

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ОЕ-5 НА ЖИРНОКИСЛОТЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС С ЭСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Нароха В.П., Рафальский В.Ю., Ниженковская И.В.

*Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца
кафедра фармацевтической, биологической и токсикологической химии
г. Киев, Украина*

Ключевые слова: германий, никотиновая кислота, сердечная недостаточность, доксорубицин

Резюме. изучены изменения жирнокислотного состава липидов кардиомиоцитов крыс с экспериментальной хронической сердечной недостаточностью и оценена эффективность их коррекции с помощью нового координационного соединения германия с никотиновой и оксиэтилидендифосфоновой кислотами (ОЕ-5)

Resume. was studied the changes in the fatty acid composition of cardiomyocytes lipids on rats with experimental chronic heart failure and evaluate the effectiveness of its correction by new complex of germanium with nicotinic and oxiethylendiphosphonic acids (OE-5)

Актуальность. Первопричиной многих заболеваний сердца является нарушение метаболических процессов на клеточном и субклеточном уровнях. Для коррекции нарушений в настоящее время используют лекарственные препараты, которые можно отнести к мембраностабилизирующим средств, а также препараты, которые уменьшают накопление свободных радикалов и активных форм кислорода. Доказана связь сердечно-сосудистых заболеваний с жирнокислотным составом липидов пищи, крови, тканей [7]. Жирные кислоты (ЖК) участвуют в биохимических процессах в клетках, в миокарде насыщенные жирные кислоты выполняют функцию основного энергетического субстрата [6]. В физиологических условиях насыщенные жирные кислоты (НЖК) в составе триглицеридов попадают в клетку через апоЕ/В100-рецепторы липопротеидов очень низкой плотности путем активного транспорта, который является основным, тогда как пассивная диффузия НЖК в клетку зависит от концентрации ЖК в крови [4].

Ненасыщенные жирные кислоты (ННЖК) как структурные компоненты фосфолипидов мембран является важным фактором функционирования мембраносвязанных белков и регулирования транспорта веществ через плазматические мембраны клеток. Кроме этого, арахидоновая ЖК является субстратом синтеза простагландинов - одной из групп регуляторов биохимических реакций в живом организме. ННЖК присуща способность усиливать оксидативный стресс [5].

Среди основных стратегий, направленных на снижение заболеваемости сердечно-сосудистой системы, важная роль отводится поиску новых кардиопротекторных средств (антиоксидантных препаратов; стимуляторов

цитопротекторов, препаратов, снижающих уровень липидов) различного химического строения. Особое внимание ученых последние несколько лет привлекают новые комплексные соединения германия с биолигандами, отличающиеся многовекторностью фармакологического действия и низкой токсичностью. [1, 2]. Все это теоретически обосновывает целесообразность исследования новых координационных соединений германия с органическими биолигандами в условиях экспериментальной модели хронической сердечной недостаточности (ХСН), которые впервые проводятся под руководством профессора И.Ниженковской на кафедре фармацевтической, биологической и токсикологической химии Национального медицинского университета имени А.А.Богомольца[3].

Цель: Изучить изменения жирнокислотного состава липидов кардиомиоцитов крыс при экспериментальной ХСН и оценить эффективность их коррекции с помощью нового координационного соединения германия с никотиновой и оксиэтилидендифосфоновой кислотами (ОЕ-5).

Задачи:

1. Исследовать влияние комплекса германия с никотиновой и оксиэтилидендифосфоновой кислотами на липидный состав кардиомиоцитов крыс в сравнении с влиянием монопрепарата никотиновой кислоты.

2. Исследовать возможность применения комплекса ОЕ-5 для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

Материалы и методы. Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 180-220 г. Уход за животными (включая эвтаназию) осуществляли согласно Директивы Европейского Союза 2019/10/63 EU о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, и в соответствии с Законом Украины № 3447-IV «О защите животных от жестокого обращения». Животных содержали на обычном сбалансированном пищевом рационе и свободном доступе к воде в условиях вивария Национального медицинского университета имени А. А. Богомольца, Киев, Украина.

