

УДК 611.13:612.146.014.481.1

Є.М. Горбань,

О.В. Паршиков

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

ВПЛИВ ЦИГАПАНУ НА РЕАКТИВНІСТЬ ІЗОЛЬОВАНИХ СУДИН ЩУРІВ, ОПРОМІНЕНИХ У СУБЛЕТАЛЬНІЙ ДОЗІ

Ключові слова: рентгенівське опромінення, реакції ізольованих судин, біологічно активна добавка "Цигапан".

Резюме. Мета роботи - дослідити розвиток судинних розладів у дорослих щурів (7-8 міс) в наслідок дії іонізуючої радіації. На фрагментах аорти і мезентеріальної артерії, ізольованих у щурів на 30 добу після одноразового рентгенівського опромінювання (7 Гр), спостерігали пригнічення реакції ендотелій-залежного розслаблення, зниження чутливості гладеньких м'язів до фенілефрину та інсуліну. Встановлено, що курсове застосування біологічно активної добавки "Цигапан" має радіопротекторний ефект і призводить до відновлення функціональної активності судин у випадку, коли препарат вводили (щоденно 2 мг, протягом 30 діб) після опромінювання.

Вступ

Артеріальна гіпертензія і інсулінова резистентність займають провідне місце серед віддалених наслідків впливу іонізуючої радіації на регуляцію судинного тонуусу та асоціюються з розвитком патологічних змін у серцево-судинній системі [1-4]. У зв'язку з цим, залишаються актуальними пошуки нових підходів та найбільш ефективних засобів кардіо- і вазопротекторної дії, зокрема для профілактики і лікування радіаційно-обумовлених порушень [5,6].

Мета дослідження

Вивчити можливість запобігання негативним наслідкам одноразового рентгенівського опромінювання (R-опромінювання) щурів у сублетальній дозі на реактивність судин опромінених тварин за допомогою біологічно активної добавки (БАД) "Цигапан", позитивні ефекти застосування якої доведені при широкому діапазоні форм патології та дії несприятливих чинників середовища, включаючи радіоіндуковані ушкодження [7-11]. Біологічно-активна добавка "Цигапан" містить 63 макроелементи та мікроелементи, у тому числі такі, що сприяють антиоксидантному захисту організму (селен, молібден); регуляції вуглеводного обміну (марганець, хром, ванадій, літій); регуляції функціонування серцево-судинної системи (калій, натрій, магній); 12 вітамінів, серед яких такі, що чинять антиоксидантну дію (вітаміни С і Е); 20 амінокислот, серед яких 7 незамінних.

Матеріал і методи

Дослідження проведено на дорослих (7-8 міс) щурах-самцях популяції Вістар масою 180-220 г, поділених на 5 груп: 1 - контрольна; 2 - щури, під-

дані впливу одноразового R-опромінювання за допомогою рентген-установки "РУМ-17" в дозі 7 Гр (Gy) (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 опромінювання); 3 - щури, піддані впливу одноразового R-опромінювання в дозі 7 Гр з подальшим курсовим згодовуванням Цигапану (БАД "Цигапан", виробництва ТОВ "Планета здоров'я - 2000" (Росія. Зареєстровано МОЗ України 05 жовтня 2005 року. Свідоцтво про державну реєстрацію № 177) щоденно в дозі 2 мг протягом 30 діб і наступним гострим дослідом (гострий дослід для вилучення судин проводився наступного дня після завершення курсового згодовування Цигапану); 4 - щури після курсового згодовування Цигапану щоденно в дозі 2 мг протягом 30 діб; 5 - щури після курсового згодовування Цигапану щоденно в дозі 2 мг протягом 30 діб та послідуєчого одноразового R-опромінювання в дозі 7 Гр, через 30 діб після якого їх брали в гострий дослід. Евтаназію тварин проводили під CO₂-наркозом.

Досліджено агоніст- та інсулін-залежні реакції судин, ізольованих у піддослідних щурів. Фрагменти торакального відділу аорти (ТА) і мезентеріальної артерії (МА) видаляли негайно після розтину тварини і зберігали в охолодженому розчині Кребса (який містив у mM: 132 NaCl; 4,7 KCl; 1,4 NaH₂PO₄; 1,0 MgCl₂; 2,1 CaCl₂; 21 NaHCO₃; 6,5 глюкози; pH 7,4 підтримували продувкою 5% CO₂ і 95% O₂). Ізольовані судини очищували від залишків жирової і сполучної тканини на зовнішній поверхні, розрізали на кільця шириною до 1 мм, зберігали охолодженими до

проведення дослідів.

