УДК 612.18.014.481.1:615.272

Є.М. Горбань,

О.В. Паршиков

ДУ "Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова" НАМН України, Київ

КВЕРЦЕТИН ЗАПОБІГАЄ ЗМІНАМ РЕАКТИВНОСТІ СУДИН У ЩУРІВ, ОПРОМІНЕНИХ У СУБЛЕТАЛЬНІЙ ДОЗІ

***Ключові слова**: рентгенівське опромінення, реактивність ізольованих судин, кверцетин.*

***Резюме.** Мета роботи - дослідити можливість радіопротекторного впливу курсу ліпосомної форми кверцетину (ЛК) на реактивну здатність ізольованих судин ((фрагментів торакального відділу аорти (ТА), мезентеріальної артерії (МА) і ворітної вени (ВВ)) щурів після одноразового рентгенівського опромінення (R-опр.) в дозі 7 Гр. Здатність скорочених фенілефрином фрагментів ТА інтактних щурів розслаблятися під дією ацетилхоліну (Ацх) підвищується в присутності інсуліну (Інс). Через 30 діб після R-опр. ступінь релаксації ТА на Ацх підвищується, а в присутності Інс - пригнічується. У МА інтактних тварин спостерігається більш високий рівень максимальної релаксації з більш низькою чутливістю до Ацх, порівняно з ТА, окремо і в присутності Інс. Через 30 діб після R-опр. спостерігається значне пригнічення реакцій МА на Ацх, що додатково посилюється в присутності Інс. Серотонін (Сер) дозо-залежним чином збільшує амплітуду і частоту скорочувальної активності фрагментів ВВ інтактних щурів, а додавання Інс не впливає істотно на рівні скорочувальних реакцій при посиленні стимуляції Сер. Після R-опр. виявлені істотні відмінності в чутливості до стимуляції Сер окремо і в присутності Інс: спостерігалося посилення скорочувальної активності на Сер в присутності Інс. Курсове застосування ЛК після R-опр. запобігало розвитку виявлених пострадіаційних порушень реакцій досліджуваних судин.*

Вступ

Артеріальна гіпертензія та інсулінова резистентність обіймають провідні місця серед віддалених наслідків радіаційного впливу на серцево-судинну систему [1, 2]. Різке накопичення активних форм кисню в клітинах судин є фактором патогенезу, що серед іншого викликає розлад ендотеліальної функції, пов'язаної з продукцією і біодоступністю оксиду азоту (NO). Порушення в регуляції судинного тонусу асоційовані з тривалим запаленням і зниженням чутливості ендотелію до інсуліну (Інс), які призводять до пригнічення інсулін-залежної активації eNOS і транспорту Інс крізь судинну стінку [3, 4]. Кверцетин, як активний редокс інгібітор, відомий за здатністю впливати на рівень продукції активних форм кисню в ендотелії судин та перешкоджати розвитку оксидативного стресу. Розслаблення ізольованих судин (ІС) у відповідь на кверцетин обумовлене синтезом NO і простаноїдів в ендотелії, а також зниженням концентрації або чутливості до Ca2+ в клітинах гладеньких м'язів. Прямі вазодилататорні ефекти одночасно з підвищенням ендотеліальної функції є головними механізмами, що забезпечують зниження кров'яного тиску і протекторну дію кверцетину при лікуванні серцево-судинних захворювань [5 - 9].

Мета дослідження

Вивчити можливість запобігання негативному впливу рентгенівського опромінення (R- опромінення) на регуляцію судинного тонусу у щурів за допомогою ліпосомної форми кверцетину, - флавоноїду з широким фармакологічним спектром дії, що може сприяти нормалізації рівня розслаблення судин у щурів з артеріальною гіпертензією та відновленню ендотелій-залежних реакцій судин, пригнічених внаслідок дії іонізуючої радіації.