В опытах были использованы доксорубин (ДОК) -КМП в форме лиофилизированного порошка для приготовления раствора для инъекций по 0,01 г (производитель ОАО «Киевмедпрепарат», Украина), никотиновая кислота (ниацин), порошок кристаллический (субстанция) (производитель Aarti Drugs Ltd, Индия) и комплекс германия с никотиновой и оксиэтилидендифосфоновой кислотами (лабораторный шифр ОЕ-5), впервые синтезированный в лаборатории кафедры общей химии и полимеров Одесского национального университета имени И. И. Мечникова под руководством профессора И.И. Сейфуллиной, Украина.

Животные методом случайной выборки были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой: 1 группа - животные, которым еженедельно в течение 5 недель внутримышечно вводили 0,9% NaCl (контроль); 2 группа - животные, которым 5 недель еженедельно вводили внутримышечно ДОК из расчета 5 мг/кг (экспериментальная хроническая сердечная недостаточность (ХСН); 3 группа -

животные, которым в течение 5 недель вводили внутримышечно ДОК на фоне внутрибрюшинного введения никотиновой кислоты в дозе 10 мг/кг/день (никотиновая кислота); 4 группа - животные, которые в течение 5 недель получали внутримышечно ДОК на фоне внутрибрюшинного введения комплекса ОЕ-5 в дозе 10 мг/кг/день. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом с последующей экстирпацией сердца.

Для газохроматографического определения жирных кислот липидов в ткани навеску ткани количеством 0,3-0,5 г помещали в гомогенизатор, полученный гомогенат переносили в мерную пробирку объемом 10 мл с притертой пробкой и заливали хлороформ-метаноловой смесью (5 мл в соотношении 2:1) (на основе метода Фолча) и выдерживали в течение 30 мин в холодильнике. Для лучшего распределения фаз добавляли 1 мл дистиллированной воды. Далее пипеткой Пастера отбирали нижнюю хлороформную фазу. Для полной реакции этап экстракции повторяли дважды. Объединенные хлороформные экстракты концентрировали испарением к объему одной капли под струей газообразного азота при температуре 45°C на водяной бане. К сухому осадку липидов добавляли 5 мл 1% раствора H₂SO₄ в метаноле и переносили раствор в стеклянную ампулу емкостью 10 мл. После запайки ампулы проводили гидролиз и метилирование (на основе метода Синяка) в термостате при 85°C в течение 20 мин. Экстракцию метилированных ЖК проводили дважды гексан-эфирной смесью (в соотношении 1:1) в количестве 5 мл. Для распределения фаз добавляли 1 мл дистиллированной воды. Верхнюю фазу отбирали пипеткой Пастера. Объединенные экстракты выпаривали досуха в потоке газообразного азота при 45°C на водяной бане. Сухой осадок растворяли в 40-50 мкл чистого гексана и вносили в испаритель хроматографа в количестве 5 мкл. Газохроматографический анализ спектра ЖК липидов проводили на газовом хроматографе «Цвет-500» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором в изотермическом режиме при следующих условиях: стеклянная колонка (размером 3 м x 0,3 см), заполненная фазой 5% полиэтиленгликоля сукцината на хроматоне N-AW-HMDS (зернистость - 0,125-0,160 мм); температура колонки - 180° С; температура испарителя - 250° С; расход азота и водорода - 35 мл/мин, воздуха - 200 мл/мин; скорость диаграммной ленты - 240 мм/ч; чувствительность шкалы - 10⁻⁹А; объем пробы, которую вносили - 5 мкл; продолжительность анализа - 30 мин. Идентифицировали ЖК по пикам на газовой хроматограмме, сравнивая время их удержания со временем удержания пиков стандартных чистых веществ с известным качественным и количественным составом. Количественную оценку спектра ЖК проводили методом нормирования плоскостей пиков метилированных производных ЖК и определяли их состав в процентах. Погрешность составляла ± 10%.

