

ВІЙСЬКОВА ХІРУРГІЯ, АНЕСТЕЗІОЛОГІЯ ТА ІНТЕНСИВНА ТЕРАПІЯ

УДК 612.592 + 614.873.23: 615.015.21 + 616-092.9

ВИВЧЕННЯ АДАПТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ КВЕРЦЕТИНУ ЗА УМОВ ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ У ЩУРІВ

Г.П. Хитрий, Н.І. Горбенко, А.С. Шаламай

Українська військово-медична академія

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології

ім. В.Я. Данилевського АМН України»,

НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод»

Резюме. Досліджено адаптогенні властивості квертину та його комбінації з корвітином за умов холодового стресу у щурів. Встановлено, що профілактичне застосування квертину запобігає порушенню прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу після гіпотермії у щурів. Додаткове введення корвітину після переохолодження не призводить до підвищення антиоксидантної дії квертину. Профілактично-терапевтичне застосування препаратів порівняння – силібору в комбінації з пентоксифіліном супроводжується посиленням оксидативного стресу, та в 35% випадків викликає загибель тварин після переохолодження.

Отримані результати обґрунтовують доцільність профілактичного застосування квертину для підвищення адаптогенних можливостей організму за умов гіпотермії.

Ключові слова: холодовий стрес, оксидативний статус, квертин, корвітин.

Вступ. Організм людини постійно піддається дії екстремальних чинників зовнішнього середовища (гіпертермія, гіпотермія, гіпоксія та ін.), які будучи найбільш важливими індукторами стресу, призводять до зміни функціонального стану організму, а також впливають на субклітинні структури і сприяють активації процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [1, 2]. Зокрема, глибока гіпотермія внаслідок

виникаючого оксидативного стресу супроводжується зміщенням балансу у бік надлишкової генерації вільних радикалів і виникненням дефіциту антиоксидантів, що, у свою чергу, істотно впливає на хімічний склад біологічних мембран, їх ультраструктурну організацію, проникність та активність мембранних ферментів [3].

Стресова дія гіпотермії (холодовий стрес) супроводжується не лише зміною функціонального стану (насамперед теплового), але призводить також до патологічних змін в організмі, а при надмірному переохолодженні – навіть до летального наслідку (Воронин Н.М., 1981; Тарасова Л.А. и соавт., 1994; Афанасьєва Р.Ф., Бурмистрова О.В., 2001).

Виходячи з того, що оксидативний стрес може бути патогенетичним механізмом різноманітних ускладнень за умов переохолодження, особливу увагу привертає можливість профілактичного використання антиоксидантів у осіб, професійна діяльність яких пов'язана з високим ризиком гіпотермії. В якості антиоксидантів раніше в експерименті вивчалися такі препарати, як кверцетин [4], алантон [5], альтан, елгацин, силібор [6] та ін. Також було показано, що введення L-аргініну безпосередньо перед охолодженням знижує активність процесів ПОЛ крові і тканин при гіпотермії у щурів [7].

Антистресорний ефект антиоксидантів в умовах попереднього їх введення виражений при різних видах стресу у лабораторних тварин і людини та супроводжується істотним ослабленням ступеня мобілізації стрес-реалізуючих систем і продукції відповідних гуморальних продуктів. Ці дані суттєво підкріплюють уявлення про сигнальну роль стресової активації ПОЛ і блокаду цієї ланки механізму стресу як шляху реалізації стрес-протекторного ефекту антиоксидантів [8, 9].

В умовах, коли неможливо запобігти стресу, необхідно підвищити адаптаційні можливості організму, зокрема, за рахунок посилення антиоксидантної системи захисту і, відповідно, послаблення реакції стрес-реалізуючих систем, тобто підвищити поріг, після якого стрес починає індукувати деструктивні процеси.

В зв'язку з цим перспективним може бути використання препаратів, що містять рослинний флавоноїд – кверцетин. Антиоксидантний ефект кверцетину може бути результатом як

безпосереднього відновлення радикалів \pm -токоферолу, редокс-взаємодії з аскорбатом та реактивними формами кисню і нітрогену, так і опосередкований через активацію транскрипційного фактора Nrf 1/2, що регулює синтез ферментів антиоксидантного захисту [10, 11].

