно інтактних тварин ($p \leq 0,05$); ** – відмінності вірогідні відносно групи контрольної патології ($p \leq 0,05$); *** – відмінності вірогідні відносно тварин, що отримували комбінацію кверцетину з похідними глюкозаміну ($p \leq 0,05$).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальне дослідження виконано на 50 білих нелінійних щурах-самцях масою 180 ± 10 г, що утримувались у віварії Національного фармацевтичного університету (м. Харків) згідно зі стандартними санітарними вимогами. Всі експерименти були виконані відповідно до правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються у експериментальних і інших наукових цілях» [16].

Всі тварини розподілялись на 5 дослідних груп по 10 тварин: 1 група – інтактний контроль; 2 група – контрольна патологія; 3 група – тварини, що отримували комбінацію кверцетину з аміноцукрами в умовно-терапевтичній дозі 81,9 мг/кг [3]; 4 група – тварини, що отримували суміш аміноцукрів (глюкозаміну гідрохлорид та N-ацетилглюкозамін 1:1) в дозі 61,4 мг/кг (еквівалентно вмісту у дослідній комбінації); 5 група – тварини, яким вводили кверцетин у дозі 20,5 мг/кг (еквівалентно вмісту у дослідній комбінації).

В якості моделі нейрогенного ушкодження міокарда було обрано алкогольно-фуразолідонову кардіоміопатію (АФКМП) у щурів, яку викликали внутрішньошлунковим введенням етанолу в дозі 0,8 мл/кг (30% водний розчин) та фуразолідону в дозі 200 мг/кг за 1 год. до введення етанолу [10, 11]. Всі досліджувані об'єкти тваринам вводили щоденно внутрішньошлунково, починаючи за 1 год. до відтворення патології, і далі протягом 4 діб.

На 5-ту добу дослідження у сироватці крові щурів визначали рівень маркерів цитолізу – КФК-МВ, АсАТ та ЛДГ [5]; інтенсивність вільнорадикальних процесів оцінювали за вмістом у сироватці крові та гомогенаті міокарда ТБК-реактивних [12]. Крім того, з метою оцінки ступеня деструкції міокарда визначали вміст ендогенного N-ацетилглюкозаміну (N-ацГА) у крові та гомогенаті серцевої тканини [4].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера-Ст'юдента та непараметричних методів аналізу [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відображенням порушення структури кардіоміоцитів і проникності клітинних мембран міокарда у тварин з АФКМП був розвиток гіперферментемії. По закінченні дослідження рівні КФК-МВ, АсАТ і ЛДГ були достовірно вище у всіх групах тварин щодо інтактного контролю (табл. 1).

Функціональний стан кардіоміоцитів у тварин лікованих груп характеризувався достовірно менш вираженим рівнем ферментемії в порівнянні з групою контрольної патології. Досліджувані речовини та їх комбінація відрізнялися лише за ступенем впливу на рівень гіперферментемії. Найбільший ефект у відношенні відновлення цілісності клітинних мембран був досягнутий при використанні досліджуваної комбінації. При цьому вміст у сироватці крові КФК-МВ, АсАТ і ЛДГ було в 2,1; 1,6 і 1,5 рази нижче ніж в групі нелікованих тварин. Введення тваринам суміші аміноцукрів і кверцетину у вигляді монотерапії сприяло зниженню КФК-МВ в 1,2 і 1,1 рази, а АсАТ – в 1,3 і 1,2 рази відповідно. Вміст ЛДГ також зменшувався в 1,3 і 1,2 рази відповідно. Слід зазначити, що зниження маркерів цитолізу при окремому використанні аміноцукрів і кверцетину було достовірно більш низьким ніж при використанні їх комбінації (табл. 1).

Статистично значуще збільшення рівня ТБК-реактивних у сироватці крові в 1,4 рази та тканині міокарда в 1,8 рази у щурів з АФКМП безсумнівно свідчить про порушення окислювально-відновного балансу в міокарді при його нейрогенному ураженні (табл. 2). На фоні за-

ТАБЛИЦЯ 2

Вплив експериментальної терапії на вміст ТБК-реактантів у щурів з АФКМП, n=50

Умови досліджу	ТБК-реактанти	
	сироватка крові, мкмоль/л	тканина міокарда, мкмоль/г
Інтактний контроль (n=10)	2,53±0,08	85,49±2,81
Контрольна патологія (n=10)	3,55±0,12 *	157,73±5,19 *
Дослідна комбінація (n=10)	2,77±0,09 **	102,53±3,37 * ^{***}
Суміш аміноцукрів (n=10)	3,36±0,11 * ^{***}	143,50±4,72 * ^{***}
Кверцетин (n=10)	3,07±0,10 * ^{***}	112,64±3,71 * ^{***}

Примітки: * – відмінності вірогідні відносно інтактних тварин ($p \leq 0,05$); ** – відмінності вірогідні відносно групи контрольної патології ($p \leq 0,05$); *** – відмінності вірогідні відносно тварин, що отримували комбінацію кверцетину з похідними глюкозаміну ($p \leq 0,05$).

