

УДК 577.115:577.175.5:615.322:616-092.9

ВПЛИВ КОРВІТИНУ ТА ГУМІЛІДУ НА СТАН ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ НА ФОНІ ВВЕДЕННЯ АДРЕНАЛІНУ

В. А. Паронік¹, Л. М. Степченко², Л. М. Дяченко², А. Е. Лєвих¹, А. І. Шевцова¹
paronic@ukr.net

¹ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»,
вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ, 49600, Україна

²Дніпропетровський державний аграрний університет,
вул. Ворошилова, 25, м. Дніпропетровськ, 49600, Україна

У статті подано результати досліджень впливу антиоксидантних препаратів корвітину та гуміліду на показники перекисного окиснення ліпідів і активності ензимів антиоксидантної системи в плазмі, еритроцитах та у фракції розчинних білків серцевого м'яза щурів з адреналін-індукованою ішемією міокарду.

Встановлено, що введення адреналіну в дозі 0,2 мг/100 г маси впродовж 10 днів призводить до підвищення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та активності ензимів антиоксидантної системи у крові й серці. Показано, що визначення ТБК-активних продуктів і активності ензимів антиоксидантного захисту в крові не відображає в повній мірі стан оксидантно-антиоксидантної системи у серцевому м'язі. Застосування корвітину та гуміліду призводить до зниження ТБК-активних продуктів у серцевому м'язі, хоча у плазмі крові цей показник практично не змінюється. Активність глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази під дією корвітину та гуміліду вірогідно зменшується порівняно з цими показниками у тварин з адреналін-індукованою ішемією міокарда, але залишається підвищеною у порівнянні з інтактними тваринами. За дії корвітину активність супероксиддисмутази знижується у 5 разів відносно цього показника в групі щурів з ішемією і становить $1,68 \pm 0,21$ нг/мл/Нв, на противагу $3,12 \pm 0,38$ нг/мл/Нв у контрольних тварин.

Отримані дані свідчать про здатність корвітину та гуміліду знижувати кардіотоксичний ефект високих доз адреналіну завдяки їх спроможності зв'язувати вільні радикали, що утворюються у клітинних мембранах кардіоміоцитів при перекисному окисленні ліпідів.

Ключові слова: АДРЕНАЛІН-ІНДУКОВАНА ІШЕМІЯ МІОКАРДУ, КОРВІТИН, ГУМІЛІД, АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА, ТБК-АКТИВНІ ПРОДУКТИ

INFLUENCE OF CORVITIN AND HUMILID ON THE OXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN RATS AFTER INJECTIOIN OF ADRENALIN

V. Paronik¹, L. Stepchenko², L. Diachenko², A. Lievykh¹, A. Shevtsova¹
paronic@ukr.net

¹GU «Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine»
9 Dzerzhynskiy str., Dnipropetrovsk 49600, Ukraine

²Dnipropetrovsk State Agricultural University,
25 Voroshilov str., Dnipropetrovsk 49600, Ukraine

The results of effect of antioxidant drugs corvitin and gumilid on indicators of lipid peroxidation and the activity of antioxidant enzymes in plasma, erythrocytes and fraction of soluble proteins of cardiac muscle in rats with adrenaline myocardial ischemia are presented.

It was shown that the injection of adrenaline (dose of 0.2 mg/100 g weight in 10 days) results in the increase of intensity of lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in blood and heart. The determination of TBA-active products and antioxidant enzymes in the plasma does not display the state of prooxidant-antioxidant system of the heart muscle. It is proved that the use of corvitin and humilid leads to a decrease of TBA-active products in the cardiac muscle, although in plasma this indicator is almost the same.

The activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase is reduced by the influence of corvutin and humilid compared to the animals with adrenaline myocardial ischemia, but still elevated relative to control rats. Activity of superoxide dismutase is decreased 5-fold under corvutin and was $1,68 \pm 0,21$ ng/ml/Hb (norm is $3,12 \pm 0,38$ ng/ml/Hb).

These results suggest that corvutin and humilid are able to reduce the cardiotoxic effects of adrenaline due to their ability to bind free radicals in heart muscle.