Метою даної роботи було вивчення адаптогенних властивостей препаратів на основі кверцетину – квертину та корвітину за умов холодного стресу у щурів.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводилось на щурах-самцях лінії Wistar 4-місячного віку. Гострий холодний вплив моделювали шляхом занурення тварин у воду при температурі 2-3 $^{\circ}$ C протягом 5 хв. Після цього тварин поміщали у сухі клітки при кімнатній температурі (19-20 $^{\circ}$ C) без додаткового їх зігрівання.

Препарати квертин («Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Київ) та силібор («Здоров'я», Харків) починали вводити за 2 доби до індукції гіпотермії перорально за допомогою зонду у вигляді водної суспензії в дозі 50 мг кверцетину або силібініну, відповідно, на кг маси тіла. Препарати корвітин («Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Київ) та пентоксифілін («Дарниця», Київ) вводили внутрішньочеревинно в дозі 100 мг/кг відразу після загального переохолодження. Було сформовано 5 груп тварин (по 8 щурів у кожній):

1. Інтактний контроль
2. Гіпотермія+плацебо
3. Гіпотермія+квертин
4. Гіпотермія+квертин+корвітин
5. Гіпотермія+силібор+пентоксифілін.

Зовнішню і ректальну температуру у тварин контролювали 2-х каналним температурним монітором „Mon-a-therm” 6500 перед охолодженням, через 5, 15 та 180 хвилин після занурення щурів у холодну воду.

Через 3 години після індукції гіпотермії тварин знеживлювали шляхом декапітації під легким ефірним наркозом. Виразність оксидативного стресу оцінювали за рівнем дієнових кон'югатів (ДК) [12] у сироватці крові та гомогенаті печінки, рівнем малонового діальдегіду (МДА) [13] у гомогенаті печінки та рівнем гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) [14] в сироватці крові. Стан антиоксидантної системи

захисту в печінці та сироватці крові характеризували за вмістом відновленого глутатіону (ВГ) [15], а також за активністю ферментів – супероксиддисмутази (СОД) та каталази [16].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA, для множинного порівняння використовували критерій Н'юмена-Кейлса [17].

Результати дослідження та їх обговорення. В результаті проведеного дослідження були отримані наступні дані.

Аналіз показників термометрії показав, що перебування тварин протягом 5 хвилин у воді при $t = 2-3\text{eC}$ призводить до зниження внутрішньої температури тіла на 39% ($p < 0,05$) та зовнішньої температури тіла на 24% ($p < 0,05$). Введення препаратів не впливало на ступінь переохолодження в жодній з дослідних груп, підтвердженням чому була відсутність достовірних змін в градієнті як зовнішньої, так і внутрішньої температури тіла (табл. 1, 2).

Через 15 хвилин після переохолодження спостерігали достовірне зростання внутрішньої та зовнішньої температури тіла, які через 3 години досягали початкових значень (див. табл. 1, 2). Відсутність різниці між експериментальними групами в цих проміжках часу свідчить про те, що досліджені препарати не впливають на процеси термогенезу у тварин після переохолодження.

Таблиця 1

Динаміка внутрішньої температури тіла (eC) у щурів протягом 3 годин після переохолодження, ($X \pm S$, $n = 5-8$)

Групи	Вихідний рівень	Через 5 хв	Через 15 хв	Через 180 хв
Інтактний контроль	38,61±0,17	38,61±0,17	38,61±0,17	38,61±0,17
Гіпотермія + Плацебо	38,71±0,13	23,91±0,71 ^{a,1}	26,63±0,75 ^{a,1,2}	36,81±1,13 ^{2,3}
Гіпотермія + Квертин	38,39±0,20	23,79±0,78 ^{a,1}	26,46±0,89 ^{a,1,2}	38,29±0,30 ^{2,3}
Гіпотермія + Квертин + Корвітин	38,39±0,30	24,06±1,02 ^{a,1}	25,90±1,34 ^{a,1,2}	37,13±1,07 ^{2,3}
Гіпотермія + Силібор + Пентоксифілін	38,51±0,22	24,33±0,82 ^{a,1}	26,03±1,01 ^{a,1,2}	37,00±0,48 ^{2,3}

^a — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками для групи «контроль», $p < 0,05$;

^b — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками для групи «гіпотермія», $p < 0,05$;

¹ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками базальної температури, $p < 0,05$;

² — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками температури через 5 хв, $p < 0,05$;

³ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками температури через 15 хв, $p < 0,05$.