Матеріал і методи

Дослідження проведено на дорослих (7-8 міс) щурах-самцях популяції Вістар масою 180-220 г, поділених на 3 групи: 1 - контрольна; 2 - щури, піддані впливу одноразового R-опромінення за допомогою рентген-установки "РУМ-17" в дозі 7 Гр (параметри опромінювання: напруга на трубці 170 кВ; сила струму 12 мА; фільтр 0,5 мм Cu і 1,0 мм Al; фокусна відстань 45 см; потужність дози 0,833 сГр/с; тривалість опромінювання 14 хв, щурів брали в гострий дослід через 30 діб після

© Є.М. Горбань, О.В. Паршиков, 2017

опромінювання); 3 - щури, піддані впливу одноразового R-опромінення в дозі 7 Гр з подальшим курсовим введенням, починаючи з наступного дня після опромінення, ліпосомного кверцетину, чотириразово, внутрішньочеревно, через день, в дозі 0,6 мг/кг за кверцетином; щурів брали в гострий дослід через 30 діб після опромінювання. Евтаназію тварин проводили під CO_2-наркозом.

Досліджено агоніст- та інсулін-залежні реакції судин, ізольованих у піддослідних щурів. Фрагменти торакального відділу аорти (ТА), мезентеріальної артерії (МА) та ворітної вени (ВВ) видаляли негайно після розтину тварини і зберігали в охолодженому розчині Кребса (який містив в mM: 132 NaCl; 4,7 KCl; 1,4 NaH_2PO_4; 1,0 $MgCl_2$; 2,1 $CaCl_2$; 21 $NaHCO_3$; 6,5 глюкози; pH 7,4 підтримували аерацією сумішшю 5% CO_2 і 95% O_2). Ізольовані судини очищували від залишків жирової і сполучної тканин на зовнішній поверхні, розрізали на кільця шириною до 1 мм, зберігали охолодженими до проведення дослідів.

Механографічні дослідження скорочувальних реакцій ІС проводили на експериментальній установці [10]. Кільцеві фрагменти ТА і МА розтягували з попереднім навантаженням 0,5-1,0 г на двох сталевих гачках, розміщених у проточній горизонтальній камері (0,5 мл), яку заповнювали розчином Кребсу (0,5-1,0 мл/хв) при 36 °С. Силу скорочувальних реакцій ІС реєстрували в ізометричному режимі за допомогою тензометричних датчиків (FTK-0.1), аналогоцифрового перетворювача Lab-Trax 4-CDA і програмного забезпечення Data Trax 2 (WPI, США).

Наявність ендотелій-залежних реакцій оцінювали як здатність судин, попередньо скорочених фенілефрином (ФЕ, $3x10^{-6}$М), дозо-залежним чином розслаблятися у відповідь на ацетилхолін (Ацх, 10^{-9}-10^{-5}М) окремо і в присутності інсуліну (Інс, 0,001 Од/мл), що відображали у % відносно рівня максимального тонічного напруження в стаціонарній фазі, який було прийнято за 100 % [4, 11]. Рівень ендотелій-залежного розслаблення фрагментів судин під дією Ацх досліджували в умовах блокади синтезу простаноїдів індометацином (10^{-5}М). Для розрахунку середньо ефективної діючої концентрації Ацх ($\log EC_{50}$) застосовували графічний метод побудови S-подібних кривих "доза-ефект" (розслаблення, % - концентрація агоніста, Log_{10}М), які були апроксимовані за рівнянням Хілла [12]. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за методом t-тесту Ст'юдента для непарних вимірів. Розрахунки проводили з використанням програм Origin 6.1 (OriginLab Co., США) і Exel 5.0 (Microsoft, США). Розходження вважали статистично достовірними, якщо величина $p<0,05$.

Фрагменти ВВ (поздовжні смужки) вміщували до проточної камери з розчином Кребса (36 ^{0}С), розтягували зі сталим попереднім навантаженням (0,8 г), витримували протягом 30-40 хв для досягнення стабільного рівня їх спонтанних регулярних скорочень. Дослідження дозо-залежного ефекту серотоніну (Сер, 10^{-8}-10^{-4}М) окремо і в присутності Інс (0,001 Од/мл) на скоротливу діяльність ВВ проводили за експериментальним протоколом, що складався з періодичної стимуляції смужок Сер (3 хв) з наступним відмиванням розчином Кребсу (10 хв). Реакцію ВВ у відповідь на Сер визначали за інтегральною інтенсивністю скоротливої діяльності протягом 3 хв (площею під кривою скорочень, AUC_{0-3}), приймаючи вихідний рівень спонтанних скорочень за 100%.