Keywords: ADRENALIN-INDUCED MYOCARDIAL ISHEMIA, CORVITIN, HUMILID, ANTIOXIDANT SYSTEM, TBA-ACTIVE PRODUCTS

ВЛИЯНИЕ КОРВИТИНА И ГУМИЛИДА НА СОСТОЯНИЕ ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ АДРЕНАЛИНА

В. А. Пароник¹, Л. М. Степченко², Л. М. Дяченко², А. Э. Левых¹, А. И. Шевцова¹
paronic@ukr.net

¹ГУ «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины»,
ул. Дзержинского, 9, г. Днепропетровск, 49600, Украина

²Днепропетровский государственный аграрный университет,
ул. Ворошилова, 25, г. Днепропетровск, 49600, Украина

В статье представлены результаты исследований влияния антиоксидантных препаратов корвитина и гумилида на показатели перекисного окисления липидов и активности энзимов антиоксидантной системы в плазме, эритроцитах и фракции растворимых белков сердечной мышцы крыс с адреналин-индуцированной ишемией миокарда.

Установлено, что введение адреналина в дозе 0,2 мг/100 г массы в течение 10 дней приводит к повышению интенсивности перекисного окисления липидов и активности ферментов антиоксидантной системы в крови и сердце. Показано, что уровень ТБК-активных продуктов и активность энзимов антиоксидантной защиты в плазме не отображает в полной мере состояние оксидантно-антиоксидантной системы сердечной мышцы. Использование корвитина и гумилида приводит к снижению ТБК-активных продуктов в сердечной мышце, хотя в плазме крови этот показатель практически не меняется. Под влиянием корвитина и гумилида активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы достоверно уменьшается по сравнению с этими показателями в группе животных с адреналиновой ишемией, но остается повышенной по сравнению с интактными животными. При действии корвитина активность супероксиддисмутаза снижается в 5 раз относительно этого показателя в ишемизированных крыс и составляет $1,68 \pm 0,21$ нг/мл/Нб против $3,12 \pm 0,38$ нг/мл/Нб у контрольных животных.

Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение кардиотоксичности высоких доз адреналина под действием корвитина и гумилида обусловлено, прежде всего, способностью этих препаратов связывать свободные радикалы, образующиеся в процессе ПОЛ.

Ключевые слова: АДРЕНАЛИН-ИНДУЦИРОВАННАЯ ИШЕМИЯ МИОКАРДА, КОРВИТИН, ГУМИЛИД, АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, ТБК-АКТИВНЫЕ ПРОДУКТЫ

Висока частота серцево-судинних захворювань в умовах техногенного прогресу значною мірою обумовлена впливом стрес-факторів різного генезу. Як відомо, стрес супроводжується підвищенням рівня катехоламінів у крові, внаслідок чого розвивається аритмія, гіпертонія та в багатьох випадках, як наслідок, ішемічна хвороба серця. В експериментальних роботах показано, що введення в організм тварин великих доз адре-

наліну призводить до цитолізу кардіоміоцитів та мікронекрозів міокарду [1]. Вважають, що шкідлива дія адреналіну на стан серцевого м'яза пов'язана з активацією процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), підвищенням концентрації іонів кальцію та пригніченням захисних сил організму [2].

В останні роки велику увагу приділено пошуку препаратів, які обумовлюють формування резистентності серця до дії стрес-

факторів й запобігають розвитку серцево-судинних захворювань. Одним із можливих підходів є використання антиоксидантних препаратів. До таких належить корвітин, який широко використовується як складова комплексної терапії при гострому порушенні коронарного кровообігу та інфаркті міокарда. У сільському господарстві для підвищення резистентності тварин до дії шкідливих факторів зовнішнього середовища активно використовуються препарати з торфу, які мають адаптогенні та антиоксидантні властивості [3]. Серед низки препаратів гумінової природи особливої уваги заслуговує гумілід — біологічно активна добавка, розроблена співробітниками проблемної лабораторії з гумінових речовин ім. Л. А. Христової Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету [4]. Незважаючи на велику кількість досліджень, пов'язаних з визначенням лікувально-профілактичних ефектів корвітину та гуміліду, дані щодо впливу цих препаратів на стан оксидантно-антиоксидантної системи в умовах адреналінового стресу досі відсутні.