Полученные результаты представлены в виде среднеарифметического (M) и стандартной ошибки (m), с учетом количественной выборки (n). Полученные результаты обрабатывали с помощью U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при P < 0,05.

Результаты и их обсуждение

В спектре ЖК липидов кардиомиоцитов было идентифицировано 9 наиболее информативных ЖК: миристиновая С14:0, пентодеканова С15:0, пальмитиновая С16:0, маргариновая С17:0, стеариновая С18:0, составляющие сумму НЖК, а также олеиновая С18:1, линолевая С18:2, линоленовая С18:3 и арахидоновая С20:4, составляющие группу ННЖК. Линолевая С18:2, линоленовая С18:3, арахидоновая С20:4 ЖК входят в сумму полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и определяются как незаменимые.

Для кардиомиоцитов контрольной группы характерна повышенная ненасыщенность (почти 60%) за счет арахидоновой и линолевой ЖК. Уровень ПНЖК составляет почти 50% от всего количества ВЖК.

Проведенные исследования показали, что у животных с экспериментальной ХСН наблюдались значительные изменения жирнокислотного состава липидов в ткани сердца (табл. 1). Установлено статистически достоверное снижение суммы ПНЖК липидов кардиоцитов преимущественно за счет снижения содержания арахидоновой и линолевой ЖК. Сумма ННЖК достоверно не изменилась по сравнению с контролем. В то же время уровень олеиновой кислоты был в 1,5 раза выше, чем в контрольной группе. Среди изменений в спектре НЖК следует отметить повышение содержания пальмитиновой кислоты, но данные изменения достоверно не отличились на сумме НЖК ($44,10 \pm 1,50$) % против ($40,60 \pm 1,60$) % в контроле. Таким образом, ДОК повлиял на содержание ПНЖК, что связано, возможно, с активацией реакций перекисного окисления липидов в клетках, уменьшением стойкости мембран, большей подверженности клеток к разрушению под действием факторов агрессии.

Таблица 1. Влияние никотиновой кислоты и комплекса германия с никотиновой и оксиэтилидендифосфоновой кислотами (ОЕ-5) на жирнокислотный состав липидов кардиомиоцитов крыс с экспериментальной ХСН ($M \pm m$; $n = 10$)

ЖК, %	1 группа Контроль	2 группа ХСН	3 группа Никотиновая кислота	4 группа ОЕ-5
миристиновая С14:0	$2,80 \pm 0,30$	$3,40 \pm 0,50$	$3,20 \pm 0,30$	$0,60 \pm 0,10^{*/**}$
пентодекановая С15:0	$0,90 \pm 0,10$	$0,70 \pm 0,10$	$1,30 \pm 0,10^{*/**}$	$0,60 \pm 0,10$
пальмитиновая С16:0	$21,90 \pm 1,00$	$25,50 \pm 1,00^*$	$24,40 \pm 1,00$	$19,10 \pm 1,00^{**}$
маргариновая С17:0	$0,20 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,05$
стеариновая С18:0	$14,80 \pm 1,00$	$14,20 \pm 1,00$	$16,40 \pm 1,00^{**}$	$12,70 \pm 1,00$
олеиновая С18:1	$9,90 \pm 0,70$	$14,7 \pm 1,00^*$	$10,50 \pm 0,80^{**}$	$11,00 \pm 1,30$
линолевая С18:2	$13,80 \pm 1,00$	$10,80 \pm 0,70^*$	$12,40 \pm 1,00^{**}$	$11,20 \pm 1,60$
линоленовая С18:3	$0,20 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,05$
арахидоновая С20:4	$35,50 \pm 1,30$	$30,10 \pm 1,10^*$	$31,50 \pm 1,00$	$44,30 \pm 1,50^{**}$
Σ НЖК	$40,60 \pm 1,60$	$44,10 \pm 1,50$	$45,50 \pm 1,30$	$33,20 \pm 2,00$