стосування дослідної комбінації вміст ТБК-реактантів в сироватці крові достовірно не відрізнявся від значень в групі інтактного контролю. Рівень цього показника в тканині міокарда виявився підвищеним в 1,2 рази відносно інтактного, але був достовірно нижчим порівняно з групою контрольної патології.

Під впливом суміші аміноцукрів рівень ТБК-реактантів в сироватці крові та тканині міокарда щурів був статистично нижчим порівняно з тваринами контрольної патології, проте був достовірно вищим ніж в інтактній групі та у тварин, що отримували дослідну комбінацію. При застосуванні кверцетину відбувалось зменшення процесів ПОЛ у міокарді. Наприкінці дослідження вміст ТБК-реактантів в тканині міокарда під впливом кверцетину не мав статистичних відмінностей від значення цього показника в групі тварин, яка отримувала дослідну комбінацію.

Оксидативна атака кардіоміоцитів призводить спочатку до поступового підвищення проникності мембран з подальшим порушенням фосфоліпідів і появою дефектів. Оскільки ендogenousний N-ацГА входить до структур клітинних мембран, цілком закономірним є підвищення його в сироватці крові при ураженні кардіоміоцитів. У ході дослідження встановлено достовірне зниження вмісту N-ацГА в тканині міокарда в 1,7 рази та підвищення концентрації загального N-ацГА у сироватці крові в 1,2 рази за рахунок зв'язаної фракції у тварин з АФКМП порівняно з інтактним контролем (табл. 3).

Застосування всіх досліджуваних об'єктів сприяло збереженню вмісту N-ацГА в міокарді, що в найбільшому ступені було виражено при використанні дослідної комбінації. Під її впливом рівень N-ацГА в гомогенаті серцевої тканини збільшувався в 1,6 рази та наближався до інтактних значень. При цьому за ступенем по-

зитивного впливу на даний показник дослідна комбінація вірогідно перевищувала активність своїх монокомпонентів.

Більш детальний аналіз показників обміну ендogenousного N-ацГА відображає особливості впливу експериментального лікування на співвідношення його фракцій. Відомо, що при руйнуванні мембран кардіоміоцитів у крові збільшується зв'язана фракція N-ацГА. У такому разі вільна частина N-ацГА витрачається як пластичний матеріал для відновлення ушкоджених мембран клітин, що відбивається в зниженні її вмісту в сироватці крові та збільшенні співвідношення зв'язаної та вільної фракцій аміноцукру.

Збільшення вмісту загального N-ацГА при застосуванні дослідної комбінації відбувалось переважно за рахунок вільної фракції аміноцукру. В цілому комбіноване застосування кверцетину та аміноцукрів чинило нормалізуючий вплив на вміст ендogenousного N-ацГА, що підтверджувалось вірогідними розбіжностями з групою контрольної патології та наближенням показників до інтактних значень. Співвідношення фракцій аміноцукру в даній групі дорівнювало 3.

Під впливом суміші аміноцукрів показник зв'язаної фракції N-ацГА в 1,2 рази перевищував інтактний рівень та в стільки ж разів виявився меншим за показник групи контрольної патології. Вільна фракція, навпаки, в 1,4 рази перевершувала значення групи контрольної патології та вірогідно не відрізнялась від даних інтактного контролю. Співвідношення фракцій аміноцукру в даній групі дорівнювало 3,7.

При застосуванні кверцетину вміст зв'язаної фракції практично не відрізнявся від групи контрольної патології та вірогідно перевищував показники в групах інтактного контролю та дослідної комбінації. Концентрація вільної фракції виявилась найменшою серед всіх груп тварин, що отримували лікування. Співвідношення фракцій N-ацГА в даній групі дорівнювало 5.