Метою роботи було визначити вплив корвітину та гуміліду на стан оксидантно-антиоксидантної системи за умов експериментального адреналінового ушкодження міокарду.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар вагою 195 ± 4 г, у яких моделювали ішемічний стан введенням адреналіну за схемою, запропонованою Л. Д. Хідіровою (2010): щурам впродовж 10 днів підшкірно вводили адреналін ($0,2$ мг/100 г маси) [5]. Всі щури були розділені на 4 групи. Перша група ($n=8$) — контрольна, в якій щури отримували ін'єкції фізіологічного розчину; у трьох інших групах відтворювали зазначену вище модель адреналін-індукованої ішемії міокарду. В другій групі ($n=10$) щурам вводили адреналін і моделювали таким чином адреналінову ішемію міокарду (АІМ). Третя група ($n=10$) після закінчення курсу адреналінових ін'єкцій впродовж 5 днів отримувала корвітин за схемою, рекомендованою

виробником (Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, Україна). Корвітин вводили внутрішньочеревинно в дозі $5,2$ мг/100 г у перший день; на 2-й та 3-й дні — по $3,5$ мг/100 г, на 4-й та 5-й день — по $1,8$ мг/100 г. У четвертій групі ($n=9$) були щури, які отримували впродовж 7 днів гумілід (1 %, ТУ У 15.7-00493675-004, 2009) з питною водою після набуття АІМ ($0,5$ мл на кг маси тварини на добу). Тварини утримувались за умов стандартного харчування у віварії з циклічністю світла 12 год. Впродовж експерименту тварин зважували на початку, після набуття АІМ та після лікування. Після закінчення експерименту проводили евтаназію тварин згідно з вимогами Міжнародної конвенції щодо гуманного поводження з дослідними тваринами з використанням теопенталу натрію в дозі 60 мкг/кг.

Для аналізу використовували плазму, еритроцити та екстракт водорозчинних білків серцевого м'яза, який отримували при гомогенізації серцевого м'язу в $0,05$ М трис-НСІ буфері, $\text{pH}=7,2$ (1 г тканини/4 мл буфера) з подальшим центрифугуванням зі швидкістю 8000 г впродовж 30 хвилин. Гомогенізацію та центрифугування проводили за температури 4°C . Для аналізу використовували супернатант, що містив фракцію розчинних білків серцевого м'язу. У дослідних зразках визначали концентрацію ТБК-активних продуктів за інтенсивністю утворення забарвленого комплексу в реакції з тіобарбітуровою кислотою [6]. У гемолізаті еритроцитів визначали активність ензимів антиоксидантної системи — супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР). Активність СОД визначали за методом Костюка та ін. [7], згідно з яким оцінювали ступінь автоокислення кверцетину за присутності тетраметилетилендіаміну. Активність каталази досліджували у плазмі та екстракті білків серцевого м'язу за стандартною методикою реакції з молібдатом амонію [8]; активність ГП — за зміною вмісту відновленого глутатіону, який оцінювали за розвитком кольорової реакції, що розвинулася внаслідок взаємодії сульфгідрильних груп з реактивом Елмана [9];

активність ГР — за швидкістю NADPH-H-залежного перетворення окисненої форми глутатіону на відновлену [10]. Загальний вміст білка визначали за мікрометодом Бредфорд [11].

Стан серцевого м'яза оцінювали за даними морфометрії та електрокардіографії. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми *Microsoft Excel* та програмного продукту *Statistica*.

Результати та їх обговорення

Впродовж експерименту контролювали вагу, стан серцевого м'яза піддослідних щурів за даними електрокардіограми, частотою серцевих скорочень, які визначали наприкінці моделювання АІМ та після закінчення лікування. Введення адреналіну впродовж семи днів призводило до тимчасового погіршення фізичного стану тварин, що супроводжувалося порушенням рухливості щурів, появою у них тахікардії та млявості. Під час введення адреналіну зареєстровано загибель 6 тварин, що склало 17,6 % від загальної кількості всіх експериментальних тварин.