Механографічні дослідження скорочувальних реакцій ізольованих судин проводили на експериментальній установці [12]. Кільцеві фрагменти аорти і мезентеріальної артерії 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 ізольованих судин реєстрували в ізометричному режимі за допомогою тензометричних датчиків (ФТК-0.1), аналогоцифрового перетворювача Lab-Trax 4-CDA і програмного забезпечення Data Trax 2 (WPI, США).

Вимірювання амплітуди скорочень ізольованих судин проводили після стабілізації реакції гладеньких м'язів на стимуляцію гіперкалієвим розчином Кребса (KCl, 60 mM) протягом 40-60 хвилин. Наявність ендотелій-залежних реакцій оцінювали як здатність судин, попередньо скорочених фенілефрином (PE, 3×10^{-6} M), дозо-залежним чином розслаблятися у відповідь на ацетилхолін (10^{-9} - 10^{-5} M), що відображали у % відносно рівня максимального тонічного напруження в стаціонарній фазі. Рівень ендотелій-незалежних реакцій судин досліджували на фрагментах після механічного видалення ендотелію (ватним тампоном). Визначали здатність цих фрагментів дозо-залежним чином скорочуватися під дією агоніста $\alpha 1$ -адренорецепторів фенілефрину (PE), (10^{-9} - 10^{-5} M) у % відносно рівня максимального тонічного напруження, який було прийнято за 100 % [13, 14].

Рівень ендотелій-залежного розслаблення під дією ацетилхоліну (ACh) та ендотелій-незалежного скорочення на фенілефрин (PE) (кумулятивний доза-ефект) фрагментів судин досліджували в умовах блокади синтезу простаноїдів індометацином (10^{-5} M). Для розрахунку середньої ефективної діючої концентрації ацетилхоліну і фенілефрину ($\log EC_{50}$) застосовували графічний метод побудови S-подібних кривих "доза-ефект" (розслаблення, % - концентрація агоніста, \log_{10} M), які були апроксимовані за рівнянням Хілла [15]. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за методом t-тесту Ст'юдента для непарних вимірів [16]. Розходження вважали статистично достовірними, якщо величина $p < 0,05$. Розрахунки проводили з використанням програм Origin 6.1 (OriginLab Co., США) і Excel 5.0 (Microsoft, США).

Для приготування розчину Кребса використовували солі і глюкозу кваліфікації х.ч. виробництва "Хімреактив" (Україна). В досліді застосовували ацетилхолін, фенілефрин і індометацин

виробництва Sigma Chemical Co. (США), інсулін людини виробництва "Індар" (Україна).

Обговорення результатів дослідження

Фрагменти ТА щурів після опромінювання і тих, які отримували Цигапан до опромінювання, відрізнялися більш низьким рівнем ендотелій-залежного розслаблення у відповідь на ацетилхолін (10^{-5} M) (E_{max} , $69,6 \pm 4,0$ % і $50,9 \pm 4,2$ %, відповідно), порівняно з контрольними тваринами і тими, що отримували Цигапан після опромінювання (E_{max} , $95,4 \pm 2,7$ % і $89,7 \pm 3,6$ %) рис. 1, А.

В окремих експериментальних групах опромінених тварин спостерігалися зміни чутливості аорти до ацетилхоліну, які виявлялися у вигляді зсувів вліво кривої доза-ефект, відносно показників контролю. Фрагменти ТА, ізольовані у опромінених тварин і тих, які отримували Цигапан після опромінювання, відрізнялись підвищеною чутливістю до ацетилхоліну ($\log EC_{50}$, $-7,0 \pm 0,02$ і $-7,1 \pm 0,04$, відповідно), у порівнянні з контролем та групою тварин, опромінених після введення Цигапану ($\log EC_{50}$, $-6,8 \pm 0,03$ і $-6,8 \pm 0,09$, відповідно).