Динаміка зовнішньої температури тіла (°C) у щурів протягом 3 годин після переохолодження, ($X \pm S_x$, $n = 5-8$)

Групи	Вихідний рівень	Через 5 хв	Через 15 хв	Через 180 хв
Інтактний контроль	29,67±0,74	29,67±0,74	29,67±0,74	29,67±0,74
Гіпотермія + Плацебо	30,26±0,82	23,11±1,77 ^{a,1}	27,14±1,12 ^{a,1,2}	29,46±0,62 ^{2,3}
Гіпотермія + Квертин	30,53±0,50	22,58±0,62 ^{a,1}	27,56±0,91 ^{a,1,2}	29,56±0,40 ^{2,3}
Гіпотермія + Квертин + Корвітин	30,84±0,33	23,80±1,56 ^{a,1}	26,44±1,43 ^{a,1,2}	29,45±0,59 ^{2,3}
Гіпотермія + Силібор + Пентоксифілін	30,31±0,54	23,01±1,14 ^{a,1}	27,02±0,60 ^{a,1,2}	29,72±0,28 ^{2,3}

^a — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками для групи «контроль», $p < 0,05$;

^b — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками для групи «гіпотермія», $p < 0,05$;

¹ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками базальної температури, $p < 0,05$;

² — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками температури через 5 хв, $p < 0,05$;

³ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками температури через 15 хв, $p < 0,05$.

Слід зазначити, що в групі тварин, які отримували силібор та пентоксифілін, відразу після переохолодження загинуло три тварини з восьми, що складає 35%. В той же час в інших групах, які піддавалися гіпотермії, летальних випадків не спостерігали. Висока смертність в даній групі може пояснюватися посиленням гіпотонії, яка супроводжує тяжке переохолодження, за умов введення пентоксифіліну. Останньому, як відомо, притаманна висока гіпотонічна активність [18]. Також не можна виключати можливої негативної дії силібору або комбінованого ефекту препаратів за цих умов, що потребує подальшого вивчення.

При аналізі показників оксидативного статусу щурів, які перенесли гіпотермію (група «гіпотермія + плацебо»), встановлено, що рівень ВГ та активність СОД в сироватці крові були знижені у порівнянні з групою інтактного контролю відповідно на 37% і 49% ($p < 0,05$). При оцінці концентрації ДК і ГПЛ достовірної різниці між цими групами не відмічено. Активність каталази не змінювалася в жодній з експериментальних груп (див. табл. 3).

У тварин, які отримували квертин або квертин в комбінації з корвітином, спостерігали нормалізацію концентрації ВГ та активності СОД в сироватці крові експериментальних тварин.

Показники оксидативного статусу в сироватці крові щурів через 3 години після переохолодження, ($X \pm S_x$, $n = 5-8$)

Показники	Інтактний контроль	Гіпотермія + Плацебо	Гіпотермія + Квертин	Гіпотермія + Квертин + Корвітин	Гіпотермія + Силібор + Пентоксифілін
ДК, ммоль/л	2,50±0,43	2,40±0,46	2,17±0,35	2,11±0,24	2,29±0,33
ГПЛ, ммоль/л	9,53±1,24	10,58±1,44	11,22±1,50	11,78±1,19	28,30±2,83 ^{a, b, 1}
ВГ, мкмоль/л	69,27±5,34	43,75±4,31 ^a	62,50±3,05 ^b	64,58±6,20 ^b	71,67±5,65 ^b
Каталаза, ммоль/хв/л	5,26±0,39	5,40±0,49	4,49±0,47	5,64±0,35	5,38±0,82
СОД, у.о./мл	18,94±2,20	9,66±0,51 ^a	18,88±2,63 ^b	18,93±3,44 ^b	12,76±1,20 ^{a, 1}

^a – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками для групи «контроль», $p < 0,05$;

^b – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками для групи «гіпотермія», $p < 0,05$;

¹ – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками для груп «гіпотермія+квертин» і «гіпотермія+квертин+корвітин», $p < 0,05$.

Слід зазначити, що застосування препарату порівняння – силібору в комбінації з пентоксифіліном не запобігало зниженню активності СОД, але сприяло збереженню пула відновленого глутатіону (див. табл. 3). Привертає увагу той факт, що у тварин із групи «силібор + пентоксифілін» спостерігалось значне збільшення (в 3 рази) вмісту ГПЛ в сироватці крові. Враховуючи високу смертність тварин в даній групі, можна припустити, що використання даної комбінації препаратів в обраних дозах призводить не до зниження оксидативного стресу, а навпаки – до його індукції через збільшення вмісту прооксидантів, що спричиняє посилення деструктивних процесів в організмі за умов гіпотермії.