Вага піддослідних щурів впродовж експерименту підвищувалась у всіх групах пропорційно до їх віку і становила 195 ± 4 г на початку експерименту, $206 \pm 6,54$ г — через 10 днів після закінчення введення адреналіну, $214,6 \pm 4,4$ г — через 17 днів (на етапі закінчення антиоксидантної терапії у 3-й та 4-й групах).

За введення адреналіну частота серцевих скорочень (ЧСС) вірогідно підвищувалась ($P \leq 0,01$), але після застосування корвітину та гуміліду цей показник практично досягнув нормальних значень. Так, наприкінці експерименту ЧСС у досліджуваних групах коливалась у межах: 368 ± 12 уд/хв. — перша група; $421,4 \pm 10$ уд/хв. — друга група; $378 \pm 13,0$ уд/хв. — третя група; $362,8 \pm 6,08$ уд/хв. — четверта група. У 60 % тварин другої групи, які отримували адреналін, спостерігались вірогідні зміни показників ЕКГ, що свідчили про ішемію міокарду, у 3-й та 4-й групах кількість таких тварин знизилася і складала 45 % та 50 % відповідно.

За результатами визначення ТБК-активних продуктів у плазмі крові тварин з АІМ було встановлено їх вірогідне підвищення по-

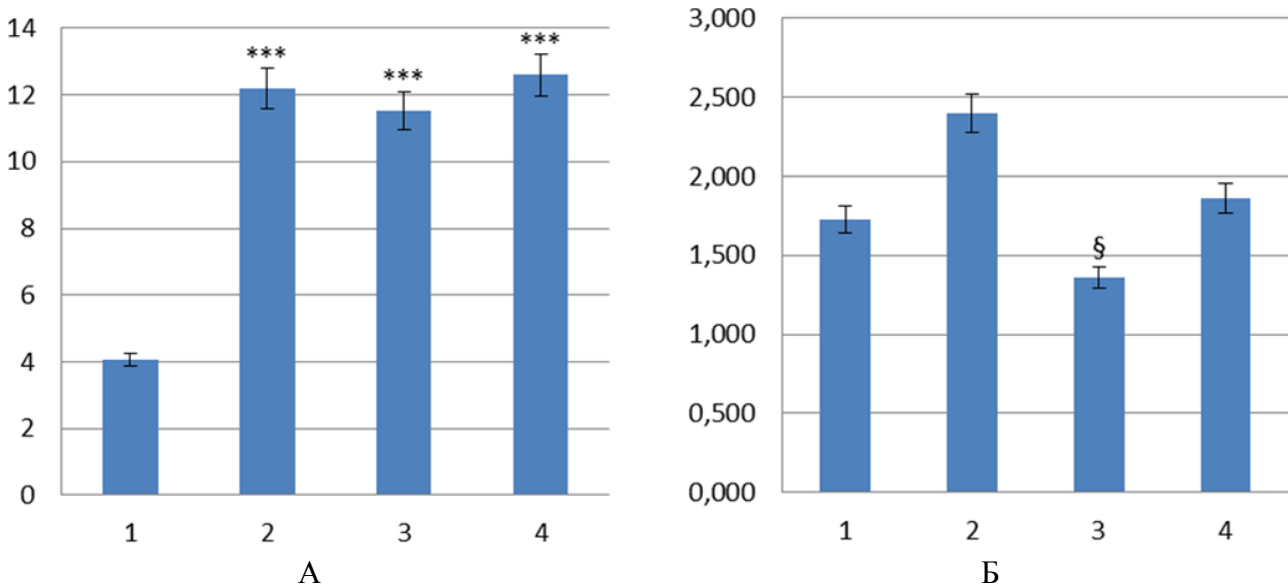


Рис 1. Кількість ТБК-активних продуктів: А — у плазмі [мкмоль/л] та Б — в екстракті водорозчинних білків серцевого м'язу [мкмоль/л/мг білка].

1 — контрольна група, 2 — щури з адреналіновою ішемією (АІМ), 3 — щури з (АІМ) на тлі введення корвітину, 4 — щури з (АІМ) на тлі застосування гуміліду. Вірогідна різниця порівняно з показниками контрольної групи: *** — $P \leq 0,001$.