Результати дослідження скорочувальної активності гладеньких м'язів фрагментів ТА щурів з різних експериментальних груп під дією фенілефрину наведені на рис. 1, В. Фрагменти аорти ізольовані в опромінених тварин і тих, які отримували БАД Цигапан до опромінювання, відрізнялися низькою чутливістю до фенілефрину ($\log EC_{50}$, $-6,7 \pm 0,02$ і $-6,9 \pm 0,04$, відповідно), у порівнянні з контролем та групою тварин, опромінених після введення Цигапану ($\log EC_{50}$, $-7,1 \pm 0,04$ і $-7,03 \pm 0,1$), беручи до уваги зсуви вправо відповідних кривих доза-ефект.

Зміни реактивності фрагментів аорти щурів досліджували також у відношенні до інсуліну в концентрації близькій до фізіологічної (0,001 Од/мл), згідно [17]. Встановлено, що фрагменти ТА контрольних тварин у присутності інсуліну набувають підвищеної чутливості до ацетилхоліну і фенілефрину. Ця тенденція зберігалася на судинах тварин, яким вводили Цигапан після опромінювання. Реактивність судин у тварин, опромінених окремо і після введення Цигапану, значно змінювалася, а саме спостерігалось пригнічення ендотелій-залежної дилатації та відсутність характерної відповіді гладеньких м'язів на інсулін (інсулінова резистентність).

Узагальнені результати дослідження дилаторних і констрикторних реакцій фрагментів МА, ізольованих у щурів з різних експериментальних груп представлені на рис. 2 (А, В).

Особливістю реакції МА опромінених щурів є скорочення у відповідь на низькі концентрації

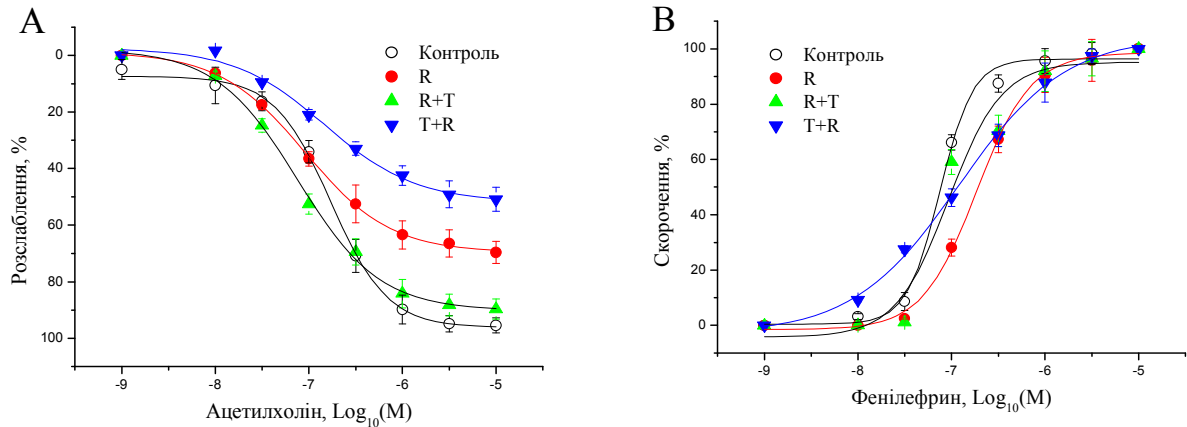


Рисунок 1. Ендотелій-залежне розслаблення фрагментів аорти під дією ацетилхоліну (А), скорочення фрагментів аорти, позбавлених ендотелію, під дією фенілефрину (В). Судини були ізолювані у щурів контрольної групи (Контроль, n=14); у опромінених щурів (R, n=12); у щурів, які отримували Цигапан (Т) після опромінювання (R+T, n=12); у щурів, які отримували Цигапан до опромінювання (Т+R, n=10).