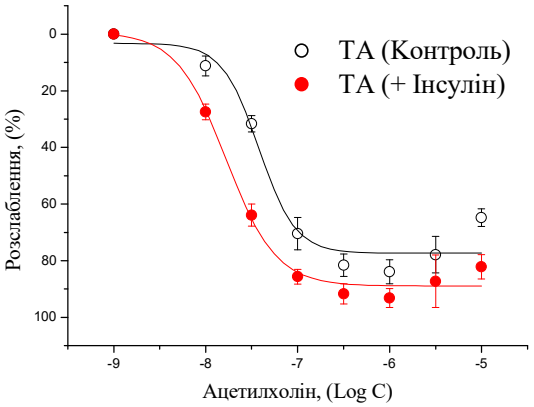
Для приготування розчину Кребса використовували солі і глюкозу кваліфікації х.ч. виробництва "Хімреактив" (Україна). В дослідах застосовували Ацх, Сер, ФЕ та індометацин виробництва Sigma Chemical Co. (США), Інс людини виробництва "Індар" (Україна).

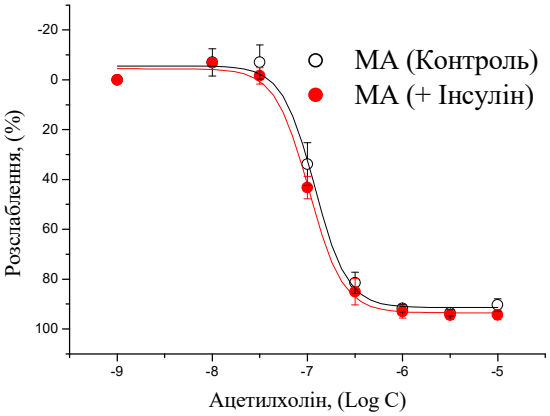
Результати та їх обговорення

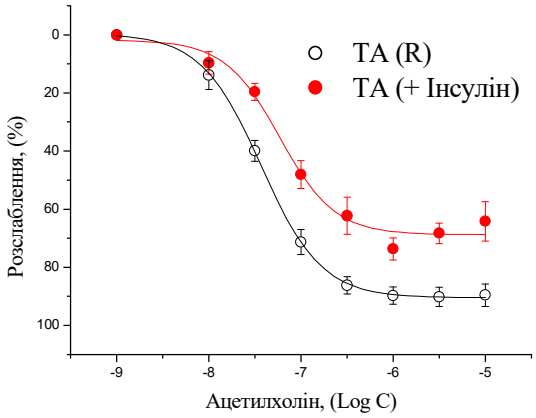
У роботі досліджували особливості ендотелій- і інсулін-залежних реакцій судин, ізольованих у контрольних та опромінених щурів (через 30 діб після одноразового R-опромінення в дозі 7 Гр).

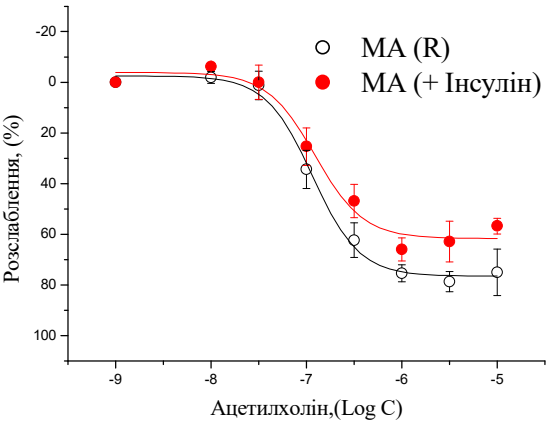
Згідно з даними, які представлені на рис. 1, здатність ФЕ-скорочених фрагментів ТА контрольних щурів розслаблятися під дією Ацх (EC_{50} ~3,8±0,9 $x10^{-8}$М, $E_{мах}$ ~77,3±4,2 %) підвищувалася в присутності 0,001 Од/мл Інс (EC_{50} ~1,7±0,2$x10^{-8}$М, $E_{мах}$ ~88,9±2,3 %), про що свідчили зсув кривої доза-ефект вліво (ЕС50) та зростання амплітуди ендотелій-залежної відповіді ($E_{мах}$). Фрагменти ТА, ізольовані у опромінених щурів, характеризувалися більш високим рівнем розслаблення під дією Ацх (EC_{50} ~3,7±0,1$x10^{-8}$М, Емах ~90,5±0,4 %), порівняно з судинами контрольних тварин. Разом з тим, спостерігався значний зсув вправо кривої доза-ефект на Ацх та пригнічення ендотелій-залежного розслаблення таких судин у присутності Інс (EC_{50} ~5,9±1,1$x10^{-8}$М, $E_{мах}$ ~68,8±2,6 %). Проте, фрагменти ТА ізольовані у опромінених щурів після курсового введення кверцетину, демонстрували такі реакції на Ацх окремо (EC_{50} ~3,3±0,6$x10^{-8}$М, $E_{мах}$ ~75,8±2,9 %) та в присутності Інс (EC_{50} ~2,2±0,4$x10^{-8}$М, $E_{мах}$ ~85,0±2,6 %), які за своїм значенням достовірно не відрізнялися від таких у судин контрольних тварин.