ТАБЛИЦЯ 3

Вплив експериментальної терапії на показники обміну ендogenous N-ацетилглюкозаміну у щурів з АФКМП, n=50

Умови досліджу	Вміст ендogenous N-ацетилглюкозаміну			
	сироватка крові, ммоль/л			гомогенат міокарда, мг/г
	загальний	зв'язаний	вільний	
Інтактний контроль (n=10)	7,14±0,23	5,28±0,17	1,86±0,06	0,175±0,006
Контрольна патологія (n=10)	8,69±0,29 *	7,46±0,25 *	1,22±0,04 *	0,102±0,003 *
Дослідна комбінація (n=10)	8,25±0,27 *	6,18±0,20 **,	2,06±0,07 **,	0,166±0,005 **,
Суміш аміноцукрів (n=10)	8,09±0,27 *	6,38±0,21 **,	1,70±0,06 **,	0,145±0,005 **,
Кверцетин (n=10)	8,35±0,27 ¹	6,96±0,23 ^{1,3}	1,38±0,05 ^{1,2,3}	0,123±0,004 ^{1,2,3}

Примітки: * – відмінності вірогідні відносно інтактних тварин (p≤0,05); ** – відмінності вірогідні відносно групи контрольної патології (p≤0,05); *** – відмінності вірогідні відносно тварин, що отримували комбінацію кверцетину з похідними глюкозаміну (p≤0,05).

Отримані результати демонструють, що найбільш значущий нормалізуючий вплив на обмін ендogenous N-ацГА чинить дослідна комбінація, що підтверджується збереженням аміноцукру в тканині міокарда та зменшенням співвідношення зв'язаної та вільної фракцій N-ацГА. Збереження стабільності концентрації ендogenous N-ацГА є основою для реалізації захисного механізму, що оберігає клітини від оксидативного стресу.

Таким чином, результати представленого дослідження свідчать про виражену антициклітичну, антиоксидантну та мембранопротекторну дію комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну за умов розвитку у щурів ураження міокарда нейрогенного генезу. Даний спектр фармакологічної активності в цілому обумовлює виражену кардіопротекторну дію, що дозволяє вважати дослідну комбінацію перспективним засобом для використання у комплексній терапії пацієнтів із запально-деструктивними та ішемічними захворюваннями міокарда.

ВИСНОВКИ

1. За умов розвитку нейрогенного ураження міокарда у щурів комбінація кверцетину з похідними глюкозаміну вірогідно знижує рівень ферментемії, нормалізує вміст ТБК-реактивних та показників обміну ендogenous N-ацетилглюкозаміну і, отже, чинить антициклітичну, антиоксидантну та мембранопротекторну дію, що в цілому обумовлює її виражений кардіопротекторний вплив.

2. За ступенем кардіопротекторної активності дослідна комбінація вірогідно перевершує дію своїх монокомпонентів – кверцетину та суміші глюкозаміну гідрохлориду з N-ацетилглюкозаміном.

ЛІТЕРАТУРА

- Бобров В.О. Адаптаційні ішемічні та реперфузійні синдроми у хворих ішемічною хворобою серця: механізми, діагностика, обґрунтування терапії / В.О.Бобров, С.К.Кулішов. – Полтава: Дивосвіт, 2004. – 240 с.
- Вивчення гепатопротекторної та антиоксидантної активностей глюкозаміна гідрохлориду та його похідних при гострому ураженні печінки тетрахлорметаном / С.В.Місюрьова, І.А.Зупанець, С.Г.Ісаєв [та ін.] // Вісник фармації. – 2002. – №3 (31). – С. 74-77.
- Ель Аараж Ахмад Вплив комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну на перебіг доксорубіцинової кардіоміопатії у щурів / Ахмад Ель Аараж, І.А.Зупанець, С.К.Шебеко, І.А.Отрішко // Клінічна фармація. – 2012. – Т.16, №3. – С. 24-27.
- Зупанець І.А. Уніфікація методів кількісного визначення ендogenous глюкозаміну в біологічному матеріалі / І.А.Зупанець, С.К.Шебеко // Фармаком. – 2005. – №4. – С. 56-61.
- Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справ. в 2 т. – Т.1 / В.С.Камышников. – 2-е изд. – Мн.: Интерпрессервис, 2003. – 495 с.; Т.2. – 463 с.
- Марков Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия / Х.М.Марков // Кардиология. – 2005. – №12. – С. 62-72.
- Мойбенко А.А. Патогенетическое обоснование эффективности нового отечественного кардиопротектора корвитина (водорастворимого кверцетина) при остром инфаркте миокарда / А.А.Мойбенко // Вісник фармакології та фармації. – 2007. – №5. – С. 38-47.
- Порівняльне вивчення фармакокінетики кверцетину та його композицій з аміноцукрами – похідними глюкозаміну / К.О.Зупанець, С.К.Шебеко, Ю.В.Підпруджников [та ін.] // Медична хімія. – 2010. – Т.12, №3 (44). – С. 81-86.
- Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю.Реброва. – 3-е изд. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.