Σ ННЖК	59,40 ± 1,60	55,90 ± 1,50	54,50 ± 1,30	66,80 ± 2,00
Σ ПНЖК	49,50 ± 1,30	41,20 ± 1,30*	44,10 ± 1,20	55,70 ± 1,80**

Примечание. * - достоверно относительно контроля ($P < 0,05$); ** - достоверно относительно 2 группы ($P < 0,05$)

Комплексное соединение ОЕ-5 в условиях экспериментальной ХСН у крыс оказывал более выраженное влияние на состав ЖК липидов кардиомиоцитов по сравнению с никотиновой кислотой. Сумма ПНЖК достоверно увеличилась в сравнении с показателями 2 группы животных, преимущественно за счет повышения содержания арахидоновой ЖК. Кардиотоксическое действие антрациклинового антибиотика ДОК объясняется активацией оксидативного стресса, что приводит к перекисному окислению липидов в клетках, следствием чего является дефицит ПНЖК, в основном арахидоновой ЖК.

Проведенные исследования показали выраженное влияние нового комплексного соединения ОЕ-5 на ЖК состав липидов тканей миокарда крыс с экспериментальной ХСН. Возможно, действие данного комплекса связано с прямым антирадикальным действием, которое приводит к снижению активности образования активных форм кислорода, а также особенностями взаимодействия компонентов комплекса между собой и компонентами биомембран, что приводит к повышению оксидантной устойчивости клеток.

Выводы. Введение комплекса германия с никотиновой и оксиэтилидендифосфоновой кислотами (ОЕ-5) в условиях экспериментальной хронической сердечной недостаточности приводит к восстановлению состава жирных кислот липидов в ткани миокарда и крыс. Полученные экспериментальные данные могут быть основой для последующего исследования механизмов действия координационных соединений германия с органическими биолигандами с возможной перспективой использования их в качестве лекарственных препаратов с кардиопротекторной активностью.

Литература

1. Кресюн В. Й. Фармакологическая характеристика соединений германия / В. Й. Кресюн, К. Ф. Шемонаева, А. Г. Видавская // Клинич. фармация. – 2004. – № 4. – С. 64–68.
2. Лукьянчук В. Скрининг и сравнительная оценка противоишемической эффективности среди координационных соединений германия при острой цереброваскулярной недостаточности / В. Д. Лукьянчук, I. О. Житина, И. Й. Сейфуллина [и др.] // Фармакология та лекарственная токсикология. – 2010. – № 1–2 (14–15). – С. 61–64.
3. Ниженковская И.В. Влияние никотиновой кислоты и комплекса германия с никотиновой кислотой (МИГУ-1) на жирнокислотный состав липидов кардиомиоцитов і гепатоцитов крыс с экспериментальной хронической сердечной недостаточностью / Ниженковская И.В., Нароха В.П., Кузнецова О.В. [и др.] // «Фармакология и лекарственная токсикология», 2015. № 1 (42), С.68-75
4. Титов В.Н. Конформация апоВ-100 в филогенетически и функционально разных липопротеинах низкой и очень низкой плотности. Алгоритм формирования фенотипов гиперлипопротеинемии / В. Н. Титов, В. А. Амелюшкина, Т. А. Рожкова // Клин. лаб. диагн. – 2014. – № 1. – С. 27–38.

5. Rukkumani R. Comparative effects of curcumin and an analog of curcumin on alcohol and PUFA induced oxidative stress / R. Rukkumani, K. Aruna, P. Varma [et al.] // J. Pharm. Pharm. Sci. – 2004. – V. 7 (2). – P. 274–83.
6. Titov V. Low and very low density lipoproteins: pathogenetic and clinical significance / V. N. Titov, I. A. Vostrov, S. I. Kaba [et al.] // Klin. Med. (Mosk). – 2013. – V. 91 (1). – P. 20–7.
7. Wang Q. Plasma Phospholipid Trans-Fatty Acids Levels, Cardiovascular Diseases, and Total Mortality: The Cardiovascular Health Study [Электронный ресурс] / Q. Wang, F. Imamura, R. Lemaitre [et al.]. – Режим доступа: <http://jaha.ahajournals.org/content/3/4/e000914.full>

Репозиторий ВУМ