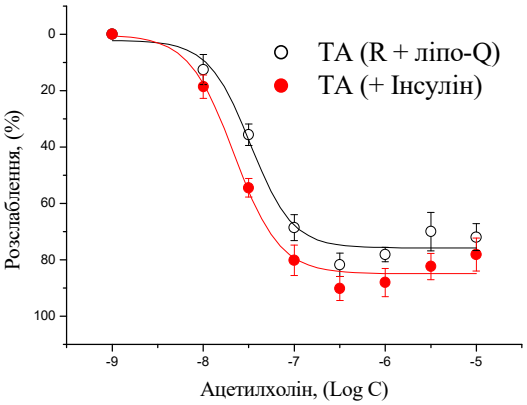
Результати експериментів, які проводили на ФЕ-скорочених фрагментах МА (рис. 2), ізольо-











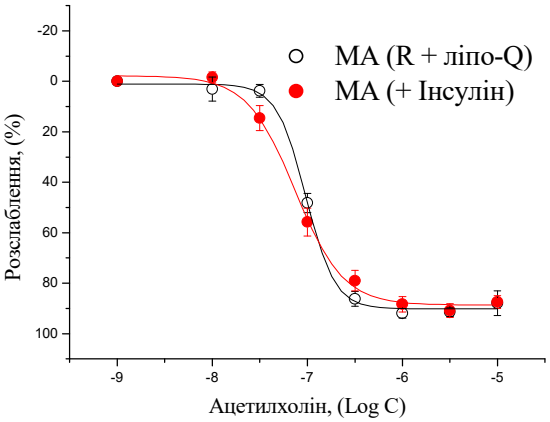


Рис. 1. Ендотелій-залежне розслаблення фрагментів ТА щурів, скорочених ФЕ (10^{-6} М) у відповідь на Ацх окремо і в присутності Інс (0,001 Од/мл). Тут і на рис. 2 і 3: судини ізольовані у тварин з трьох експериментальних груп: інтактний контроль (Контроль), через 30 діб після R-опромінення (R), через 30 діб після R-опромінення та наступного курсового введення ліпосомного кверцетину (R+ліпо-Q)

Рис. 2. Ендотелій-залежне розслаблення фрагментів МА щурів, скорочених ФЕ (10-6 М) у відповідь на Ацх окремо і в присутності Інс (0,001 Од/мл)

ваних у контрольних щурів, демонструють особливості реакції цих судин порівняно з ТА, а саме високий рівень максимального розслаблення за умови меншої чутливості до Ацх окремо (EC_{50} ~1,2±0,1x10^{-7}М, Емах ~91,4±2,5 %) та в присутності 0,001 Од/мл Інс (EC_{50} ~1,0±0,1x10^{-7}М, Емах ~93,5±1,8 %). Дослідження фрагментів МА, ізольованих у опромінених щурів, показало значне пригнічення ендотелій-залежних відповідей судин на Ацх (EC_{50} ~1,2±0,1x10^{-7}М, $E_{мах}$ ~76,5±2,0 %), яке ставало ще більш виразним в присутності Інс (EC_{50}~1,2±0,3x10^{-7}М, $E_{мах}$ ~61,7±3,4 %).