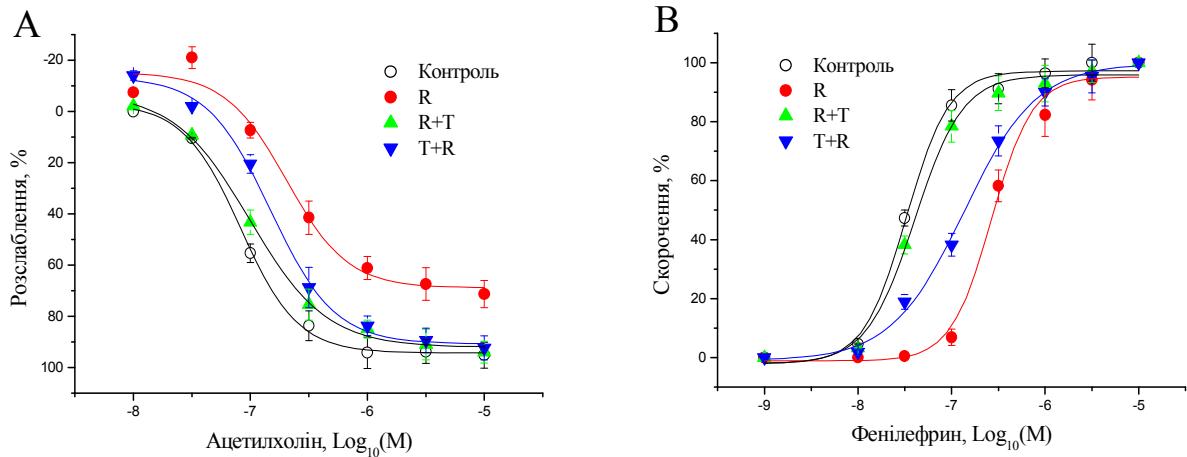


Рисунок 2. Ендотелій-залежне розслаблення фрагментів мезентеріальної артерії під дією ацетилхоліну (А), скорочення фрагментів мезентеріальної артерії, позбавлених ендотелію, під дією фенілефрину (В). Судини були ізолювані у щурів контрольної групи (Контроль, n=10); в опромінених щурів (R, n=12); у щурів, які отримували Цигапан (Т) після опромінювання (R+T, n=14); у щурів, які отримували Цигапан до опромінювання (Т+R, n=10).

ацетилхоліну (до 10^{-7} М) і пригнічення реакції ендотелій-залежного розслаблення (E_{max} , $71,3 \pm 5,3$ %), порівняно з судинами контрольних тварин і тих, які отримували Цигапан до і після опромінювання (E_{max} , $95,2 \pm 5,1$ %, $92,3 \pm 4,7$ % і $94,0 \pm 4,2$ %, відповідно). Разом з тим, за показником чутливості до ацетилхоліну фрагменти МА тварин, які отримували Цигапан після опромінювання, були наближені до контролю ($\log EC_{50}$, $-7,0 \pm 0,04$ і $-7,1 \pm 0,03$, відповідно), порівняно з судинами опромінених тварин і тих, що отримували Цигапан до опромінювання ($\log EC_{50}$, $-6,7 \pm 0,11$ і $-6,8 \pm 0,04$, відповідно).

Дані з вимірювання скорочувальних реакцій гладеньких м'язів ізолюваних фрагментів МА вказують на те, що судини опромінених тварин і тих, які отримували Цигапан до опромінювання, суттєво менш чутливі до фенілефрину ($\log EC_{50}$, $-6,6 \pm 0,05$ і $-6,9 \pm 0,04$, відповідно), ніж судини контрольних і опромінених тварин після курсового

застосування Цигапану ($\log EC_{50}$, $-7,5 \pm 0,04$ і $-7,4 \pm 0,04$, відповідно).

Фрагменти МА ізолювані у контрольних щурів і опромінених до застосування Цигапану виявилися не сприйнятливими до дії інсуліну. Проте, судини опромінених тварин і тих, яких опромінювали після курсового застосування Цигапану, демонструють збільшення реакції ендотелій-залежної дилатації і чутливості до ацетилхоліну, а також зниження чутливості до фенілефрину в присутності інсуліну (0,001 Е/мл).

Таким чином, отримані результати засвідчують, що одноразове R-опромінювання (7 Gy) може викликати у щурів судинні порушення, які позначаються на здатності судин (резистивного і м'язового типу) здійснювати ендотелій-залежні й ендотелій-незалежні реакції. Разом із тим, треба відзначити значні зміни в регуляції судинного тону під дією інсуліну, що напевне відображає розвиток фізіологічного стану інсулінової резис-

тентності, як одного з ключових патологічних наслідків пострадіаційного ураження організму людини і тварини [18].