10. Семенов А.Н. Изучение кардиопротекторных свойств нестероидных противовоспалительных средств в ряду производных D-(+)-глюкозамина: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25 / А.Н.Семенов. — Купавна, 2001. — 26 с.
11. Семенов А.Н. Электронно-микроскопическое изучение кардиопротекторного действия производных D-(+)-глюкозамина при фуразолидоново-алкогольной кардиомиопатии у белых крыс / А.Н.Семенов // Український морфологічний альманах. — 2010. — Т.8, №2. — С. 185-188.
12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. — В кн.: Современные методы в биохимии / И.Д.Стальная, Т.Г.Гаришвили. — М.: Медицина, 1977. — С. 44-46.
13. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins in patients with stable angina, unstable angina or peripheral vascular disease: pathophysiological implication / C.Monaco, F.Crea, G.Niccoli [et al.] // European Heart Journal. — 2000. — Vol. 22. — P. 1572-1577.
14. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats / A.I.Morales, C.Vicente-Sánchez, M.Jerkic [et al.] // Toxicology & Applied Pharmacology. — 2006. — Vol. 210. — P. 128-135.
15. Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats / M.Galisteo, M.F.García-Saura, R.Jiménez [et al.] // Molecular & Cellular Biochemistry. — 2004. — Vol. 259. — P. 91-99.
16. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. — Strasbourg, 1986. — 52 p.
17. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A₂ receptor / J.A.Guerrero, M.L.Lozano, J.Castillo [et al.] // Journal of Thrombosis & Haemostasis. — 2005. — Vol. 3. — P. 369-376.
18. Wu R. Autoantiboder against oxidized low density lipoproteins: characteriration of antibody isotype, subclass, affinity and effect on the macrophage uptake of oxLDL / R.Wu, A. K.LefVer // Clinical & Experimental Immunology. — 1995. — Vol. 102. — P. 174-180.

Эль Аараж Ахмад, И.А.Зупанец, О.А.Тарасенко. Исследование влияния комбинации кверцетина с производными глюкозамина на биохимические показатели животных в условиях нейрогенного поражения миокарда. Харьков, Украина.

Ключевые слова: глюкозамина гидрохлорид, N-ацетилглюкозамин, кверцетин, алкогольно-фуразолидоновая кардиомиопатия, кардиопротекторное действие.

В статье представлены результаты изучения влияния комбинации кверцетина с производными глюкозамина на биохимические показатели крыс в условиях развития алкогольно-фуразолидоновой кардиомиопатии. В ходе исследования было обнаружено резкое снижение маркеров цитолиза кардиомиоцитов под влиянием исследуемой комбинации, уменьшение содержания ТБК-реактантов в сыворотке крови и гомогенате миокарда и нормализация показателей обмена эндогенного N-ацетилглюкозамина, что говорит о снижении интенсивности воспалительно-деструктивных и свободнорадикальных процессов в миокарде. При этом по степени воздействия исследуемая комбинация достоверно превосходила активность своих монокомпонентов. Анализ полученных результатов свидетельствует о выраженном антицитолитическом, антиоксидантном и мембранопротекторном действии исследуемой комбинации, что позволяет ее рассматривать как перспективное кардиопротекторное средство.

El Aarage Ahmad, I.A.Zupanets, O.O.Tarasenko. The investigation of effect of quercetin combination with glucosamine derivatives on biochemical parameters of animals in neurogenic myocardial lesion conditions. Kharkiv, Ukraine.

Key words: glucosamine hydrochloride, N-acetylglucosamine, quercetine, alcohol-furasolidone cardiomyopathy, cardioprotective action.

In this article the results of influence of combination of quercetine with glucosamine derivatives on biochemical parameters of rats having alcohol-furasolidone cardiomyopathy are given. The study reveals a sharp decrease of the markers of the cardiomyocyt's cytolysis under the influence of the studied combination, the reduction of the TBA-reactants content in blood serum and myocardial homogenate and normalization of endogenous N-acetylglucosamine exchange that indicates reduction of the intensity of inflammatory-destructive and free radical processes in the myocardium. Herewith the degree of influence of the investigated combination was significantly superior to the activity of their monocomponents. Analysis of the obtained results shows pronounced anticytolytic, antioxidant and membrane-protective action of the investigated combination that allows considering it as a perspective cardioprotective drug.

Надійшла до редакції 12.08.2012 р.