Разом з тим, фрагменти МА, ізольовані у опромінених щурів після курсового введення кверцетину, розслаблялися під впливом Ацх (EC_{50} ~9,6±0,3x10^{-8}М, $E_{мах}$ ~90,2±1,1 %) та Інс (EC_{50} ~7,4±0,5x10^{-8}М, Емах ~88,7±1,5 %) на однаковому рівні з судинами контрольних тварин.

Дані, отримані на фрагментах ВВ та представлені на рис. 3, насамперед свідчать про здатність Сер дозо-залежним чином підвищувати амплітуду і частоту скоротливої діяльності судин, ізольо-

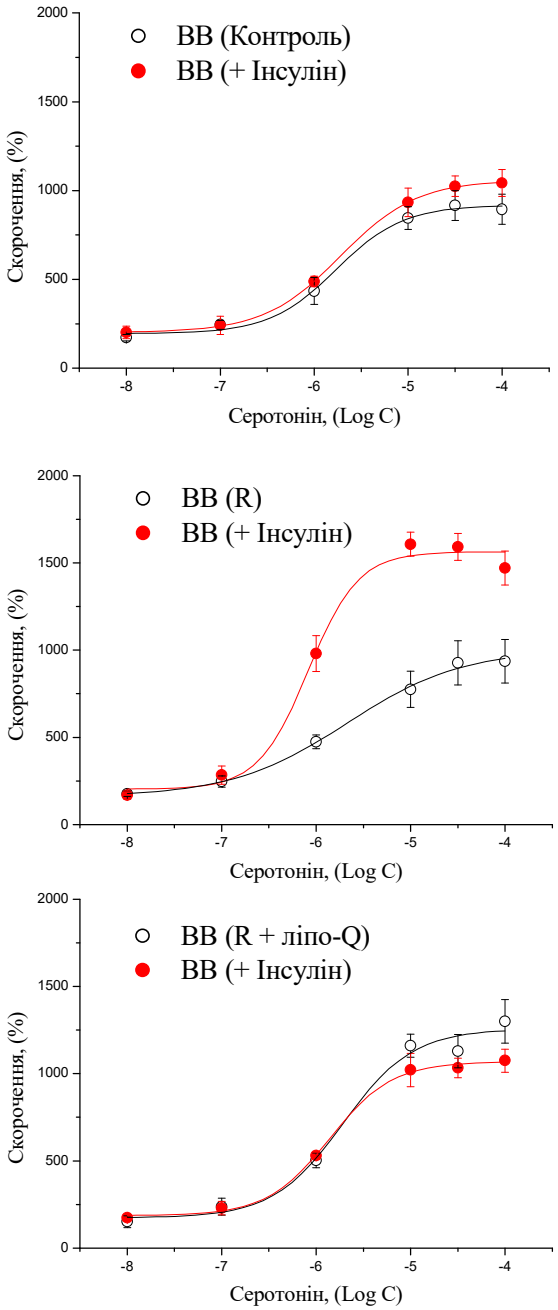


Рис. 3. Скорочення фрагментів ворітної вени (ВВ) щурів у відповідь на серотонін окремо і в присутності інсуліну (0,001 Од/мл)

ваних у контрольних щурів (EC_{50} ~1,7±0,4x10^{-6}M). За цих умов, додавання 0,001 Од/мл Інс не позначалося суттєво на рівні скоротливих реакцій судин при подальшій стимуляції Сер (EC_{50} ~1,9±0,1x10^{-6}M). Дослідження фрагментів ВВ, ізольованих у опромінених щурів, виявило значні відмінності у чутливості судин до стимуляції Сер окремо (EC_{50} ~2,1±0,6x10^{-6}M) та в присутності Інс (EC_{50} ~8,2±2,0x10^{-7}M). Також спостерігалося підвищення на ~50% рівня скоротливої діяльності судин ($E_{мах}$) під впливом Інс. Проте, фрагменти ВВ, ізольовані у опромінених щурів після курсового введення кверцетину, демонстрували скоротливу відповідь на Сер (EC_{50} ~1,9±0,8x10^{-6} M) та Інс (EC_{50} ~1,4±0,2x10^{-6}M), наближену до рівня активності судин контрольних тварин.