Представлені результати дозволяють стверджувати, що БАД Цыгапан може бути ефективним у лікуванні пострадіаційних судинних порушень, зокрема у тому випадку, коли курсове застосування Цыгапану проводиться після опромінювання.

Висновки

Одноразове R-опромінювання щурів у сублетальній дозі 7 Гр спричиняло до значного порушення функціональної активності судин, як свідчать дослідження на ізольованих фрагментах аорти і мезентеріальної артерії. Застосування "Цыгапану" після опромінення є перспективним засобом відновлення регуляції судинних реакцій.

Перспективи подальших досліджень

Отримані нами результати свідчать про доцільність пошуку нових засобів на додаток до традиційних лікувальних заходів, спрямованих на попередження судинних розладів, що виникають внаслідок опромінювання організму.

Література. 1. McGale P. Low doses of ionizing radiation and circulatory diseases: a systematic review of published epidemiological evidence / P.McGale, S.C.Darby // *Rad. Res.* - 2005. - Vol. 163, № 3. - P. 247-257. 2. Hoel D.G. Ionizing radiation and cardiovascular diseases / D.G.Hoel // *Ann. NY Acad. Sci.* - 2006. - Vol. 1076. - P. 309-317. 3. Зуева Н.А. Ионизирующая радиация и инсулинорезистентность / Н.А.Зуева, А.Н. Коваленко, А.С.Ефимов [и др.]. - К.: Здоров'я, 2004. - 198 с. 4. Коваленко А.Н. Системные радиационные синдромы / А.Н. Коваленко, В.В. Коваленко-Николаев: Изд-во НГТУ им. Петра Могилы, 2008. - 248 с. 5. Горбань Е.Н. Влияние кораргина на реактивность изолированной аорты взрослых и старых облученных крыс / Е.Н. Горбань, Н.В. Сыкало, Е.В. Подьяченко // *Лік. справа. Врачеб. дело.* - 2012. - № 1-2. - С.116-123. 6. Горбань Е.Н. Реактивность изолированных сегментов грудной аорты крыс разного возраста через 1 мес после рентгенооблучения в условиях гипоксии / Е.Н. Горбань, Н.В. Сыкало, Е.В. Подьяченко // *Проблемы старения и долголетия.* - 2012. - Т. 21, № 2. - С. 153-162. 7. Иванов А.А. Роль минеральной компоненты пищевой добавки "Цыгапан" в радиозащите / А.А. Иванов, Н.К. Шандала, В.А. Комлева [и др.] // Биологически активные добавки к пище: XXI век: сб. тез. докладов IV Международного симпозиума - Санкт-Петербург, 22-24 мая 2000 г. - М.: Миннауки РФ, 2000. - С. 90-92. 8. Калистратова В.С. Подходы к решению отдаленных последствий при инкорпорации радионуклидов / В.С.Калистратова, Л.А.Булдакова, Н.К.Шандала [и др.] // *Здравоохр. Рос. Федерации.* - 2000. - № 2. - С. 20-30. 9. Цыгапан. Панацея XXI века / 2-е изд., дораб. и доп. - Изд.: "Планета здоровья-2000", 2002. - 330 с. 10. Цыганков В.В. Цыгапан. Научные исследования, клинические и доклинические испытания / В.В. Цыганков - Изд.: "Планета здоровья-2000", 2003. - 422 с. 11. Диетология. 4-е изд./ под ред. А.Ю. Барановского. - СПб.: Питер, 2012. - 1024 с. 12. 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. 13. Machha A. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta / A. Machha, M.R. Mustafa // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* - 2005. - V. 46, № 1. - P. 36-40. 14. Hussain M.B. Charac-

terization 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, N 5. - P. 849-858. 15. Taguchi K. Effects of tamsulosin metabolites at alpha-1 adrenoceptor subtypes / K.Taguchi, M.Saitoh, S. Sato [et all] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1997. - V. 280, № 1. - P. 1-5. 16. Минцер А.П. Методы обработки медицинской информации / А.П. Минцер, Б.Н. Угаров, В.В.Власов - Киев: Вища школа, 1991. - 271 с. 17. Паршиков А.В, Пупышева Е.В, Соловьев А.И. Изменение чувствительности аорты крысы к инсулину при облучении от внешнего источника ^{60}Co . // Віддалені наслідки впливу іонізуючого випромінювання: мат. конф. - Київ, 2007. - С. 50-51. 18. Soloviev A. 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.