Показано, що переохолодження також супроводжується зниженням активності СОД на 42% ($p < 0,05$) в гомогенаті печінки, на тлі незмінного рівня продуктів ПОЛ (табл. 4). Застосування препаратів на основі кверцетину, на відміну від референс-препаратів, запобігало зниженню активності СОД та сприяло підвищенню вмісту ВГ в печінці щурів після холодового стресу (див. табл. 4). Отриманий результат добре узгоджується з даними інших досліджень, в яких було показано, що навіть у інтактних тварин додаткове споживання кверцетину призводить до збільшення співвідношення відновлений/окислений глутатіон в печінці [19].

Показники оксидативного статусу в печінці щурів через 3 години після переохолодження, ($X \pm S_x$, $n = 5-8$)

Показники	Інтактний контроль	Гіпотермія + Плацебо	Гіпотермія + Квертин	Гіпотермія + Квертин + Корвітин	Гіпотермія + Силібор + Пентоксифілін
ДК, нмоль/мг білка	0,41±0,04	0,34±0,04	0,40±0,09	0,49±0,06	0,35±0,07
МДА, нмоль/мг білка	0,63±0,06	0,66±0,07	0,83±0,16	0,87±0,09	0,60±0,12 ¹
ВГ, нмоль/мг білка	15,06±0,87	18,16±1,11	31,21±2,14 ^{a, b}	31,12±5,40 ^{a, b}	15,87±2,67 ¹
Каталаза, мкмоль/хв/мг білка	109,00±11,70	91,20±5,24	101,02±5,35	106,64±11,92	101,12±12,57
СОД, у.о./мг білка	66,06±5,36	38,61±4,21 ^a	57,34±6,11 ^b	60,74±6,74 ^b	42,76±2,44 ^{a, 1}

^a — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками для групи «контроль», $p < 0,05$;

^b — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками для групи «гіпотермія», $p < 0,05$;

¹ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками для груп «гіпотермія+квертин» і «гіпотермія+квертин+корвітин», $p < 0,05$.

Таким чином, в результаті проведеного дослідження нами було встановлено, що уже на ранніх термінах після індукції гіпотермії (3 години) спостерігається початкова стадія порушення окисно-відновлювальної рівноваги, яка характеризується зниженням активності системи антиоксидантного захисту, але ще не супроводжується значним посиленням перекисного окислення ліпідів.

Результати нашого дослідження показують, що профілактичне застосування квертину супроводжується найменшим виснаженням антиоксидантної системи та запобігає порушенню прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, що може сприяти підвищенню адаптогенних можливостей організму за умов холодового стресу. Додаткове введення корвітину після переохолодження не призводить до посилення фармакологічної дії квертину.

Комбіноване використання силібору та пентоксифіліну призводить до індукції оксидативного стресу внаслідок збільшення вмісту прооксидантів. Наслідком цього є обмеження адаптаційних властивостей і зменшення витривалості щурів до дії ушкоджуючих чинників холодового стресу. В 35% випадків була констатована загибель тварин цієї групи після переохолодження.

Отримані результати обґрунтовують доцільність профілактичного застосування перорального препарату на основі кверцетину – квертину

для підвищення адаптогенних можливостей організму за умов гіпотермії. Проведення антиоксидантної профілактики за допомогою квертину зменшує з самого початку тяжкість холодового стресу, а значить і його тривалість, та дозволяє, на нашу думку, уникнути розвитку надмірного стресу – хвороби адаптації.

Висновки

1. Профілактичне застосування квертину запобігає порушенню прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу за умов холодового стресу у щурів.

2. Додаткове введення квертину після переохолодження не призводить до підвищення антиоксидантної дії квертину.

3. Профілактично-терапевтичне застосування препаратів порівняння – силібору в комбінації з пентоксифіліном супроводжується посиленням оксидативного стресу, та в 35% випадків викликає загибель тварин після перохолодження.

4. Отримані результати обґрунтовують доцільність профілактичного застосування квертину для підвищення адаптогенних можливостей організму за умов гіпотермії.

Література

1. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / Под общ. ред. Зозули Ю.А. – К.: Наукова думка, 1997. – 420 с.

2. Тимочко М.Ф., Кобылинская Л.И., Алексевич Я.И. Роль свободнорадикальных реакций в формировании кислородного гомеостаза организма // *Hypoxia Medical Journal*, 1998. – Vol. 6, № 4. – P. 154-158.