Таким чином, отримані результати дозволяють виокремити загальну тенденцію, що характеризує вплив R-опромінення на функціональну активність судин. Зокрема, Інс безпосередньо бере участь в регуляції ендотелій-залежної вазодилатації, можливо, насамперед за рахунок прямої активації eNOS та збільшення продукції NO. У випадку зменшення продукції або прискореного розпаду NO Інс опосередковано стимулює вивільнення вазоконстрикторів (ендотеліну, тромбоксану, ангіотензину та ін.), що спостерігається за умови розвитку патологічних станів (ожиріння, діабету, гіпертензії, інсулінової резистентності) [13, 14].

Вочевидь, пострадіаційні порушення ендотелій- та інсулін-залежних реакцій судин реалізуються за участі тих самих фізіологічних механізмів і потребують корекції за допомогою перспективних лікарських засобів, до яких можна віднести і ліпосомний кверцетин.

Висновок

Курсове застосування ліпосомного кверцетину після одноразового R-опромінення щурів у сублетальній дозі, запобігає розвитку виявлених пострадіаційних порушень ендотелій- та інсулін-залежних реакцій судин різних типів.

Перспективи подальших досліджень

Отримані результати свідчать про доцільність подальшого дослідження радіопротекторних ефектів курсового застосування квецетину.

Література. 1.Ионизирующая радиация и инсулинорезистентность. / Зуева Н. А., Коваленко А. Н., Ефимов А. С. и др. - К.: Здоров`я, - 2004. - 198 с. 2.Hoel D. G. Ionizing radiation and cardiovascular diseases / D.G. Hoel // Ann. NY Acad. Sci. - 2006. - V. 1076. - P. 309-317. 3.Mahesh T. Quercetin allievates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats / T. Mahesh, V.P. Menon // Phytother. Res. - 2004. - V. 18, № 2. - P. 123-127. 4.Machha A. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta / M. Machha, M.R. Mustafa // J. Cardiovasc. Pharmacol. - 2005. - V. 46, № 1. - P. 36-40. 5.Contribution of insulin and Akt1 signaling to endothelial nitric oxide synthase in the regulation of endothelial function and blood pressure / J.D. Symons, S.L. McMillin, C. Riehle [et al.] // Circ. Res. -2009. - V. 104. - P. 1085-1094. 6. Ajay M. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta / M. Ajay, A.U. Gilani, M.R. Mustafa // Life Sci. - 2003. - V. 74, № 5. - P. 603-612. 7.Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle / G. Lopez-Lopez, L. Moreno, A. Cogolludo [et al.] // Mol. Pharmacol. - 2004. - V. 65, № 4. - P. 851-859. 8.Quercetin-induced induction of the NO/cGMP pathway depends on Ca_{2+}-activated K+ channel-induced hyperpolarization-mediated Ca2+-entry into cultured human endothelial cells / C.R. Kuhlmann, C.A. Schaefer, C. Kosok [et al.] // Planta Med. - 2005. - V. 71, № 6. - P. 520-524. 9.Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized irradiation: selective impairment of the nitric oxide components of endothelium-dependent vasodilatation / A. Soloviev, S. Tishkin, A. Parshikov [et al.] // Br. J. Pharmacol. -

2003. - V. 138, № 5. - P. 185-191. 10.Soloviev A. Evidence for the involvement of protein kinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats / A. Soloviev, A. Parshikov, A. Stefanov // J. Vasc. Res. ? 1998. - V. 35, № 5. - P. 272-278. 11.Hussain M.B. Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery / M.B. Hussain, I. Marshall // Br. J. Pharmacol. - 1997. - V. 122, № 5. - P. 849-858. 12.Effects of tamsulosin metabolites at alpha-1 adrenoceptor subtypes / K. Taguchi, M. Saitoh, S. Sato [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1997. - V. 280, № 1. - P. 1-5. 13.Richey J. M. The vascular endothelium, a benign restrictive barrier? NO! Role of nitric oxide in regulating insulin action / J. M. Richey // Diabetes. - 2013. - V. 62. - P. 4006-4008. 14.Nitric oxide directly promotes vascular endothelial insulin transport / H. Wang, A.X. Wang, K. Aylor [et al.] // Diabetes. - 2013. - V. 62. - P. 4030-4042.

КВЕРЦЕТИН ПРЕДОТВРАЩАЕТ ИЗМЕНЕНИЯ СОСУДИСТОЙ РЕАКТИВНОСТИ У КРЫС, ОБЛУЧЁННЫХ В СУБЛЕТАЛЬНОЙ ДОЗЕ.