Вірогідна різниця у відношенні до групи АІМ: § — $P \leq 0,05$

рівняно з контролем. Застосування корвітину та гуміліду не призводило до суттєвих змін ТБК-активних продуктів: у плазмі крові їхній рівень залишався вірогідно вищим від контрольних значень і складав $11,52 \pm 0,54$ і $12,6 \pm 0,89$ мкмоль/л у тварин 3-ї і 4-ї дослідних груп відповідно (Рис. 1А).

Інша картина спостерігалась при дослідженні ТБК-активних продуктів у фракції

розчинних білків серцевого м'яза (Рис. 1Б). Якщо у щурів 2-ї групи з АІМ цей показник збільшувався в середньому на 25 % порівняно з контролем ($1,84 \pm 0,15$ мкмоль/л/мг білка), то у щурів 3-ї групи знижувався до $1,42 \pm 0,19$ мкмоль/л/мг білка, а 4-ї — практично досягнув контрольних значень. Цей факт може свідчити про виражену захисну антиоксидантну як корвітину, так і гуміліду.

Таблиця 1

Вплив корвітину (К) та гуміліду (Г) на активність ензимів антиоксидантного захисту за умов адреналінової ішемії, $M \pm m$

Показники	Групи тварин			
	1 гр. (n=8)	2 гр. (n=10)	3 гр. (n=10)	4 гр. (n=9)
	Контроль	АІМ	АІМ+К	АІМ+Г
Каталаза у плазмі [мкмоль/с*л]	$4,06 \pm 0,58$	$2,62 \pm 0,63$	$10,77 \pm 0,85^{***}$	$6,33 \pm 0,97^*$
Каталаза у фракції розчинних білків серцевого м'яза [мкмоль/с*л/мг білка]	$0,42 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,02^{***}$	$0,74 \pm 0,13$	$0,7 \pm 0,07$
Глутатіонпероксидаза [МЕ/г /Hb] у гемолізаті еритроцитів	$83,42 \pm 7,16$	$123,7 \pm 3,91^{***}$	$97,13 \pm 7,18_{\S\S}$	$97,41 \pm 4,9_{\S\S\S}$
Глутатіонредуктаза [МЕ/л*хв/Hb] у гемолізаті еритроцитів	$0,22 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,02^{***}$	$0,53 \pm 0,06_{\S\S\S}$	$0,37 \pm 0,04_{\S\S\S}$
Супероксидисмутаза [нг/мл/Hb] у гемолізаті еритроцитів	$3,12 \pm 0,38$	$11,45 \pm 0,83^{***}$	$1,68 \pm 0,21_{\S\S\S}$	$6,01 \pm 0,87_{\S\S\S}$

Примітка: * — $P \leq 0,05$; *** — $P \leq 0,001$ — вірогідна різниця порівняно з показниками контрольної групи, § — $P \leq 0,05$; §§ — $P \leq 0,01$; §§§ — $P \leq 0,001$ — вірогідна різниця відносно групи АІМ

З наведених даних видно, що у тварин другої групи вірогідно підвищується активність всіх досліджуваних ензимів антиоксидантного захисту, за винятком каталази, активність якої у плазмі крові знижувалась в 1,6 разу, але у фракції розчинних білків серцевого м'яза була вірогідно вищою від норми. Отже, адреналінова ішемія призводить до активації ензимів антиоксидантної системи в еритроцитах та серцевому м'язі. Під впливом корвітину та гуміліду активність СОД та глутатіонпероксидазної-глутатіонредуктазної ланки вірогідно зменшується порівняно з другою групою, але залишається підвищеною у порівнянні з нормою. Слід відзначити парадоксальну реакцію каталази та СОД на введення корвітину. Активність СОД після застосування корвітину знижувалась в 1,8 разу порівняно з нормальними значеннями, а каталази, навпаки, значно підвищувалась, особливо у плазмі крові цієї групи тварин.