3. Львова С. П., Горбунова Т. Ф., Абаева Е. М. Влияние гипотермии и даларгина на перекисное окисление липидов в тканях крыс // *Вопр. мед. химии.* – 1993. – Т. 39. – С. 21–24.

4. Лукьянчук В.Д., Савченкова Л.В., Гудзенко А.П. и др. Некоторые стороны механизма терапевтического действия кверцетина при сочетанном воздействии гипоксии и гипертермии // *Фармакологическая коррекция гипоксических состояний (Матер. 2-ой всесоюзной конференции)*, ч. III. – Гродно, 1991. – С. 439-440.

5. Голец В.А., Евдокимов Е.И., Сидельников В.И. Сравнительная оценка антигипоксической и антиоксидантной эффективности

алантона и кверцетина в эксперименте. // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний (Матер. 2-ой всесоюзной конференции), ч. II. – Гродно, 1991. – С. 242.

6. Сахарова Т.С. Экспериментальне вивчення фармакодинаміки та механізму дії нової групи природних антиоксидантів на основі елаготанінів. – 14.03.05 – фармакологія. – Автореф. дис. ... доктора фарм. наук. – Харків – 2008.

7. Дорохина Л.В., Зинчук В.В. Прооксидантно–антиоксидантное равновесие у крыс при гипотермии в условиях коррекции L-аргинин–NO системы // Вестні НАН РБ /сер. біял. нав. – 2000. – № 4. – С. 87–90.

8. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН. – М., 1998. – № 7. – С. 43-51.

9. Девяткина Т.А., Бречко В.В., Тарасенко Л.М. и соавт. Антиоксиданты как средства коррекции адаптации // Тезисы докладов 6 Всесоюзного съезда фармакологов. – Ташкент, 1988. – С. 111-112.

10. Huk I., Brovkovich V., Nanobash V., et al. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study // Br. J. Surg. – 1998. – Vol. 85, № 8. – P. 1080-1085.

11. Lee-Hilz Y.Y., Boerboom A.M., Westphal A.H., Berkel W.J. Prooxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression // Chem. Res. Toxicol. – 2006. – Vol. 19, № 11. – P. 1499-1505.

12. Волчегорский И.А. Сопоставление различных подходов к определению перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопросы мед. химии. – 1989. – № 1. – С. 127-131.

13. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – 1977. – С. 66-68.

14. Moore K., Roberts L.J. Lipid peroxidation measurement // Free Rad. Res. – 1998. – Vol. 28. – P. 659-671.

15. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях / Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М.И. Прохоровой. – Л., 1982. – С. 183-187.

16. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Метод. рекомендации; авт. А.В. Арутюнян и др. – С.-Пб, 2000. – 104 с.

17. Гланц С. Медико-биологическая статистика; пер. с англ. Ю.А. Данилова. – М. : Практика, 1998. – 459 с.

18. Ward A., Clissold S.P. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy // *Drugs*. – 1987. – Vol.34. – P.50-97.

19. Ferraresi R., Troiano L., Roat E., et al. Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the antioxidant effect of the flavonoid quercetin // *Free Radic. Res*. – 2005. – Vol.39. – P. 1249-1258.

Summary. *Adaptive properties of quertin and its combination with corvitin have been investigated in rats with cold stress. It was established that profylactic supplementation with quertin prevented the disturbance of prooxidant-antioxidant homoeostasis induced by hypothermia in rats. Additional injection of convictin after supercooling did not increase antioxidant action of quertin. Profylactic-therapeutic application of reference medicine – silibor in combination with pentoxifilin was accompanied by increase of oxidative stress and in 35% of cases caused the death of animals after supercooling.*

These results justified expedience of quertin prophylactic application to increase organism adaptive possibilities in hypothermia.

Key words: *cold stress, oxidative status, quertin, corvitin.*

Резюме. *Исследованы адаптогенные свойства квертина и его комбинации с корвитином в условиях холодового стресса у крыс. Установлено, что профилактическое применение квертина предотвращает нарушение прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза после гипотермии у крыс. Дополнительное введение корвитина после переохлаждения не приводит к повышению антиоксидантного действия квертина. Профилактико-терапевтическое применение препаратов сравнения – силибора в комбинации с пентоксифилином сопровождается усилением оксидативного стресса, и в 35% случаев вызывает гибель животных после переохлаждения.*

Полученные результаты обосновывают целесообразность профилактического применения квертина для повышения адаптогенных возможностей организма при условиях гипотермии.

Ключевые слова: *холодовой стресс, оксидативный статус, квертин, корвитин.*