Е.М. Горбань, О.В. Паршиков

Резюме. Цель работы - изучить возможность радиопротекторного влияния курса липосомной формы кверцетина (ЛК) на реакционную способность изолированных сосудов ((фрагментов торакального отдела аорты (ТА), мезентериальной артерии (МА) и портальной вены (ПВ)) у крыс после однократного рентгеновское облучения (R-обл.) в дозе 7 Гр. Способность сокращённых фенилэфрином фрагментов ТА интактных крыс расслабляться под действием ацетилхолина (Ацх) повышается в присутствии инсулина (Инс). Через 30 сут после R-обл. степень релаксации ТА на Ацх увеличивается, а в присутствии Инс - подавляется. В МА интактных животных отмечается более высокий уровень максимальной релаксации с меньшей чувствительностью к Ацх, отдельно и в присутствии Ins. Через 30 сут после R-обл. наблюдается значительное ингибирование реакции МА на Ацх, которое дополнительно усиливается в присутствии Ins. Серотонин (Сер) дозозависимым образом увеличивает амплитуду и частоту сократительной активности фрагментов ВВ интактных крыс, а добавление Инс не влияет существенно на уровни сократительных реакций при усилении стимуляции Сер. После R-обл. были выявлены значительные различия в чувствительности к стимуляции Сер отдельно и в присутствии Инс: наблюдалось увеличение сократительной активности на Сер в присутствии Инс. Курсовое применение ЛК после R-обл предотвращало развитие обнаруженных пост-радиационных нарушений реакций исследованных сосудов.

Ключевые слова: рентгеновское облучение, реактивность изолированных сосудов, кверцетин.

QUERCETIN PREVENTS CHANGES IN VASCULAR REACTIVITY IN RATS EXPOSED TO SUBLETHAL DOSE

E.M. Gorban, O.V. Parshikov

Objective. To explore the possibility of radioprotective influence of a course of liposomal form of quercetin (LQ) on reactivity of isolated vessels ((fragments of thoracic aorta (TA), mesenteric artery (MA) and portal vein (PV)) of rats after a single X-ray irradiation (X-irr.) in dose of 7 Gy.

Methods. Three group of adult male rats were used: 1 - control; 2 - X-irr. (7 Gy), rats were taken to acute experiment 30 days after exposure; 3 - X-irr. (7 Gy), followed by LQ-course (exposure liposomal LQ, four, intraperitoneally every other day, at a dose of 0.6 mg/kg) and subsequent acute experiment.

Results. The ability of phenylephrine-reduced fragments of TA of intact rats to relax under the action of acetylcholine (Ach) increases in the presence of insulin (Ins). In 30 days after X-irr. the degree of relaxation of TA to Ach is increased, and in the presence of Ins - is suppressed. In MA of intact animals, a high level of maximum relaxation is noted with a lower sensitivity to Ach compared to TA separately and in the presence of Ins. In 30 days after X-irr., there is a significant inhibition of MA responses to Ach, which is further enhanced in the presence of Ins. Serotonin (Ser) in dose-dependent manner increases the amplitude and frequency of contractile activity of PV-fragments of intact rats, and the addition of Ins does not appear to be significant at the level of the contractile response with further stimulation by Ser. In the PV-fragments after X-irr. significant differences in the sensitivity to stimulation of Ser separately and in the presence of Ins were found: an increase in contractile activity on Ser in the presence of Ins was observed. The course use of LQ after X-irr. prevents the development of detected post-radiation disorders of reactions of investigated vessels.

Conclusion. Radiation produced a significant impact on the reactivity of the investigated vessels. LQ-course used after X-irr. was effective in preventing these radio-induced disorders of vascular reactivity.

Key words: X-irradiation, reactivity of isolated blood vessels, quercetin.

State Institution "D.F. Chebotarev Institute of Gerontology" of NAMS Ukraine, Kiev

Clin. and experim. pathol.-2017.-Vol.16,№2(60),p.2.-P.112-116.

Надійшла до редакції 15.05.2017
Рецензент – проф. В.Ф. Мислицький
© Є.М. Горбань, О.В. Паршиков, 2017