Отримані в нашій роботі дані, на перший погляд, суперечать результатам досліджень, в яких показано підвищення активності СОД на тлі зниження активності каталази та рівня ТБК-продуктів після застосування корвітину у дозі 150 мг/кг [12]. Однак в інших роботах стверджується, що основний компонент корвітину кверцетин є «пасткою» для вільних радикалів і може таким чином зменшувати їхню пошкоджувальну дію [13]. Аналогічна ситуація, тільки менш виражена, спостерігається і в 4-й групі тварин, які отримували гумілід. Вочевидь, цей препарат, отриманий з екологічно безпечного торфу, має достатньо складну поліфенольну природу, що утворюється при процесах гуміфікації залишків тваринного та рослинного походження, тому за механізмом антиоксидантної дії може мати схожість з корвітином, тобто здатний впливати на рівень активних радикальних форм вже на початкових стадіях та зв'язувати вільні радикали, які утворюються

в клітинних мембранах у процесі перекисного окиснення ліпідів [14].

Висновки

Введення адреналіну впливає на фізіологічний стан, інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення та активність ензимів антиоксидантної системи. Встановлено, що визначення ТБК-активних продуктів та ензимів антиоксидантного захисту в плазмі не відображає повністю стан прооксидантно-антиоксидантної системи у серцевому м'язі. Застосування антиоксидантів корвітину та гуміліду призводить до зниження вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів і активності ензимів антиоксидантної системи в еритроцитах.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження будуть спрямовані на порівняння впливу корвітину та препаратів гумінового походження на стан протеолітичної системи і показники посттрансляційної модифікації білків за умов адреналінової кардіоміопатії.

1. Trofimenko A.I., Kade A.Kh., Zanin S.A., Apsalyamova S.O., Gorbatenko A.S. Histology adrenaline myocardial heart damage in rats. *International Journal of Applied and Basic Research*, Moscow, 2013, no. 7, pp. 135–138 (In Russian).

2. Susla O.B. Age-related changes in the heart muscle metabolism in rat adrenal dynamics of myocardiodystrophy. *Medical Chemistry*, 2004, vol. 6, no. 1, pp. 41–47 (in Ukrainian).

3. Skorik M.V., Stepchenko L.M. Relationship glutathione metabolism of blood parameters of laying hens on the background of hudrohmatu. *Veterinary medicine: interagency thematic collection*. Charkiv, 2006, no. 86, pp. 292–297 (in Ukrainian).

4. Stepchenko L.M. Biologically active substances humic nature as regulators of homeostasis of poultry. *Collection of VII International conference materials, Radostim 2011*. Minsk, 2011, pp. 164–167 (In Belarus).

5. Khidirova L.D. Changing the balance between the activity of lipid peroxidation, antioxidant protection and the content of iron in rats with experimental myocardial infarction. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2010, no. 6(2), pp. 216–219 (In Russian).

6. Orekhovich V.N. *Modern methods in biochemistry*. Moscow, 1977, 391 p. (in Russian).

7. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Afanasyev I.B. The method for determining the activity of superoxide dismutase. Patent RB, no.1521773, 1987. (In Belarus).

8. Vasilev V.S. A method of determining catalase in plasma. Patent RB, no.1622821, 1988. (In Belarus).

9. Razygraev A.V. Method for determining the activity of glutathione with hydrogen peroxide and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Clinical and Laboratory council*, 2004, no 44, pp. 19–22 (in Russian).

10. Kondrakhin I.P. *Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics*. Moscow, 2004, 520 p. (in Russian).

11. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*, 1976, 72, pp. 248–254.

12. Zhilyaev S.A., Shtrygol S.Yu. Experimental research of influence and korvitina Lipoflavon on indicators of prooxidant-antioxidant balance and endogenous intoxication in traumatic brain injury. *Scientific lists*, 2013, vol. 23, no. 18, pp. 146–151 (in Ukrainian).

13. Lapshina L.A., Zolotaykina V.I. Oxidative stress in acute heart failure and the role of the antioxidant quercetin in its correction. *International Journal of Medicine*, 2009, vol. 15, no. 3, pp. 45–51 (in Ukrainian).

14. Stepchenko L.M., Skorik M.V. Condition of erythrocyte antioxidant laying hens for the actions of humic substances. *Technical bulletin Scientific Institute of Animal Biology and State research control institute of veterinary preparations and feed additives*. Lviv, 2006, vol. 7, no. 3, 4, pp. 137–143 (in Ukrainian).