ВЛИЯНИЕ ЦЫГАПАНА НА РЕАКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ СОСУДОВ КРЫС, ОБЛУЧЕННЫХ В СУБЛЕТАЛЬНОЙ ДОЗЕ

Е.М. Горбань, А.В. Паршиков

Резюме. Цель работы - исследовать развитие сосудистых нарушений у взрослых крыс (7-8 мес) после воздействия ионизирующей радиации. На фрагментах аорты и мезентерической артерии, изолированных у крыс на 30 день после одноразового рентгеновского облучения (7 Гр), наблюдали угнетение реакции эндотелий-зависимого расслабления, снижение чувствительности гладких мышц к фенилэфрину и инсулину. Установлено, что курсовое применение биологически активной добавки "Цыгапан" оказывало радиопротекторный эффект и приводило к восстановлению функциональной активности сосудов в случае, когда препарат вводили (2 мг ежедневно, на протяжении 30 дней) после облучения.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, реакции изолированных сосудов, биологически активная добавка "Цыгапан".

EFFECT OF TSYGAPAN ON REACTIVITY OF ISOLATED VESSELS OF RATS, IRRADIATED IN SUBLETHAL DOSE

Е.М. Gorban, O.V. Parshikov

Objective. To explore the possibility of radioprotective influence a course of dietary supplement "Tsygapan" (2 mg daily dose for 30 days) on reactivity of isolated vessels (fragments of thoracic aorta and mesenteric artery) of rats after a single X-ray irradiation in sublethal doses of 7 Gy.

Methods: Five groups of adult (7-8 months) Wistar population male rats were used: 1 - control; 2 - X-irr. at a dose of 0,01806 C/kg (7 Gy) (dose rate 0,00129 C/kg per/min), exposition time - 14 min, rats were taken to experiment 30 days after exposure); 3 - X-irr. at a dose of 7 Gy, followed by feeding of Tsygapan daily at a dose of 2 mg for 30 days and subsequent acute experiment (acute experiment to extract vessels held the day after the course feeding of Tsygapan); 4 - courses feeding of Tsygapan daily dose of 2 mg for 30 days and subsequent acute experiment; 5 - courses feeding of Tsygapan daily dose of 2 mg for 30 days before a single X-irr. at a dose of 7 Gy, 30 days after which they took in acute experiment. Agonist- and insulin-dependent reaction of isolated vessels of experimental rats were investigated.

Results: X-irr. leads to lower levels of endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine (10^{-5} M) compared to control animals and those receiving Tsygapan after irradiation. In group of exposed animals were observed changes in sensitivity to acetylcholine, which manifested as a shift to the left dose-effect curve relative to controls. Fragments of isolated vessels in

irradiated animals and those treated after exposure differed. Tsygapan increased sensitivity to acetylcholine, compared with the control group and animals exposed after a course introduction Tsygapan. Contractile activity of blood vessels smooth muscle of irradiated animals and those receiving supplements Tsygapan to radiation differed low sensitivity to phenylephrine, compared with the control group and animals exposed after entering Tsygapan, taking into account the right shift corresponding dose-effect curves.

Changes of vessels reactivity studied also in relation to the insulin concentration close to physiological (0,001 U/ml). Established that sensitivity of control animals vessels in the presence of insulin to become acetylcholine and phenylephrine. This trend continued to vessels fragment of animals feeding Tsygapan after irradiation. However, in the case of animals exposed separately and after the introduction of Tsygapan changes were observed, indicating a significant inhibition of endothelium-dependent dila-

tion and lack of response of smooth muscle to insulin (insulin resistance).

Conclusion. Radiation produced a significant impact on the reactivity of the investigated vessels - the ability to endothelium-dependent and endothelium-independent reaction, and exchange feeding Tsygapan was effective in preventing these radiation induced disorders of vascular reactivity when it used after X-irr.

Key words: ionizing radiation, reactivity of isolated blood vessels, dietary supplement "Tsygapan".

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

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol. 14, №4 (54). - P.27-31.

Надійшла до редакції 28.09.2015

Рецензент – проф. В.Ф.Мислицький

© Є.М. Горбань, О.В. Паришков, 2015